

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА

На правах рукописи

**Ульянова Онега Владимировна**

**МЕТОДОЛОГИЯ ПОВЫШЕНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ  
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВАКЦИН НА МОДЕЛИ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ  
*BRUCELLA ABORTUS* 19 ВА, *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ,  
*YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ**

03.02.03 – микробиология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Научный консультант: доктор медицинских наук,  
профессор  
Фёдорова Валентина Анатольевна

Саратов – 2014

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
ГЛАВА 1. Современное состояние вакцинопрофилактики бруцеллеза, туляремии, чумы .....	20
1.1. Классификация вакцин против бактериальных инфекций.....	20
1.2. Состояние проблемы вакцинопрофилактики бруцеллеза, туляремии и чумы.....	27
1.3. Способы повышения безопасности вакцин против бруцеллеза, туляремии и чумы.....	41
1.4. Оценка безопасности живых вакцин.....	64
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	67
2.1. Объекты исследования.....	67
2.2. Методы оценки жизнеспособности, культурально-морфологических и серологических свойств бактерий.....	68
2.3. Оценка безопасности вакцинных штаммов <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ и <i>B. abortus</i> 19 ВА по определению остаточной вирулентности, безвредности и реактогенности <i>in vivo</i> .....	70
2.4. Оборудование, реактивы и материалы.....	72
2.5. Лабораторные животные.....	74
2.6. Статистические методы.....	75
ГЛАВА 3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ <i>ESCHERICHIA COLI</i> И <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> РАЗНЫХ ШТАММОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ И ОПТИМИЗАЦИИ УСЛОВИЙ ИНАКТИВАЦИИ МЕТОДОМ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ.....	76

3.1. Выбор бактериальных штаммов, фотосенсибилизатора и длины волны облучения для проведения модельных экспериментов.....	77
3.2. Разработка установки для инаktivации бактерий методом фотодинамического воздействия <i>in vitro</i> .....	89
3.3. Влияние различных концентраций метиленового синего на колониобразующую способность бактерий <i>E. coli</i> spp. и <i>P. aeruginosa</i> spp.....	91
3.4. Влияние на колониобразующую способность бактерий <i>E. coli</i> spp. и <i>P. aeruginosa</i> spp. красного излучения разных источников.....	94
3.5. Влияние на колониобразующую способность бактерий <i>E. coli</i> spp. и <i>P. aeruginosa</i> spp. фотодинамического воздействия.....	96
3.6. Оптимизация условий инаktivации бактерий <i>E. coli</i> spp. и <i>P. aeruginosa</i> spp. методом фотодинамического воздействия (математическое моделирование).....	103
3.7. Колониобразующая способность и культурально-морфологические свойства бактерий <i>E. coli</i> spp. и <i>P. aeruginosa</i> spp. после проведения инаktivации методом фотодинамического воздействия.....	128
<b>ГЛАВА 4. ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ <i>BRUCELLA ABORTUS</i> 19 ВА, <i>FRANCISELLA TULARENSIS</i> 15 НИИЭГ И <i>YERSINIA PESTIS</i> EV НИИЭГ ПОСЛЕ ИНАКТИВАЦИИ МЕТОДОМ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ.....</b>	<b>146</b>
4.1. Характеристика культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств бактерий вакцинного штамма <i>B. abortus</i> 19 ВА после инаktivации.....	146
4.2. Характеристика культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств бактерий вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ после инаktivации.....	158

4.3. Характеристика культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств бактерий вакцинного штамма <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ после инактивации методом ФДВ.....	178
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ <i>BRUCELLA ABORTUS</i> 19 ВА И <i>FRANCISELLA TULARENSIS</i> 15 НИИЭГ ДО И ПОСЛЕ ИНАКТИВАЦИИ МЕТОДОМ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА МОРСКИХ СВИНКАХ.....	195
5.1. Определение безвредности, остаточной вирулентности и реактогенности вакцинного штамма <i>B. abortus</i> 19 ВА до и после инактивации методом фотодинамического воздействия в экспериментах на морских свинках.....	195
5.2. Определение безвредности, остаточной вирулентности и реактогенности вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ до и после инактивации методом фотодинамического воздействия в экспериментах на морских свинках.....	198
5.3. Определение реактогенности вакцинных штаммов <i>B. abortus</i> 19 ВА и <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ когерентно-оптическими методами в экспериментах на морских свинках.....	202
5.3.1. Разработка научно-методических основ применения биосистем для оценки реактогенности .....	202
5.3.2. Разработка и создание экспериментальной диагностической биосистемы для определения реактогенности вакцинных штаммов на организменном уровне, основанной на спекл-имиджинге.....	221
5.3.3. Разработка и создание экспериментальной диагностической биосистемы для определения реактогенности вакцинных штаммов на тканевом уровне, основанной на спекл-микроскопии.....	235
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	247

ВЫВОДЫ.....	252
СПИСОК ПРИНЯТЫХ В РАБОТЕ СОКРАЩЕНИЙ.....	255
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	256

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время специфическая профилактика таких зоонозов, как бруцеллез, туляремия и чума является актуальной, что обусловлено длительным существованием обширных природных очагов в РФ и сопредельных странах, наличием локальных эпизоотий, ростом заболеваемости в мире. Эти инфекции считаются социально значимыми, наносящими значительный экономический ущерб, который угрожает стабильности мирового сообщества (Олсуфьев, 1970; Руководство по профилактике чумы, 1992; Домарадский, 1993; Онищенко, 2001; Мещерякова и др. 2006, 2011; Скляр и др., 2008; Онищенко, Кутырев, 2009; Мировая статистика здравоохранения ВОЗ, 2010; Кутырев и др., 2011; Инфекционная заболеваемость в РФ, 2013; Лямкин и др., 2013; Попов и др., 2013; Levesque et al., 1995; Helvacı et al., 2000; Wicki et al., 2000; Boschioli et al., 2001; Reintjes et al., 2002; Corbel, Feodorova, 2011; Feodorova, Motin, 2011, 2012).

Специфическая профилактика бруцеллеза, туляремии и чумы более 60 лет успешно проводится живыми вакцинами, что привело к резкому спаду заболеваемости, снижению смертности в послевоенные годы прошлого столетия и спасению сотен тысяч жизней. Однако за длительный период использования живых вакцин выявлен ряд недостатков, связанных с проявлениями реактогенности штаммов-продуцентов *B. abortus* 19 ВА и *Y. pestis* EV (Наумов и др., 1992; Волох и др., 2013; Meyer et al., 1974; Perry, Fetherston, 1997); случаями возникновения поствакцинального бруцеллеза (Вершилова и др., 1975; Наумов, Самойлова, 1992; Книрель и др., 2011); обнаружением антител в крови сельскохозяйственных животных после введения *B. abortus* 19 ВА (в таком же титре, как и у больных), что затрудняло определение эпизоотического статуса животных по бруцеллезу (Глонти, 1973; Григорьева, Улицкая, 1990; Ляпина, 2004; Verman et al., 1980). При массовой иммунизации населения туляремийной вакциной были зарегистрированы случаи осложнений. Следует отметить

также снижение иммуногенных свойств вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, что происходило в результате потенциальной диссоциации данных бактерий в авирулентную для лабораторных животных R-форму, и это в свою очередь приводило к утрате способности формировать у человека длительный напряженный иммунитет против вирулентных штаммов туляремии (Олсуфьев, Дунаева, 1970; Горькова и др., 1981; Анисимова и др., 1982; Самойлова и др., 1987; Кисличкин, 2007; Gese, 1997).

Кроме того, риск завоза и распространения инфекций связан с проведением массовых спортивных мероприятий, развитием культурных и экономических межгосударственных связей, миграционными процессами, нередко вызванными военными конфликтами. Следует учитывать также, что возбудителей бруцеллеза, туляремии и чумы рассматривают во всем мире как потенциальных агентов для создания биологического оружия. Однако не меньшую угрозу представляют антропогенная трансформация ландшафтов природных очагов; природные и техногенные катастрофы; изменение климата, разрушение скотомогильников и рост эпизоотий (Денисов, 1983; Дятлов, 2002; Домнин, 2004; Онищенко, 2010; Удовиков, 2010).

Таким образом, для более широкого и массового проведения профилактических прививок населения и сельскохозяйственных животных необходимым считается повышение безопасности живых вакцин против бруцеллеза, туляремии и чумы (Руководство по профилактике чумы, 1992; Воробьев, 2002; Алексеев и др., 2003; Онищенко и др., 2007; Письмо ФС, 2007; Хаитов и др., 2007; Приказ ФС № 152, 2008; Удовиченко и др., 2013; Ales, Katial, 2004; Conlan, 2004; Gallagher-Smith et al., 2004; Corbel, Feodorova, 2011).

### **Степень разработанности проблемы**

В России и СНГ вакцину из штамма *Brucella abortus* 19 ВА применяют для профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных (с 1952 г.) и людей (с 1953 г.) (Вершилова, 1960; Шумилов и др., 1984; Corbel, Feodorova, 2011); вакциной из штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ проводят иммунизацию против туляремии с

1946 г. (Олсуфьев, Дунаева, 1970); живую вакцину из штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ для профилактики чумы используют с 1942 г. (Коробкова, 1956; 1970; Домарадский, 1993; Супотницкий и др., 2006; Anisimov et al., 2004; Feodorova, Corbel, 2009; Feodorova, Motin, 2011). В Европе, США и Канаде для профилактики туляремии длительное время (более 30 лет) использовали дериват «родительского» штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, живую вакцину *F. tularensis* LVS, доказавшую свою эффективность и безопасность для привитых людей (Gese et al., 1997; Ellis et al., 2002). Высокая эффективность живых вакцин из штаммов *B. abortus* 19 ВА и *B. abortus* RB51 была зарегистрирована в США при иммунизации крупного рогатого скота и диких животных (Olsen, Mamer, 2005; Denisov et al., 2010). Вместе с тем, для профилактики чумы в США, Европе и Австралии с 1946 по 1998 г. использовали только убитую USP вакцину, так как иммунизация некоторых биомоделей (none-human primates) живой вакциной на основе парентального штамма *Y. pestis* EV76 сопровождалась летальной чумой (Meyer, 1970). Следует отметить, что случаев реверсии вирулентности среди привитых людей за всю историю применения живых вакцин *B. abortus* 19, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *Y. pestis* EV НИИЭГ не наблюдалось.

Несмотря на это, современные исследования многих ученых мира направлены на создание безопасных вакцин, не содержащих живые микробные клетки (Домарадский, 1993; Хлебников и др., 1994; Жемчугов и др., 2004; Книрель и др., 2011; Волох и др., 2013; Fulop et al., 2001; Winter et al., 2002; Anisimov et al., 2004; Conlan, 2004; Goodin et al., 2005; Feodorova, Corbel, 2009; Feodorova, Motin, 2011, 2012). К таким вакцинам относятся химические, субъединичные, рекомбинантные и др. О создании лицензированных вакцин нового поколения пригодных для массовой иммунизации сельскохозяйственных животных и людей против бруцеллеза, туляремии и чумы, которые превосходили бы по иммуногенным свойствам известные лицензионные живые вакцины *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ, до начала наших исследований не сообщалось. Пока обнадеживающие результаты в этом направлении достигнуты только в экспериментах на лабораторных животных



(Олсуфьев, 1970; Домарадский, 1993; Селиверстов, Шумилов, 2001; Сафина и др., 2004; Иванов и др., 2006; Шумилов и др., 2008; Кисличкин, 2007; Салмакова, 2010; Книрель и др., 2011; Anisimov et al., 2004; Corbel, Feodorova, 2009, 2011; Feodorova, Motin, 2011, 2012). Так, против бруцеллеза, туляремии и чумы были предложены убитые вакцины (Домарадский, 1993; Медуницын, 2004; Книрель и др., 2011; Петров, Хаитов, 2011; Winter et al., 2002; Anisimov et al., 2004; Feodorova V.A., Corbel M.J., 2009; Feodorova, Motin, 2011); химические вакцины (Дальвадянц и др., 1990, 1997; Домарадский, 1993; Скатов, Хлебников, 1993; Хлебников и др., 1994; Жемчугов, 2004; Марданов, 2004; Волох и др., 2013; Corbel, Feodorova, 2009); рекомбинантные и ДНК-вакцины (Гремякова, 2004; Гинцбург и др., 2004, 2005; Девдариани, Федорова, 2006; Хаитов и др., 2007; Чубукова, 2008; Дробков и др., 2010; Книрель и др., 2011; Holm et al., 1980; Surcel et al., 1989; Sjostedt et al., 1990, 1992; Wolff et al., 1990; Sandstrom et al., 1992; Tang et al., 1992; Elkins et al., 1993; Fulop et al., 1995, 2001; Donnelly et al., 1997; Winter et al., 2002; Ivory et al., 2003; Chadee, 2004; Conlan, 2004; Luckay et al., 2007; Feodorova, Corbel, 2009; Corbel, Feodorova, 2011; Feodorova, Motin, 2011, 2012).

Таким образом, для современных профилактических препаратов важна как иммуногенность, так и высокий уровень безопасности. Одним из современных способов влияния на микроорганизмы является метод фотодинамического воздействия (ФДВ). В литературе имеются данные об изменении популяционных характеристик и жизнеспособности бактерий после фотовоздействия (Кару и др., 1991; Страховская, 2010; Wilson et al., 1992; Ovchinnikov et al., 2000; Hablin, Hasan, 2004). На наш взгляд, применение щадящей инактивации микроорганизмов *in vitro* методом ФДВ перспективно для обеспечения повышения безопасности разрабатываемых профилактических препаратов, особенно против таких инфекций, как бруцеллез, туляремия и чума.

**Цель работы** - теоретико-экспериментальное обоснование методологии повышения безопасности вакцинных штаммов *Brucella abortus* 19 ВА, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ с использованием

фотодинамического воздействия и оценка ее эффективности по показателям безвредности, остаточной вирулентности и реактогенности.

### **Задачи исследования**

1. Разработать фундаментальные основы новой методологии повышения безопасности живых вакцин из штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *Y. pestis* EV НИИЭГ.

2. Создать лабораторную установку для инактивации бактерий методом фотодинамического воздействия.

3. Провести модельные эксперименты по фотодинамической инактивации бактерий на примере *E. coli* разных штаммов и *P. aeruginosa* 27533 на созданной лабораторной установке; определить колониеобразующую способность этих бактерий в различных условиях фотоинактивации.

4. Исследовать закономерности взаимодействия бактериальных взвесей *E. coli* и *P. aeruginosa* разных штаммов с оптическим излучением путем математического моделирования, создания моделей и идентификации их параметров при последующих экспериментальных исследованиях в системах *in vitro*. Построить статистическую модель влияния синглетного кислорода, образованного в ходе фотодинамического воздействия, на взвесь бактериальных клеток для оценки степени инактивации.

5. Изучить колониеобразующую способность, культурально-морфологические и тинкториальные свойства разных штаммов бактерий *E. coli*, *P. aeruginosa* после фотодинамической инактивации в режимах, полученных в результате компьютерных вычислений с использованием предложенных моделей.

6. Провести инактивацию бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ по разработанной методологии; оценить влияние различных условий фотодинамического воздействия на их жизнеспособность; разработать математические модели взаимодействия при различных условиях на основе компьютерного моделирования.

7. Провести сравнительный анализ колониеобразующей способности, культурально-морфологических, тинкториальных и серологических свойств бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *Y. pestis* EV НИИЭГ до и после фотодинамического воздействия с использованием разработанной методологии.

8. Изучить безвредность, остаточную вирулентность и реактогенность вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после фотодинамической инактивации на морских свинках общепринятыми регламентированными методами.

9. Оценить на тканевом и организменном уровнях реактогенность вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после фотодинамического воздействия методами спекл-микроскопии и спекл-имиджинга с использованием разработанной компьютеризированной установки, включающей стандартную биосистему (микроорганизм-лабораторное животное).

### **Научная новизна**

Впервые разработана методология повышения безопасности живых вакцин путем фотодинамической инактивации бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ с предварительной разработкой для каждого штамма математической модели условий воздействия.

Экспериментально доказана возможность фотодинамической инактивации взвесей бактерий *E. coli* разных штаммов, *P. aeruginosa* 27533, *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ на оригинальной установке.

Изучены закономерности взаимодействия взвесей бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa* разных штаммов с оптическим излучением на основе математического моделирования и создания статистических моделей, параметры которых были идентифицированы в экспериментальных исследованиях *in vitro*.

Построена статистическая модель влияния синглетного кислорода, образованного в ходе фотодинамического воздействия, на взвесь бактериальных клеток, позволяющая оценить степень их инактивации.

Доказано, что эффективная инактивация происходит при обработке бактериальных взвесей в концентрации  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл световыми диодами с длиной волны  $\lambda = 650 \pm 10$  нм, плотностью мощности излучения  $1 \text{ мВт/см}^2$  и концентрацией фотосенсибилизатора метиленового синего 0,005 %.

Установлена полная потеря жизнеспособности клеток *E. coli* В6, *E. coli* О1, *E. coli* К12 после 60 мин фотодинамического воздействия, вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА – после 180 мин и *F. tularensis* 15 НИИЭГ – после 360 мин, что подтверждено отсутствием колониобразующей способности на питательных средах. При этом выявлено сохранение комплекса антигенов, определяемых коммерческими диагностическими препаратами, у бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

В экспериментах на морских свинках доказаны безвредность, отсутствие остаточной вирулентности и снижение реактогенности бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, инактивированных методом фотодинамического воздействия. После подкожного введения морским свинкам указанных вакцинных штаммов отмечено: 100% выживаемость животных, сохранение исходных значений массы и температуры тела, отсутствие необратимых изменений внутренних органов и тканей.

Разработаны научно-методические основы применения стандартной биосистемы (микроорганизм – лабораторное животное) для оценки реактогенности вакцинных штаммов на тканевом и организменном уровнях с помощью компьютеризированных лазерных установок методами спекл-микроскопии и спекл-имиджинга. Впервые проведена оценка реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после фотодинамической инактивации в экспериментах на морских свинках когерентно-оптическими методами.

Показана неинвазивность использованных когерентно-оптических методов. Установлено, что фотоинактивированные клетки вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ при аппликации на брыжейку морской свинки приводят к выраженным, но обратимым изменениям скорости кровотока в сосудах. Изменений топологии церебральных сосудов в течение 40 мин после введения указанных бактерий не зарегистрировано.

В результате проведенных исследований с использованием регламентированных и когерентно-оптических методов доказана безопасность фотоинактивированных вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ на морских свинках.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные данные вносят существенный вклад в разделы фундаментальной микробиологии, связанные с пониманием механизмов инактивации бактериальных клеток при действии оптического излучения, а также имеют значение для прикладной микробиологии в аспекте разработки методологических подходов повышения безопасности профилактических препаратов или против бактериальных инфекций.

Предложен новый способ инактивации бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, повышающий безопасность бруцеллезной и туляреминой вакцин. Создана и запатентована лабораторная установка для инактивации микроорганизмов методом фотодинамического воздействия (патент Российской Федерации на полезную модель. - № 77278, 2008 г.). Конструкция установки позволяет менять режимы фотоинактивации бактерий.

Построена статистическая модель влияния синглетного кислорода, образованного в ходе фотодинамического воздействия, на бактериальные клетки, с помощью которой впервые определена область эффективного воздействия синглетного кислорода на клеточную мембрану бактерий, близкую к диаметру клетки.

Разработаны математические модели взаимодействия взвесей бактерий *E. coli.*, *P. aeruginosa* разных штаммов, *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ с оптическим излучением и идентифицированы их параметры. С использованием компьютерного моделирования установлены наиболее эффективные условия фотодинамической инактивации бактерий и проведена верификация найденных условий в эксперименте.

Показана возможность использования стандартной биосистемы (микроорганизм – лабораторное животное), включенной в состав компьютеризированных лазерных установок, для оценки реактогенности бактерий *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ (до и после фотодинамической инактивации) на тканевом и организменном уровнях.

Материалы диссертации включены в Методические рекомендации по фотоинактивации бактерий в соавторстве с Ульяновым С.С., рекомендованные для студентов и аспирантов, при изучении микробиологии, биотехнологии, экологической токсикологии (Саратов, 2009).

Теоретические и практические результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, используются при чтении лекций по микробиологии студентам ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

### **Методология и методы исследования**

Методологической основой послужили труды отечественных и зарубежных ученых по вопросам поиска способов создания безопасных вакцин, не содержащих живые микробные клетки, применения лазерного излучения в микробиологии. Основу диссертационного исследования составляют системный подход в изучении рассматриваемой проблемы и комплексный анализ.

При проведении исследования и изложении материала автор применял общенаучные и специальные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, микробиологические, биологические, биохимические, серологические,

компьютерного моделирования, математического анализа. Использование перечисленных методов и статистический анализ экспериментальных данных обеспечили объективность и достоверных полученных результатов и выводов.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Разработана методология повышения безопасности живых вакцин путем фотодинамической инактивации бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ с предварительной разработкой для каждого штамма математической модели условий воздействия.

2. Применение созданной лабораторной установки для инактивации микроорганизмов методом фотодинамического воздействия в различных режимах позволяет получать в результате одного сеанса препаративное количество стерильной бактериальной взвеси; которую можно использовать для оценки колониеобразующей способности, культурально-морфологических, серологических и биохимических свойств клеток.

3. Область эффективного воздействия синглетного кислорода, образованного в ходе фотодинамического воздействия, на бактерии близка к диаметру клетки, что подтверждено на оригинальной модели влияния синглетного кислорода на бактериальные клетки.

4. Оптимальными условиями фотодинамической инактивации бактерий разных штаммов *E. coli*, вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ на созданной лабораторной установке являются использование: бактериальных взвесей концентрацией  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл; фотосенсибилизатора метиленового синего на уровне 0,005 %; световых диодов с длиной волны излучения  $650 \pm 10$  нм и плотностью мощности излучения порядка  $1 \text{ мВт/см}^2$ .

5. Потеря колониеобразующей способности клеток вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ происходит соответственно через 3 и 6 ч в условиях оптимальной фотодинамической инактивации.

6. У бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ после фотодинамической инактивации сохраняются антигенные структуры, специфически детектируемые коммерческими иммуноглобулиновыми эритроцитарными диагностикумами.

7. Фотоинактивированные вакцинные штаммы *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ являются безвредными и не имеют остаточной вирулентности, что подтверждено регламентированными методами на морских свинках.

8. Для оценки реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после фотодинамической инактивации могут быть эффективно использованы когерентно-оптические методы, включающие стандартную биосистему; доказана полная неинвазивность предложенных методов.

#### **Апробация результатов исследования**

Основные положения диссертационной работы представлены и обсуждены на: 6th International Conference on Correlation Optics (Ukraine, 2004); Complex Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics II (USA, 2005); Optical Technologies in Biophysics and Medicine VI (Saratov, 2005); 7th International Conference on Correlation Optics, (Ukraine, 2006); Optical Technologies in Biophysics and Medicine VII, (Saratov, 2006); Complex Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics III (USA, 2006); Международной научно-практической конференции «Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных» (Ульяновск, 2006); NIAID Research Conference (Croatia, 2006), 4-й Международной конференции, посвященной 85-летию Санкт-Петербургского НИИЭГ имени Пастера и 120-летию Парижского института Пастера (Санкт-Петербург, 2008); 7th International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine (China, 2008); German-Russian Forum Biotechnology GRFB'09 (Russia, 2009); Международном рабочем совещании «Инновационные подходы в профилактике и лечении зооантропонозных и метаболических болезней животных и человека в Саратовской области» (Саратов, 2009); Международной конференции «Современные проблемы инфекционной



патологии человека» (Минск, 2010); международной научно-практической конференции «От теории – к практике: вопросы современной ветеринарии, биотехнологии и медицины» (Саратов, 2011); 3-й научно-практической конференции с международным участием «Инфекции, обусловленные иерсиниями: Микробиология, эпидемиология, клиника, лабораторная диагностика» (С.-Петербург, 2011); 5th Annual Global Vaccine Congress (USA, 2011); 10th ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting (USA, 2012); Saratov Fall Meeting 2012: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIV; and Laser Physics and Photonics XIV (Саратов, 2012); World Congress on Biotechnology, Leonia International Convention Centre (India, 2012); 5th congress of European microbiologists, FEMS (Germany, 2013); Harbor Asia Conference Yersinia 11: the 11th international /1 symposium on Yersinia (China, 2013); научных конференциях ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова» (Саратов, 2004–2013).

### **Личный вклад автора**

Автором самостоятельно проведен анализ литературных источников, теоретическое обоснование проблемы, постановка и решение основных задач исследования, систематизация, обобщение и интерпретация полученных результатов. Экспериментальные исследования проведены автором лично или в составе научных групп при выполнении НИР. Основные положения диссертации, новизна и практическая значимость сформулированы совместно с научным консультантом.

**Работа выполнена** в ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова». Исследования были проведены на кафедре микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»; в ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»; в научной бактериологической лаборатории научно-исследовательской части ФГБОУ ВПО «Саратовский

государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» (при поддержке грантов РФФИ: 01-04-49023-а. Исследование условий появления биоспеклов в живых системах, 2001–2003; 02-15-99426-м. Изучение фундаментальных основ взаимодействия лазерного излучения с тканями и биологическими жидкостями организма человека и животных, разработка и совершенствование когерентно-оптических методов оценки функционального состояния живых систем, 2002–2004; 04-04-48279-а, Изучение процессов взаимодействия динамических биоспеклов с живыми системами, 2004-2006; гранта Президента РФ Изучение фундаментальных основ взаимодействия лазерного излучения с живыми системами, 2002–2004; грантов CRDF: NSTM RUB1-570-SA-04. Исследование кооперативных и нелинейных явлений при распространении света в мезоскопических средах применительно к разработке диагностических технологий в биологии, медицине и промышленности, 2006–2007; Разработка оптических методов и средств контроля параметров микро- и макроструктуры биологических сред, 2011–2014; Государственных контрактов: Разработка методологии создания и тестирования новых профилактических препаратов с использованием динамических лазерных спеклов, 2006; Разработка когерентно-оптических биосенсоров на генетическом, клеточном и организменном уровнях организации, 2012–2013; НИР: Федерального агентства по образованию № 1.4.09, Исследование взаимодействия оптического излучения с биологическими тканями и разработка когерентно-оптических и спектральных методов медицинской диагностики и фототерапии, 2009–2010; Оптические методы диагностики нано- и мезоскопических сред. В рамках Аналитической ведомственной целевой программы № 2.1.1/4989, Развитие научного потенциала высшей школы, 2009–2010); в ГНУ Саратовском научно-исследовательском ветеринарном институте Россельхозакадемии (при поддержке проектов: *BII/ISTC # 3853*. Живые бактериальные вакцины: сравнительный анализ иммунного ответа человека и биомоделей, совместно с Техаским Университетом, США, Университетом Чикаго и Национальным институтом биологических стандартов и контроля, Великобритания, 2008–2011;

НИИ/ВТЕР/ISTC #3846. HDTRA 1-11-1-0032. Понимание человеческого иммунитета к чуме, совместно с университетом Техаса, Медицинское Отделение в г. Галвестон, субконтракт No. 11-082, США, 2011–2015); и в ведущей лаборатории биомедицинской фотоники университета науки и технологий Министерства образования Китая, г. Ухань, провинция Хуажонг (при поддержке грантов РФФИ: 03-04-39021-ГФЕН\_а. Использование оптических спекл-полей в диагностике, лечении и профилактике заболеваний, 2003–2005; 06-04-39016-ГФЕН\_а. Методы спекл-имиджинга и их использование в исследованиях головного мозга, 2007–2008).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликованы 69 работ, из них 25 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и 1 патент.

**Структура и объем диссертации.** Работа состоит из введения; обзора литературы; собственных исследований, включающих описание объектов, материалов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, а также заключения, выводов, списка литературы. Диссертация изложена на 289 страницах, содержит 15 таблиц, 111 рисунков. Список литературы включает 337 работ.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА, ТУЛЯРЕМИИ, ЧУМЫ

#### 1.1. Классификация вакцин против бактериальных инфекций

Основоположником вакцинации считается Эльберт Дженнер (1749-1823), хотя известно, что чуть раньше в России втирание гноя из чумных бубонов от переболевших предлагал использовать для создания невосприимчивости к чуме русский врач Данила Самойлович (Жуков-Вережников, 1940; Федоров с соавт., 1955). Безусловно, такой метод защиты от инфекций в то время принят не был. Термин "вакцина" был предложен Луи Пастером в честь Э. Дженера, который в 1796 г. ввел 8-ми летнему мальчику содержимое пустулы, полученное от больной коровьей оспой молочницы. Э. Дженер доказал, что после прививки ребенок стал невосприимчивым к натуральной оспе. Впоследствии этот метод получил признание и широкое распространение в странах Европы, а затем и во всем мире. Следует отметить, что Э. Дженер предложил проведение прививок тогда, когда вирусы и бактерии еще не были открыты. Во второй половине XIX века, почти через сто лет, французским ученым Луи Пастером (1822-1895) было доказано, что вакцинация является универсальным способом предупреждения инфекционных заболеваний. Он создал три вакцины: одну (1895) для лечения бешенства у людей, укушенных инфицированными животными, две другие – для профилактики ветеринарных инфекций: куриной холеры (1880) и сибирской язвы (1884) (Медуницин, 2004; Зверев, 2006; Вакцины и вакцинация, 2011).

Предотвращение распространения инфекций с помощью иммунизации, без сомнения, является одним из величайших достижений человечества в области

медицины. Известно, что бóльшая часть населения в Древней Греции и Риме погибла во время эпидемий чумы, а не только в результате войн. Миллионы людей умерли в XIV веке во время пандемии чумы. Так, в Европе в период с 1346 по 1348 годы умерли 25 миллионов человек, что составляло третью часть населения (Зверев, 2006). В настоящее время вакцины ежегодно предотвращают до трех миллионов смертей. В XX столетии средняя продолжительность жизни людей увеличилась примерно на 30 лет, т.е. почти в два раза, что в немалой степени обусловлено массовой вакцинацией (Vaccine manufacturing, 2006).

По современной классификации различают живые, убитые (инактивированные), химические и рекомбинантные вакцины (Методические указания ..., 2004).

Живые вакцины изготавливают на основе штаммов живых бактерий, аттенуированных в искусственных или естественных условиях. Несомненным положительным свойством живых вакцин является содержание полноценного набора антигенов возбудителя, что обеспечивает развитие относительно длительной невосприимчивости привитого организма даже после однократной иммунизации. При введении живых вакцин в организм животных или человека происходит размножение бактерий, генерализация инфекции, стимулирующих выраженный иммунный ответ. Вакцинальный процесс отличается от инфекционного «доброкачественным» течением и не сопровождается у большинства привитых людей и животных типичной клинической картиной заболевания. Считается, что по напряженности поствакцинальный иммунитет, индуцированный живой вакциной, близок к постинфекционному. Выпускают живые вакцины в лиофилизированном виде без содержания консервантов (Методические указания ..., 2004; Ада, 2002; Медуницын, 2004; Петров, Хаитов, 2011).

В настоящее время отмечают ряд недостатков живых вакцин, несмотря на многолетнее и эффективное их применение. Одним из них является их относительно более высокая реактогенность по сравнению с другими видами вакцин. Размножение и персистенция бактерий вакцинного штамма в привитом организме в определенных

условиях, например, на фоне ослабления организма в период заболевания ОРВИ, у лиц с иммунодефицитными состояниями, такими как СПИД, опухоли, алкоголизм, наркомания, иммуносупрессивная терапия, послеоперационные больные и др. способны вызвать функциональные и морфологические изменения, выходящие за пределы физиологических колебаний. Существует определенная вероятность реверсии аттенуированного штамма в вирулентную форму. Кроме того, необходим тщательный биологический контроль качества живых вакцин на всех этапах производства; проверка стерильности. Транспортировка и хранение требуют строгого соблюдения «холодовой цепи», так как при несоблюдении температурного режима нарушаются физико-химические свойства живых вакцин (Медуницын, 2004; Петров, Хаитов, 2011).

Тем не менее, несмотря на имеющиеся недостатки живых вакцин и риски, связанные с их использованием, в РФ и СНГ достаточно успешно применяются следующие бактериальные вакцины отечественного производства: бруцеллезная, туляремиальная, чумная, а также туберкулезная БЦЖ и БЦЖ-М, сибиреязвенная СТИ (Гапачко с соавт., 1986; Медуницын, 2004).

Другим видом вакцин являются инактивированные (убитые) – корпускулярные вакцины, представляющие собой бактерии, инактивированные химическими, физическими или обоими факторами вместе. Для их приготовления могут быть использованы вирулентные или аттенуированные штаммы микроорганизмов (Методические указания, 2004). Инактивируют бактерии путем нагревания, обработкой формалином, ацетоном, спиртом, которые обеспечивают надежное обезвреживание и минимальное повреждение структуры антигенов. Высушивание приготовленных вакцин обеспечивает высокую стабильность препаратов и снижает концентрацию некоторых примесей (формалина, фенола). Убитые вакцины являются более стабильными и безопасными по сравнению с живыми вакцинами, так как не способны вызывать реверсию вирулентности. Выпускают убитые вакцины как в

сухом (лиофилизированном), так и в жидком виде (Гапочко с соавт., 1986; Петров, Хаитов, 2001; Медуницын, 2004).

К недостаткам инактивированных вакцин следует отнести более низкую иммуногенность, по сравнению с живыми вакцинами, что связано с неспособностью убитых микроорганизмов к размножению в привитом организме. Кроме того, убитые вакцины считаются менее иммуногенными, поскольку инактивация все-таки приводит к повреждению структуры некоторых антигенов. Поэтому, зачастую, для повышения иммуногенности убитых вакцин требуются повторные введения, применение их в сочетании с адьювантами либо их введение в мельчайших капсулах, которые, медленно рассасываясь, способствуют депонированию и пролонгированию действия вакцины (Vaccine manufacturing, 2006). Химические компоненты, которые используют для инактивации бактерий или для повышения иммуногенности убитых вакцин могут увеличивать реактогенность. Кроме того, как правило, недостаточно хорошо известен биохимический состав убитых бактерий, и поэтому вакцинация может сопровождаться рядом побочных эффектов (Ulmer et al., 2006). Особенностью производства инактивированных вакцин является необходимость строгого контроля инактивации бактерий и соблюдения условий их хранения (Гапочко с соавт., 1986; Петров, Хаитов, 2011; Медуницын, 2004).

Ввиду недостаточно высокой иммуногенности и повышенной реактогенности инактивированные вакцины не нашли широкого применения (Гапочко с соавт., 1986). Тем не менее в РФ применяют убитые вакцины отечественного и зарубежного производства для профилактики брюшного тифа (Россия, Франция), лептоспироза (Россия) и коклюша (Россия, Франция) (Методические указания ..., 2004; Медуницын, 2004).

Исследования, направленные на создание высокоиммуногенных и в тоже время безопасных вакцин привели к конструированию химических вакцин. Ранее при изготовлении химических вакцин из микробной клетки извлекали компоненты, определяющие иммуногенный потенциал последней. С этой целью использовали

различные физико-химические методы. Как правило, эти вакцины не были гомогенными, содержали примеси отдельных органических соединений или комплексов, состоящих из белков, полисахаридов и липидов. В ряде случаев были использованы рибосомальные фракции микробов. Основным принципом получения химических вакцин являлось выделение протективных антигенов, которые должны были обеспечить развитие надежного иммунитета, и очистка этих антигенов от балластных веществ. Однако высокая степень очистки антигена снижала его иммуногенность. Для усиления иммуногенного действия таких вакцин применяли адьюванты - вещества, которые неспецифически усиливали иммунный ответ организма на введенные антигены. На практике использовали минеральные адьюванты, растительные, микробные (корпускулярные или субъединичные структуры, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы, липополисахаридобелковые комплексы), цитокины и пептиды с характерными свойствами цитокинов, синтетические вещества, препараты тимусного и костномозгового происхождения, а также сложные искусственные адьювантные системы. Химические вакцины считались менее реактогенными, их можно было вводить в больших дозах и многократно. Преимуществом химических вакцин, особенно сухих, являлась устойчивость к влиянию внешней среды, они могли применяться в различных ассоциациях, направленных одновременно против ряда инфекций. За время применения химических вакцин было выявлено, что в результате их введения происходили различные морфологические, биохимические изменения в месте введения и регионарных лимфатических узлах; возникали аллергические, местные или общие токсические реакции, обусловленные наличием примесей и добавок (адьюванты, консерванты и другие вещества), а также регистрировалось усиление сенсibilизирующих свойств вакцин. В связи с этим применяемые при вакцинации адьюванты должны были, также как и вакцины, проходить все стадии доклинических и клинических испытаний для определения их безвредности и эффективности. Несмотря на указанные недостатки, в нашей стране, достаточно



успешно, используют ряд химических вакцин, Российского и зарубежного производства, зарегистрированные в РФ: менингококковой, группы А и С (Россия, Франция); пневмококковой (Франция); гемофильной (Франция); холерной (Россия) и брюшного тифа (Россия, Франция) (Воробьев, Вассильев, 1969; Медуницын, 2004; Методические указания ..., 2004; Вакцины и вакцинация, 2011).

В настоящее время продолжается совершенствование традиционных технологий изготовления вакцин, и успешно разрабатываются новые направления с учетом достижений молекулярной биологии и генной инженерии. К вакцинам третьего поколения относятся рекомбинантные и ДНК-вакцины, основанные на технологии рекомбинантных ДНК. Их создают путем встраивания гена вирулентного штамма, кодирующего синтез протективного антигена, в геном безопасных бактерий. Стимулом к разработке и созданию вакцин третьего поколения послужили причины, обусловленные ограниченностью использования традиционных вакцин для профилактики ряда инфекционных заболеваний. Уже более 20 лет это направление активно развивается, являясь перспективным в биотехнологии создания безопасных и высокоэффективных вакцин. Направленная делеция детерминант вирулентности, лишает возможности спонтанного восстановления исходных свойств патогена, тем самым должна повысить безопасность рекомбинантных вакцин. При этом способность живого рекомбинантного микроорганизма размножаться ограниченное время на месте введения, обеспечивает возможность индуцировать выраженный специфический иммунный ответ на протективные антигены. В 2002 г. американские эксперты объединили результаты изучения 224 рекомбинантных вакцин, созданных для защиты от 78 микроорганизмов. После проведенных исследований на животных и в ограниченных клинических испытаниях, эффективными оказались только три препарата: вакцина против вирусного гепатита В, вакцина против болезни Лайма и генетически инактивированный коклюшный токсин. Твердое положение в прививочной практике заняла лишь рекомбинантная вакцина против гепатита В производства России, Франции, Бельгии, Кубы и Нидерландов. Рекомбинантных

вакцин против бактериальных инфекций пока нет (Методические указания ..., 2004; Медуницын, 2004; Вакцины и вакцинация, 2011; Глик., Пастернак., 2002).

Начиная с 1995 г., активно развивается новая область исследований, направленных на создание трансгенных растений (томаты, картофель и др.), продуцирующих протективные антигены инфекционных агентов вирусной и бактериальной природы, и использование их в качестве безопасных, дешевых и простых в применении «съедобных» вакцин (Шумный, 2001; Медуницын, 2004; Щелкунов, Щелкунова, 2008; Книрель, Федорова, Анисимов, 2011; Петров, Хаитов, 2011; Дайнеко, 2012).

Перспективными в настоящее время считаются ДНК-вакцины, принцип конструирования которых заключается в том, что в организм вводят ДНК (или РНК), кодирующую гены белков, к которым необходимо получить иммунный ответ. Такой подход позволяет индуцировать выраженный иммунный ответ как гуморальный, так и клеточный к широкому диапазону бактериальных и вирусных антигенов в опытах на различных животных моделях (Гинцбург с соавт., 2004, 2005; Хаитов с соавт., 2007; Чубукова, 2008; Wolff et al., 1990; Tang, Devit, Jonston, 1992; Ivory, Chadee, 2004; Luckay et al., 2007). Наибольшие успехи были достигнуты при генетической иммунизации грызунов, тогда как у крупных животных и людей ДНК-вакцины вызывают слабый или неустойчивый ответ даже после многократного введения больших доз ДНК-вакцин (Чубукова, 2008; Donnelly et al., 1997; Babiuk et al., 2003). Основные опасения при применении ДНК-вакцин связаны с отсутствием полного понимания многих сторон молекулярных механизмов их действия. До недавнего времени не исключалась возможность вертикальной передачи генов, риск интеграции в геном эукариотических клеток и, как следствие, индукция аутоиммунных патологических процессов, иммунологической толерантности, неопластической трансформации клеток хозяина и т.д. В настоящее время основной проблемой при использовании ДНК вакцин является вероятность возникновения системных патологических иммунных реакций в привитом организме. Очевидна

необходимость изучения биологической безопасности ДНК-вакцин, а также разработка национальных нормативных требований к проведению клинических испытаний и лицензирования ДНК-вакцин (Дробков с соавт., 2010).

Развитие геномики, протеомики, генетики, биоинформатики привело к новому подходу в создании вакцин, которое получило название «обратная вакцинология» (*reverse vaccinology*). Суть этого технологического процесса заключается, прежде всего, в отсутствии этапа культивирования микроорганизмов. Конструирование новой вакцины идет по пути от генома к его продуктам. Сначала устанавливают полную геномную последовательность патогена, затем проводится компьютерное моделирование всех поверхностных структур и на завершающем этапе синтез будущей вакцины (Петров, Хаитов, 2011).

Поскольку на территории России и в мире сохраняется нестабильная эпидемиологическая обстановка по ряду инфекционных заболеваний, необходим арсенал эффективных профилактических препаратов (Эпидемиологическая обстановка ..., 2011; Социально-экономическое положение России ..., 2012). Однако несмотря на бурное развитие новых и перспективных направлений в вакцинопрофилактике бактериальных инфекций, широкое практическое применение имеют лицензионные живые вакцины, как наиболее эффективные.

## **1.2. Состояние проблемы вакцинопрофилактики бруцеллеза, туляремии и чумы**

Бруцеллез (*brucellosis*) – хронически протекающая инфекционная болезнь животных и человека, наносящая большой экономический ущерб животноводству, который складывается из недополученного приплода (аборт у 60% животных), потери поголовья скота, яловости, снижения продуктивности, уменьшения продуктов питания, содержащих полноценные белки животного происхождения и больших затрат на карантинные мероприятия. Бруцеллез распространен на всех континентах с преимущественной заболеваемостью в странах с развитым

животноводством: Центральной и Южной Америке, Африке, в некоторых странах Азии и Европы, включая СНГ (Украина, Казахстан). В связи с социальной опасностью бруцеллез включен в список карантинных и особо опасных болезней (Сочнев, 1984; Григорьева, Улицкая, 1990; Скляр, Логинов, 2008).

Вызывают бруцеллез бактерии, объединенные под общим названием *Brucella*. По современной классификации Объединенного Комитета экспертов ФАО/ВОЗ по бруцеллезу род *Brucella* состоит из шести видов, которые подразделяются на ряд биоваров. Заболевания сельскохозяйственных животных и человека чаще вызывают *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella ovis* (Комитет экспертов ФАО/ВОЗ ..., 1986; Сборник санитарных и ветеринарных правил ..., 1996; Banai, Corbel, 2010).

Бруцеллез занимает первое место среди профессиональных заболеваний инфекционной и паразитарной этиологии. Основным источником инфекции для людей являются больные бруцеллезом сельскохозяйственные животные и животноводческая продукция. От человека к человеку заболевание не передается. Однако это продолжительное, трудно поддающееся лечению заболевание, поражает практически все органы и системы организма и, как правило, сопровождается хронизацией инфекционного процесса с нередкой последующей инвалидностью больного. По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно регистрируются около 500.000 случаев заболеваний человека бруцеллезом. В России бруцеллез, как самостоятельное заболевание, регистрируется более 80 лет. Естественная высокая восприимчивость людей, не определяется полом или возрастом, но зависит от видовой принадлежности возбудителя. Разные виды бруцелл обладают различной вирулентностью (Комитет экспертов ФАО/ВОЗ ..., 1986; Сборник санитарных и ветеринарных правил ..., 1996; Лабораторная диагностика ..., 2009; Banai, Corbel, 2010; Corbel, Feodorova, 2011). Эпизоотическая обстановка по бруцеллезу в РФ в 2012 г. оставалась напряженной. На территории РФ

за 11 мес. 2012 г выявлено 352 новых неблагополучных пункта по бруцеллезу КРС, заболело бруцеллезом 10146 голов КРС (Лямкин и соавт., 2013).

Учитывая, что культуры бруцелл в небольших количествах способны вызывать заболевания животных и человека, а также достаточно долго сохраняются в аэрозолях, бруцеллез рассматривают как потенциальный агент для создания биологического оружия (Corbel, 1985, 1989; Corbel, Hendry, 1985; Corbel, Feodorova, 2011).

Профилактика бруцеллеза включает комплекс ветеринарно-санитарных, хозяйственных и медико-санитарных мероприятий, конечной целью которых является ликвидация инфекции среди животных и прекращение заболеваний среди населения. Перечень общих профилактических мероприятий, обязательных для учреждений, должностных лиц и граждан Российской Федерации определен санитарными правилами СП 3.1.085-96 и Ветеринарными правилами ВП 13.3.1302-96 "Бруцеллез" (Носов, 1972; Авилов, 1977; Сборник санитарных и ветеринарных правил ..., 1996).

В настоящее время в мировой практике против бруцеллеза животных используют целый ряд вакцин. Живой сухой вакциной из штамма *B. abortus* 19 ВА иммунизировали животных с 1953 года в СССР, США и многих других странах мира. Однако многими исследователями (Глонти, 1973; Григорьева, Улицкая, 1990; Ляпина, 2004; Berman et al., 1980) доказано, что напряженность иммунитета, обусловленного введением этой вакцины, с течением времени быстро снижается. Кроме того, наличие в крови антител, выявляемых в серологических реакциях иммунизированных и больных животных, затрудняет определение эпизоотического статуса животных по бруцеллезу. С 1974 года и по настоящее время в России в комплексе противобруцеллезных мероприятий применяют живую сухую вакцину из штамма *B. abortus* 82, полученную профессором Салмаковым К.М. (1961) в Казанском ветеринарном институте (Салмаков, 1966). Она отличается от вакцины из штамма 19 слабыми агглютиногенными свойствами. Наряду с положительными качествами, вакцина из штамма 82 имеет и определенные недостатки, в частности,

она обладает абортотропными свойствами, что не позволяет прививать ее стельным коровам. Поэтому иммунизацию и ревакцинацию проводят молодняка и взрослого крупного рогатого скота.

Учеными Всероссийского государственного научно-исследовательского института контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов (ВГНКИ) были разработаны слабоагглютиногенные и неабортогенные вакцины, представляющие значительный интерес для практической ветеринарии, т.к. они могут быть использованы для иммунизации маточного поголовья скота независимо от сроков стельности. Шумилов К.В. с соавт. в 1998 г. в результате целенаправленной селекции получил живую вакцину из штамма *B. abortus* 75/79-AB. Но эта вакцина по иммуногенным свойствам уступает вакцине из штамма *B. abortus* 19 VA. В 1999 г. Калмыков В.В. и Шумилов К.В. создали инактивированную адьювант-вакцину против бруцеллеза крупного рогатого скота из штамма *B. abortus* KB 17/100. Представленные вакцины предназначены только для иммунизации КРС и не пригодны для введения другим сельскохозяйственным животным (Шумилов с соавт., 2008). Широкое применение в ветеринарии нашли корпускулярные инактивированные препараты «Аборлан», состоящий из инактивированных формалином клеток *B. melitensis* 53H38 (S-форма) и полидисперсного адьюванта; и «Абортокс», содержащий суспензию инактивированных формалином микробных клеток *B. abortus* 45/20 (R-форма) и полидисперсного адьюванта (Селиверстов, Шумилов, 2001; Corbel, Feodorova, 2011). В США, наряду с вакциной из штамма 19, для специфической профилактики бруцеллеза крупного рогатого скота и диких животных (бизоны, олени и др.) была предложена живая вакцина из штамма *B. abortus* RB51 (Olsen et al., 2002). В ряде европейских государств: Англия, Финляндия, Германия, Швеция, Норвегия, Дания, Чехословакия, Румыния, Швейцария, а также Япония – добились полной ликвидации бруцеллёза. Это связано как с особенностями содержания животных (стойловое или на огороженных пастбищах), что дает возможность легче управлять их здоровьем, так и с полным

уничтожением поголовья скота в случае заболевания бруцеллезом, что, в свою очередь, связано с отсутствием лицензированных безопасных бруцеллезных вакцин (Bergstrom e.a., 2003; Stukelj, 2003; Yumiko Imada, 2004; Al Dahouk et.al., 2005; Krkic-Dautovic et.al., 2006).

Что касается иммунизации людей против бруцеллеза, то с 1953 года и по настоящее время используется сухая живая вакцина из штамма *B. abortus* 19 ВА Российского производства (Сборник санитарных и ветеринарных правил ..., 1996). Недостатками вакцины являются непродолжительный (до 1 года) иммунитет у привитых людей, необходима ежегодная ревакцинация; у 43-50 % вакцинированных и ревакцинированных наблюдается гиперчувствительность; отмечены случаи возникновения поствакцинального бруцеллеза (Вершилова с соавт., 1975). Однако эта вакцина лицензирована, и за время ее использования были проиммунизированы сельскохозяйственные животные и привиты более 40 млн. человек в странах бывшего СССР, что, безусловно, привело к значительному сокращению заболеваемости бруцеллезом среди животных и людей, прежде всего среди профессиональных групп - работников ферм, молокозаводов и кожевенной промышленности и т.д. (Вершилова, Голубева, 1970; Вершилова, 1972; Салмаков, 2000; Шумолов и соавт., 2008; Corbel, Feodorova, 2011).

Туляремия – зоонозное природно-очаговое инфекционное заболевание, вызывается бактерией *Francisella tularensis* — по местности Туларе (Tulare) в Калифорнии, где она впервые выделена Дж. Мак-Коем и Ч. Чепиным в 1911г. от больных сусликов (McCoу, Chapin. 1912). Туляремия имеет широкое мозаичное распространение в Северном полушарии (исключая Англию) и, кроме США, была обнаружена в Канаде, Японии, Швеции, Норвегии, Австрии, Франции, Тунисе и России (Boyce, 1975; Ohara et al., 1987; Morner, 1992; Berdal et al., 1996; Stewart, 1996; Tarnvik, Sandstrom, Sjostedt, 1996). Однако в последнее время появились сообщения о выделении возбудителя в Турции, Югославии, Испании, Косово, Словакии и Швейцарии (Gurucova, 1997; Bachiller et al., 1998; Helvacı et al., 2000; Wicki et al.,

2000; Reintjes et al., 2002). В России туляремия впервые официально зарегистрирована в 1926 году в низовьях Волги, у Астрахани. Однако специалисты полагают, что существовала она значительно раньше, но диагностировалась как легкая, «амбулаторная» форма чумы. Сегодня в Российской Федерации туляремия обнаружена на территории практически всех субъектов, кроме Тувы и Амурской обл. (Олсуфев, 1975).

В настоящее время род *Francisella* включает два вида - *Francisella tularensis* и *Francisella philomiragia*. Вид *F. tularensis* представлен четырьмя подвидами – *F. tularensis subsp. tularensis* (тип А), *F. tularensis subsp. holarctica* (тип В), *F. tularensis subsp. mediasiatica* и *F. tularensis subsp. novicida*. Эти подвиды отличаются друг от друга по вирулентности, по месту выделения в различных регионах мира, но имеют сходную антигенную структуру (Broekhuijsen et al., 2003; Sjostedt, 2003; Titball et al., 2003; Johansson et al., 2004; Svensson et al., 2005). Наиболее вирулентными являются изоляты возбудителя *F. tularensis subsp. tularensis*, распространенные в Северной Америке, хотя имеются сообщения о выделении штаммов этого подвида и в Европе (Gurycova, 1998).

Эпизоотические и эпидемиологические особенности туляремии связаны с естественной зараженностью её возбудителем около 125 видов животных от амебы до человека, но преимущественно представителей отряда грызунов. Инфицированные грызуны сохраняют возбудителя в кровяном русле в течение стадии септицемии и вплоть до их гибели от этой инфекции, кровососущие насекомые – в течение 2 недель, клещи – пожизненно. Природные очаги туляремии характеризуются исключительной стойкостью, что связано с постоянным обменом возбудителем между кровососущими насекомыми и животными – их прокормителями (Олсуфьев, 1970, 1975; Boyce, 1975; Morner, 1992; Berdal et al., 1996; Tarnvik, Sandstrom, Sjostedt, 1996; Ellis J. et al., 2002).

Возбудитель туляремии передается человеку трансмиссивным, контактным, оральным и аспирационным путем. Смертельный исход для человека от туляремии



практически исключен, однако не следует недооценивать опасность этого заболевания. Возбудитель туляремии входит в перечень патогенных биологических агентов, которые могут быть использованы в качестве биологического оружия. Согласно классификации А.А. Воробьева (2001), возбудитель туляремии включен в I группу биоагентов. 100% восприимчивость человека к инфекции, длительное и тяжелое течение, медленное выздоровление, а так же хронизация процесса, снижение трудоспособности делают это заболевание очень серьезным противником. Хотя все же туляремия стоит на 3 месте по опасности среди бактериальных инфекций (после чумы и сибирской язвы), недооценивать ее поражающие возможности не стоит (Воробьев, 2002 а, б). Реальная возможность применения противником биологического оружия в локальных войнах, вооруженных конфликтах или при террористических актах является серьезной проблемой для любой страны (Воробьев, 2001; Мельниченко, Огарков, Лизунов, 2006; Лобзин и др., 2001; Онищенко и др, 2007; Cronquist, 2004; Tomioka et al., 2005). Для решения проблемы национальной биологической безопасности издан Указ Президента Российской Федерации № 2194 от 4.12.2003 г., определяющий основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2010 года и дальнейшую перспективу. Учитывая высокую инфекциозность возбудителя туляремии при минимальной заражающей дозе, длительную утрату трудоспособности инфицированных людей, его значительную устойчивость в окружающей среде, способность к эпидемическому распространению и др., возбудитель был включен в «Перечень возбудителей (патогенов) человека, животных и растений, генетически измененных микроорганизмов, токсинов, подлежащих экспортному контролю в целях защиты национальных интересов и обеспечения выполнения международных обязательств Российской Федерации, вытекающих из Конвенции о запрещении разработки, производства и пополнения запасов бактериального (биологического) и токсинного оружия и об их уничтожении» (Указ Президента РФ №1004 от 8.08.2001).

Рост заболеваемости людей туляремией наблюдается в годы повышения численности грызунов. Болеют преимущественно сельские жители, заражающиеся в бытовых или производственных условиях. Известны и лабораторные заражения туляремией (Приказ Минздрава РФ № 125, 1999). Наибольший подъем заболеваемости туляремией в России за предшествующий 40-летний период отмечен в 2005 году, зарегистрирован 881 больной. Наибольшее число заболевших было в Московской, Рязанской, Нижегородской, Владимирской, Воронежской и Свердловской областях. В г. Москве отмечено 230 случаев. Несмотря на то, что в последние годы в России заболеваемость туляремией находится на спорадическом уровне, она не только не снижается, но и проявляет тенденцию к нарастанию (Мещерякова и др., 2005; Онищенко и др., 1999; Онищенко, 2001; Покровский, 2001; Домарадский, 2005). Ежегодно в РФ диагностируется от нескольких десятков до сотен случаев заболевания людей, при этом 75% приходится на Северный, Центральный и Западно-Сибирский регионы России. В январе-декабре 2010 г. зарегистрировано 115 случаев туляремии (в 2009 г. – 57) на территории 23 субъектов Российской Федерации. Показатель заболеваемости составил 0,08 на 100 тыс. населения, что в 2 раза больше за аналогичный период 2009 г. Напряжённая эпидемиологическая ситуация по заболеваемости туляремией сложилась и в Архангельской области (Ющук, Кареткина, 2005; Марьяновская с соавт., 2007; Аналитическая справка, 2010 г.). В августе-сентябре 2013 г. была объявлена чрезвычайная ситуация в Ханты-Мансийском автономном округе, которая связана с заболеванием туляремией более 900 человек. Согласно Постановлению № 9 от 25 августа 2013 года «Об усилении мероприятий по профилактике заболеваемости туляремией в Ханты-Мансийском автономном округе - Югре» Главного государственного санитарного врача по Ханты-Мансийскому автономному округу-Югре М.Г. Соловьевьевой было организовано проведение вакцинации против туляремии населения с охватом 100% кроме детей до 7 лет и лиц, имеющих противопоказания (за исключением населенных пунктов, расположенных на

территории Советского района). В Ранее в Ханты-Мансийском автономном округе активно проводили мероприятия по профилактики туляремии, так в 2008 году было привито 91994 человека. Затем число вакцинированных лиц стало снижаться, и в 2012 г привили 11362 человека. В результате значительного сокращения объемов вакцинации, произошло снижение иммунной прослойки населения до 16,3% (Постановление № 9, 2013).

Специфическую профилактику туляремийной инфекции проводят живой туляремийной вакциной из штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в плановом порядке населению, проживающему или работающему на территории с наличием активных природных очагов при 100%-ном охвате прививками лиц, за исключением детей до 7 лет и лиц, имеющих противопоказания к прививкам. Вакцинации подлежат лица с профессиональным риском инфицирования: охотники, рыболовы (и члены их семей), пастухи, полеводы, мелиораторы, оленеводы, а также лица, направляемые на временную работу: геологи, строители и т.п. На территориях с малоактивными природными очагами туляремии, а также в городах, прилегающих к природным очагам, вакцинируют только группы риска, а именно: работников зерно- и овощехранилищ, сахарных заводов, элеваторов, мельниц, мясокомбинатов, комбикормовых заводов, спиртозаводов, предприятий по переработке сельскохозяйственных продуктов и сырья животноводческих и птицеводческих ферм, работающих с зерном, фуражом, сахарной свеклой и др., а также скотом, поступающим на переработку из энзоотичных по туляремии степных и луго-полевых очагов; лиц, принимающих и обрабатывающих шкурки промысловых зверьков, поступающих из энзоотичных по туляремии территорий. Обязательной вакцинации подлежит персонал отделов особо опасных инфекций центров госсанэпиднадзора, противочумных и научно-исследовательских учреждений, лабораторий и эпидотрядов, работающих с возбудителем туляремии или осуществляющих сбор и исследование мелких млекопитающих, членистоногих, объектов внешней среды из энзоотичных по туляремии территорий, а также подразделений различных служб,

проводящих дератизационные и дезинсекционные мероприятия. Внеплановую вакцинацию против туляремии проводят по эпидпоказаниям. Ревакцинируют через 5 лет лиц, прошедших плановое введение вакцины туляремийной живой и имеющих отрицательную аллергическую пробу с тулярином (Приказ Минздрава РФ № 125, 1999). Согласно Санитарным правилам 1996 г проводится также вакцинация лиц, выезжающих для проведения постоянных или временных работ на территории активных природных очагов туляремии: охотников, лесников, мелиораторов, геодезистов, торфоразработчиков, заготовщиков меховых шкурок (водяных крыс, ондатр, зайцев), геологов, членов научных экспедиций, лиц, направляемых на сельскохозяйственные, строительные, изыскательские и иные работы, туристов и др. (Сборник санитарных и ветеринарных правил ..., 1996).

Живая туляремийная вакцина считается одной из лучших в мире бактериальных вакцин. На Западе, в США и Канаде против возбудителя туляремии голарктического подвида – *F. tularensis subsp. tularensis*, используют вакцинный штамм *F. tularensis* LVS, который является дериватом штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (Gese, 1997). Однако при использовании этих вакцин был выявлен ряд недостатков: использование более 60-ти лет в постоянной практике живой туляремийной вакцины *F. tularensis* 15 НИИЭГ и её прототипа *F. tularensis* LVS привело к изменению свойств первоначально полученной вакцины и в значительной степени увеличило риск утраты вакцинного штамма. Высокая остаточная вирулентность вакцин на лабораторных животных (значение  $LD_{50}$  для мышей линии Balb/c составляет  $1 \times 10^3$  микробных клеток на животное) прямо связана с высоким процентом осложнений, возникающих при массовой иммунизации населения. При выращивании туляремийного вакцинного штамма на питательных средах популяция получаемых бактерий диссоциирует в R-форму *F. tularensis*, авирулентную для лабораторных животных и не формирующую защитного иммунитета против вирулентных штаммов туляремии (Горькова с соавт., 1981; Анисимова с соавт., 1982; Самойлова с соавт., 1987; Кисличкин, 2007).

Несмотря на отмечаемые побочные реакции на введение живой туляремийной вакцины (лихорадочные реакции, головная боль, лимфадениты и т. д.) и соответствующие противопоказания (аллергические и инфекционные заболевания, беременность, болезни кровообращения), более эффективного средства специфической профилактики на сегодняшний день не существует (Олсуфьев, Руднева, 1960; Sjostedt, 2003).

Чума, по классификации Е.Н. Павловского, относится к природно-очаговым зоонозным трансмиссивным болезням, носителями которой являются дикие грызуны, а переносчиками – блохи. Этиологическим фактором чумы является бактерия *Yersinia pestis* (*Y. pestis*), впервые описанная французским ученым А. Иерсеном (1863-1943) в 1894 г. (Домарадский, 1993; Анисимов, 2002; Лабораторная диагностика ..., 2009; Книрель, Федорова, Анисимов, 2011; Perry et al., 1997).

Эндемичные по чуме районы зарегистрированы в разных странах: Индии, Индонезии, Китае, Южной и Северной Америки, Африки, Содружества Независимых Государств (СНГ) и других (Приказ № 152, 2008; Книрель, Федорова, Анисимов, 2011; Jefferson et al., 1998). На территории стран СНГ существуют 42 природных очага чумы. В природных очагах заболевание регистрируется в виде спорадических случаев или разлитых эпизоотий в популяциях диких грызунов (Лабораторная диагностика ..., 2009). В 2010 г. общая площадь эпизоотий составила 37042 км<sup>2</sup>. Выделено 550 штаммов возбудителя. Из них на территории Российской Федерации в 2010 г. эпизоотии чумы выявлены в 4 природных очагах. Общая площадь эпизоотий составила 2042 км<sup>2</sup>, выделено 85 штаммов чумного микроба (Аналитическая справка, 2010).

К настоящему времени известно более 200 видов животных, болеющих чумой в природных условиях, в эпизоотический процесс могут вовлекаться второстепенные и случайные носители из числа грызунов и диких животных (часто промысловых), а также синантропные грызуны – крысы и мыши. Возбудитель чумы может проникать

из природных очагов в поселения синантропных грызунов (крысы, мыши), вызывая интенсивные эпизоотии в населенных пунктах (сурки, суслики, песчанки, полевки, бандикоты, южноамериканские хомяки, морские свинки и др.) и среди зайцеобразных (зайцы, пищухи). Заболеванию подвержены и домашние животные, а из сельскохозяйственных животных к чуме восприимчивы верблюды (Руководство по профилактике чумы, 1992; Лабораторная диагностика ..., 2009).

Распространение чумы среди животных определяет возможность заражения человека в природных очагах при укусе инфицированными блохами, контакте с больными и погибшими от чумы грызунами, при забое и разделке больных чумой верблюдов, при разделке тушек промысловых животных. Чума может передаваться от человека к человеку как антропонозное заболевание. При этом заражение может происходить воздушно-капельным путем, при контакте с трупами или вещами умершего человека либо трансмиссивным путем (Домарадский, 1993; Лабораторная диагностика ..., 2009).

Чума - острое инфекционное заболевание, которое характеризуется высокой летальностью и крайне высокой контагиозностью, поэтому относится к группе особо опасных инфекций. Заболевание протекает остро, с тяжелой формой интоксикации, лихорадкой, поражением лимфатических узлов, внутренних органов и не редко осложняется пневмонией, специфическим менингитом, сепсисом. При отсутствии лечения бубонной чумы, смертность составляет до 95%; легочная, септическая и менингеальная формы, практически всегда заканчиваются летальным исходом (Домарадский, 1993; Лабораторная диагностика ..., 2009). В Российской Федерации случаи заболевания чумой не регистрируются с 1979 г., однако ситуация осложняется практически ежегодной регистрацией этого заболевания в сопредельных государствах (Казахстан, Монголия, Китай). Это может привести к заносу чумы на территорию России, что обусловлено расширением транспортных, торговых, туристических, социально-экономических и историко-культурных связей, а также миграционными процессами, вызванными локальными межнациональными

и этническими военными конфликтами и неоднократным заносом специфического переносчика чумы - блох *Xenopsylla cheopsis* из стран юго-восточной Азии (Руководство по профилактике чумы, 1992; Письмо Федеральной службы... 2007; Приказ Федеральной службы № 152, 2008).

За последнее столетие, после длительного перерыва, отмечается рост заболеваемости чумой с начала 1990-х годов. Число заболевших ежегодно составляет до 2,5 тыс. человек без тенденции к снижению. Особенно рост заболеваемости выражен в странах Африки. В Америке существуют постоянно действующие природные очаги чумы в Боливии, Бразилии, Эквадоре, Перу и США. По данным ВОЗ в 2009 г. в Китае (провинция Цинхай) зарегистрирована вспышка легочной чумы. В 2010 г. наибольшее число случаев чумы отмечено в Демократической Республике Конго – 618 и на Мадагаскаре – 289, в Перу – 25, Китае – 12 и США – 7 (Супотницкий с соавт., 2006; Мировая статистика здравоохранения ВОЗ, 2010; Кутырев и соавт., 2011).

Опасность представляет потенциальная возможность использования возбудителя чумы в качестве агента при создании биологического оружия. Его применение в качестве средства биотерроризма, при распространении воздушно-капельным путем, может привести к многотысячным жертвам (Воробьев, 2002; Онищенко с соавт., 2007).

Для профилактики чумы проводят комплекс мероприятий: исключают завоз чумы из других стран (необходимо строгое соблюдение всеми странами международных санитарных правил), предупреждают возникновение заболеваний в энзоотических очагах (проведение дератизационно-дезинсекционных мероприятий), вакцинируют людей (Приказ № 152, 2008). В США, Европе и Австралии для иммунизации людей с 1946 года по 1998 год использовали три различных типа убитой USP вакцины. С 1998 г. эту вакцину перестали производить в связи с частыми поствакцинальными осложнениями, весьма сложной схемой иммунизации, высокой стоимостью. На территории России и стран СНГ с 1942 г. по настоящее

время для специфической профилактики применяют вакцину живую из аттенуированного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (Коробкова, 1956; Домарадский, 1993; Супотницкий с соавт., 2006; Girard, 1963; Anisimov et al., 2004; Feodorova, Corbel, 2009; Feodorova, Motin, 2011). За весь период использования вакцины EV НИИЭГ случаев реверсии вирулентности у привитых людей зарегистрировано не было. Однако живая вакцина, так же как и убитая, имеет ряд недостатков: создаваемый ею иммунитет считается относительно непродолжительным (не более 1 года), у вакцинируемых людей нередки случаи побочных реакций, которые вызваны, по всей вероятности, наличием высокотоксичного ЛПС чумного микроба (Руководство по профилактике чумы, 1992; Книрель с соавт., 2011). Перечисленные недостатки ограничивают контингент, подлежащий вакцинации. Иммунизируют группы максимального риска: медицинский персонал в очагах чумы, работников специализированных лабораторий, геологов, экологов, археологов и других лиц, которым по роду занятий предстоит находиться в природных очагах чумы и возможно контактировать с источниками инфекции (Сборник санитарных и ветеринарных правил ..., 1996). Тем не менее, в России и ряде стран СНГ уже более 70 лет для специфической профилактики чумы (людей и животных) успешно применяют живую чумную вакцину на основе аттенуированного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. Эта живая вакцина является единственным профилактическим противочумным препаратом, который лицензирован в нашей стране (Салтыкова, Файбич, 1975; Айкимбаев с соавт., 2003; Медуницын, 2004; Бывалов, Кутырев, 2011; Книрель с соавт., 2011; Russell et al., 1995; Titball, Williamson, 2004, 2001; Feodorova, Corbel, 2009; Feodorova, Motin, 2011 и др.).

Таким образом, из представленного материала, очевидно, что, только лицензированные у нас живые вакцины *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ остаются наиболее эффективным профилактическими средствами.



### **1.3. Способы повышения безопасности вакцин против бруцеллеза, туляремии и чумы**

Для предохранения человека от инфекционных заболеваний еще в древние времена использовали живых возбудителей болезней. Так, в Китае существовал метод защиты от оспы путем переноса содержимого оспенных пустул от больных здоровым людям. Затем этот метод стали использовать в Индии, Малой Азии, Европе. Такая прививка (вариоляция) была сделана в 1768 г. Екатерине II и ее сыну Павлу, которые впоследствии не болели натуральной оспой. Вместе с тем вариоляция часто заканчивалась возникновением острых форм заболевания и даже гибелью привитых людей. Русский ученый Данила Самойлович в 1781 г. впервые пытался вакцинировать людей против чумы, используя гной из бубонов больных людей. Так как прививки нередко приводили к смертельному исходу, они были запрещены. Тем не менее, Данила Самойлович внес большой вклад в историю профилактики чумы. Он первый в России и Европе предложил специфические прививки против этого заболевания, и высказал предположение о существовании микроба возбудителя чумы. Исторический опыт вариоляции показал возможность защиты от инфекционных заболеваний и необходимость поиска способов получения для этого безопасных микроорганизмов (Наумов, Ледванов, Дроздов, 1992).

В 1879 г. Луи Пастер оставил на длительное время в термостате без пересева культуру куриной холеры и затем обнаружил, что она утратила патогенные свойства и вызывала у кур не заболевание, а стойкий иммунитет. Ослабление патогенных свойств микробов под влиянием различных факторов (химическое воздействие, высушивание, нагрев, многократные пассажи на искусственных питательных средах и др.) Л. Пастер назвал аттенуацией, которая впоследствии стала широко применяться для получения живых вакцин. В дальнейшем, используя различные

методы аттенуации, были получены вакцинные штаммы бактерий против сибирской язвы, холеры, туберкулеза, бруцеллеза, туляремии и чумы (Майский, 1953; Баев, 1984; Медуницын, 2004).

В 40-80 гг. прошлого столетия для профилактики бруцеллеза животных и человека были предложены несколько аттенуированных штаммов в качестве вакцинных: *B. abortus* 19, *B. abortus* 82, *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* 19 D, *B. abortus* 104 M, *B. abortus* 84 C и др. Некоторые штаммы по уровню защиты превосходили вакцинный штамм *B. abortus* 19 ВА при вакцинации овец и коз. Однако их использование для вакцинации людей было непродолжительным, что связано с высокой остаточной вирулентностью штамма *B. melitensis* Rev-1; генетической нестабильностью штамма *B. abortus* 19 D; а штаммы *B. abortus* 104 M и *B. abortus* 84 C при подкожном введении, в ряде случаев, вызвали бруцеллезную инфекцию (Corbel, Feodorova, 2011). Совершенствование противобруцеллезных вакцин продолжается и в настоящее время. Так, в ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань) был отобран вариант штамма 82, чувствительный к пенициллину, - штамм *B. abortus* 82-ПЧ (Салмаков, Белозерова, 1994). Путём воздействия специфического бактериофага на культуру исходного вирулентного штамма получен штамм *B. abortus* R-1096 (Сафина и др., 2004). Живые вакцины из штаммов 82-ПЧ и R-1096 испытывались в производственных условиях на крупном рогатом скоте (Иванов и др., 2006). Позднее были получены живые вакцины из штаммов *B. abortus* KB 75/79-AB, *B. abortus* KB 13/100B (Шумилов с соавт., 2008). Несмотря на то, что эти вакцины превосходили по иммуногенным свойствам штаммы *B. abortus* 19 ВА и *B. abortus* 82, широкого применения они пока не получили. Это связано с тем, что запатентованные вакцины предназначены для вакцинации только крупного рогатого скота, не дают перекрестного иммунитета с другими видами бруцелл и не пригодны для иммунизации людей (Салмакова, 2010). За последние годы получен ряд штаммов *B. abortus*, устойчивых к различным антибиотикам - стрептомицину, рифампицину,

тетрациклину и др. Эти штаммы находятся в RS-форме, слабоагглютиногенны и обладают иммуногенными свойствами (Фомин и др., 2006).

В настоящее время в США для специфической профилактики бруцеллеза КРС и бизонов применяют рифампицин устойчивый вакцинный штамм *B. abortus* RB51. Для иммунизации людей он не подходит, потому что обладает устойчивостью к антибиотикам, высокой остаточной вирулентностью и не вызывает перекрестного иммунитета против *B. melitensis* и *B. suis*. Штаммы бруцелл с мутациями генов, кодирующих ферменты, участвующие в синтезе ЛПС, О-ПС или основного ПС, имели некоторый положительный эффект при иммунизации мышей и КРС. Однако их нельзя использовать для профилактики людей, т.к. нарушение синтеза ЛПС или О-ПС может привести к снижению протективных свойств данного штамма. Другие аттенуированные штаммы бруцелл, с мутациями по генам *bvr*, *cgs*, *dnaK*, *omp 10*, *omp 19*, *omp 25*, *virB*, *htrA* и *cyoL*, показали некоторую эффективность для отдельных видов КРС. В ходе дальнейших разработок был получен мутантный штамм *B. melitensis* WR201, но при аттенуации он утратил иммуногенность (Corbel, Feodorova, 2011).

Таким образом, для специфической профилактики бруцеллеза в России и странах СНГ широкое применение получили только вакцины из аттенуированных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *B. abortus* 82.

Большой вклад в изучение туляремийных вакцинных штаммов внесли советские ученые Н.А. Гайский, Б.Я. Эльберт, И. Н. Майский, О. С. Емельянова, Т. С. Тамарина, Р. А. Салтыков, В.П. Моторная, И.С. Тинкер и др. В период с 1943 по 1948 годы были проверены 19 вакцинных штаммов туляремии *F. tularensis* 15, *F. tularensis* 9, *F. tularensis* Ондатра IV, *F. tularensis* 6, *F. tularensis* 3, *F. tularensis* 10, *F. tularensis* 33 и др. Только *F. tularensis* 15 НИИЭГ, отвечал всем требованиям, предъявляемым в то время к вакцинным штаммам. Аттенуация вирулентного штамма была проведена путем длительных пассажей на искусственных питательных средах. В 1943 г. Н.А. Гайский предложил использовать этот штамм для вакцинации

людей против туляремии. Живую вакцину из штамма *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ используют в России и странах СНГ до настоящего времени (Олсуфьев, Дунаева 1970; Titboll, Oyston, 2009). За рубежом для вакцинации применяют штамм *F. tularensis* LVS, являющийся субкультурой в RS форме полученной из штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в начале 60-х годов (Eigelsbach, Downs, 1961).

В 2005 г. Кисличкиным Н.Н. и Кисличкиной О.И. (Россия) разработана новая живая туляремийная вакцина на основе штамма *F. tularensis* Nik-sp. (селекционный мутант), полученная из чистой линии бактерий R-формы *F. tularensis*. От вакцины из штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ ее отличает: способность формировать более длительный иммунитет, стабильность популяции, низкая остаточная вирулентность и технологичность производства. Предложено применение этой вакцины не только для здравоохранения в качестве живой туляремийной вакцины, взамен существующей *F. tularensis* 15 НИИЭГ или сохранение её как вакцины резерва. Но и для ветеринарии - использование в качестве живой туляремийной вакцины *F. tularensis* Nik-sp. для иммунизации животных особо ценных и редких пород (при их разведении), а также животных в заповедниках, зоопарках и т.д. Вакцина *F. tularensis* 15 НИИЭГ и её западный прототип *F. tularensis* LVS не могут использоваться для этих целей в силу их высокой остаточной вирулентности для большинства диких животных (Кисличкин, 2007). Но эта вакцина не была лицензирована и практического применения до настоящего времени не получила.

Таким образом, живая вакцина из аттенуированного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ остается единственной лицензированной вакциной, которую с 1943 г. и до настоящего времени используется для иммунопрофилактики туляремии на территории России и стран СНГ.

Впервые ослабленную культуру вирулентного штамма чумного микроба получил А. Иерсен в 1894 г. путем ее пересева на питательных средах. Полученная аттенуированная культура чумного микроба эффективно защищала лабораторных животных, даже крыс и обезьян от заражения чумой (Feodorova, Corbel, 2011).

Попытка создания живой аттенуированной вакцины была предпринята Kolle W. и Otto R. в 1903-1904 гг. (Kolle, Otto, 1903). Впервые иммунизировал людей П. Стронг, проведя испытания аттенуированной живой чумной вакцины MaV на морских свинках и обезьянах, иммунизировал в 1906 г. заключенных, приговоренных к смертной казни. Затем были привиты 900 жителей Филиппин. Эффективность вакцинации не удалось проверить, т.к. в течение нескольких лет отсутствовали эпизоотии чумы. Опасаясь реверсии аттенуированного штамма в вирулентную форму, иммунизацию вакциной MaV, прекратили (Жуков-Вережников, 1940; Книрель, Федорова, Анисимов, 2011; Feodorova, Corbel, 2011). В 1934 г. Л. Оттен провел иммунизацию людей ослабленной Tjiwidei (TJW) вакциной. Отмечалось снижение смертности, однако эта вакцина не защищала людей от легочной чумы (Otten L., 1936). E. Jawetz и K. Meyer провели сравнительную оценку некоторых живых вакцин (EV76, EV Saigon и EV Madagascar) в опытах на животных, а, иногда, исследуя результаты вакцинации людей в районах с высоким уровнем заболеваемости. Было показано, что иммуногенность и побочные реакции после введения этих вакцин варьируются у разных видов животных. В некоторых случаях у животных развивалась бубонная/септическая чума, отмечались летальные исходы, в связи с этим представленные вакцины не были лицензированы (Jawetz, Meyer 1943, 1944; Feodorova, Motin, 2011). Масштабным изучением живых вакцин в СССР начали заниматься с 1934 г. Покровская М.П., Жуков-Вережников Н.Н., Коробкова Е.И., Безсонова А.А., Туманский В.М., Ящук А.П., Фадеева Т.Д., Гинзбург Н.Н., Николаев Н.И., Файбич М.М. и др. (Коробкова, 1956; Руководство по профилактике чумы, 1992). Многими учеными была отмечена высокая эффективность именно живых вакцин. Вакцинные штаммы чумного микроба, отличающиеся иммунологическими свойствами, были получены разными методами: путем отбора старых лабораторных культур, в течение длительного времени пересевавшихся на питательных средах (например, штаммы *Y. pestis* TJW, *Y. pestis* EV76, *Y. pestis* 1 и *Y. pestis* 17); воздействием неблагоприятных условий культивирования (штамм

*Y. pestis* M-11-40) или бактериофагом на растущие культуры (штамм АМП, ЖЕР, 46-S) (Наумов, Ледванов, Дроздов, 1992; Домарадский, 1993). Сравнительное изучение вакцинных штаммов показало, что наиболее стабильным, безвредным и иммуногенным оказался типичный штамм чумного микроба, потерявший свою вирулентность, - *Y. pestis* EV 76. Этот штамм был получен Ж. Жираром и Дж. Робиком в 1926 г. путем ежемесячных пассажей на искусственных питательных средах (при температуре 18-25 °С) в течение 6 лет. Несомненным достоинством штамма EV 76 как вакцинного является то, что он вызывал антибактериальный и антитоксический иммунитет (Burrows, 1963). Различными субкультурами вакцинного штамма *Y. pestis* EV были привиты более 10 млн. человек в разных странах мира. В 1936 г. субкультура вакцинного штамма EV 76 была передана в СССР в противочумный институт «Микроб» (г. Саратов) и в научно-исследовательский институт эпидемиологии и гигиены (аббревиатура НИИЭГ, г. Киров). Штамм, хранившийся в институте «Микроб» утратил свою иммуногенность, в связи с чем его использование в качестве вакцинного стало невозможным. Штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ с 1942 г. применялся для специфической профилактики против чумы в СССР, а теперь - в РФ и странах СНГ. Однако Домарадский И.В. в монографии (1993) отметил, что недостатками этого штамма являются потеря иммуногенности в результате частых пересевов на искусственных питательных средах, высокая реактогенность, т.к. имеет место «остаточная вирулентность», отсутствие защиты от заболевания легочной чумой и необходимость ревакцинации (через год) (Руководство по профилактике чумы, 1992; Книрель, Федорова, Анасимов 2011; Feodorova, Corbel, 2009). С 1953 по 1959 гг. в качестве живой вакцины против чумы была предложена бивалентная вакцина *Y. pestis* 1-17. Несмотря на то, что эта вакцина превосходила EV НИИЭГ в экспериментах на животных, для иммунизации людей ее не использовали, и практического применения она не получила (Pollitzer, 1966). В 1960-70 гг. для повышения безопасности были предложены аттенуированные варианты из

вирулентных глицерин-позитивных штаммов *Y. pestis* К-1, К-2, 142 и 586, превосходившие по иммуногенности штамм EV НИИЭГ, но лишь в экспериментах на мышах (Feodorova, Motin, 2011).

Другим способом, с помощью которого пытались защитить животных и человека от патогенных микроорганизмов, было создание вакцин на основе убитых бактериальных культур. У истоков современных технологий создания инактивированных вакцин стоял Г. Рамон, который предложил в 1923 г. для обеззараживания дифтерийного и столбнячного токсинов обрабатывать их формальдегидом при 37 °С (Вакцины и вакцинация ..., 2011). Для профилактики бруцеллеза использовали вирулентные штаммы *B. abortus* инактивированные нагреванием, фенолом, диэтиловым эфиром. Такие вакцины индуцировали у людей весьма непродолжительный иммунитет и не защищали от заражения бактериями штаммов *B. melitensis* и *B. suis*. Иммунизацию животных проводят вакцинами, которые состоят из бактериальных суспензий и полидисперсного адьюванта. Входящие в вакцины штаммы *B. melitensis* 53Н38 (S-форма) или *B. abortus* 45/20 (R-форма) инактивировали формалином. Ввиду реактогенности эти вакцины не приемлемы для профилактики людей и сельскохозяйственных животных против бруцеллеза (Corbel, Feodorova, 2011).

Для профилактики туляремии вакцину из убитых вирулентных бактерий пытались получить ученые в США, Японии, СССР. В СССР Н.А. Гайский и Б.Я. Эльберт инактивацию туляремиальных бактерий проводили формалином, фенолом, прогреванием, обработкой водным раствором нитрита натрия и уксусной кислоты. Однако какими бы способами туляремиальные бактерии не инактивировали, микробы с утратой патогенных свойств, теряли также и иммуногенность. Стойкого и продолжительного иммунитета против туляремии они не вызывали (Майский, 1953).

Профилактические препараты против чумы были предложены как из убитых клеток вирулентных штаммов (вакцины цельноклеточные), так и из отдельных компонентов микробной клетки. Эти вакцины получали путем нагревания или при

химическом воздействии путем добавления фенола, формальдегида, глицерина, сахарозы и т.д. Основными преимуществами убитых вакцин являлись их безопасность, быстрое развитие иммунитета к бубонной чуме, а также возможность использования во время эпидемий. А. Иерсен уже в 1895 г. показал возможность предохранения кроликов от заражения чумой путем повторных введений убитой нагреванием вирулентной культуры микроба. Первую эффективную убитую чумную вакцину разработал русский ученый В. Хавкин в 1987 г. В течение 40 лет этой вакциной были привиты более 35 млн. человек. Однако при изучении действия этих препаратов не удалось получить напряженного иммунитета у морских свинок (общепризнанная модель для воспроизведения чумы). Они не были достаточно эффективными и при проведении полевых опытов в очагах чумы и не предохраняли от заболевания легочной чумой. Американский ученый К. Майер получил убитую формальдегидом вакцину USP из вирулентного штамма *Y. pestis* 195/P. Она применялась для иммунизации людей до 1998 года. Но ввиду частых поствакцинальных осложнений была снята с производства в США, в Австралии эту вакцину производят по запросу. Убитые противочумные вакцины, безусловно, являются безопасными, но вместе с тем для них характерна высокая реактогенность и низкая иммуногенность (Домарадский, 1993; Feodorova, Corbel, 2009; Книрель, Федорова, Анисимов, 2011; Anisimov, Lindler, Pier, 2004; Feodorova, Motin, 2011). За рубежом широкое распространение получила убитая вакцина PI («Санофи Пастер», Франция), которая представляет собой фенолрастворимую фракцию из штамма *B. abortus* 19 Vuck. Упомянутая вакцина слабо реактогенна, стабилизирована, однако ее иммуногенность ниже, по сравнению с живой вакциной *B. abortus* 19 (Учайкин, Шамшева, 2006).

Другим типом безопасных вакцин являются химические вакцины. Вершиловой П.А. с соавторами была сконструирована химическая бруцеллезная вакцина, состоящая из «бруцеллез защитного антигена» (ВРА), уксусной кислоты, белков и полисахаридов, структура которых до конца не выяснена. Небольшие дозы (0,6 мг)



этой вакцины индуцировали непродолжительный иммунитет (от 1 до 4 мес.) у мышей и морских свинок. Однако увеличение дозы до 2 мг привели к значительному снижению иммунного ответа. В опытах на добровольцах была найдена оптимальная доза вакцины (1 мг), которую целесообразно вводить как ревакцинирующую после предварительной иммунизации живой вакциной (Corbel, Feodorova, 2009).

Разработка химических вакцин явилась следующим этапом в создании безопасных профилактических препаратов против туляремии. Для их приготовления использовали поверхностные структуры туляремийного микроба, в частности белки внешней мембраны, которые обладают протективной активностью для белых мышей и морских свинок (Хлебников, Головлев, Чугунов, 1994). Было показано, что антигенные компоненты внешней мембраны оказывают выраженный иммуномодулирующий эффект на разные формы функциональной активности макрофагов (Скатов, Хлебников, 1993). Однако вакцина так и не была получена. Группой российских ученых под руководством В. Жемчугова разработана химическая противотуляремийная вакцина. При создании вакцины были учтены данные о существенной роли компонентного состава питательных сред и условий культивирования туляремийного микроба на синтез поверхностных антигенных структур, обладающих протективной активностью. К этим структурам относятся белковые компоненты туляремийного микроба, липополисахаридная часть, и что очень важно - гликопротеидный «С»-комплекс (Жемчугов с соавт., 2004). Вакцина прошла все надлежащие испытания, получен патент. Однако до настоящего времени она не лицензирована и не производится (Марданов, 2004).

Особого внимания заслуживает экспериментальная химическая чумная вакцина, предложенная С.М. Дальвадянцем (1990), в состав которой входят два компонента: F1 чумного микроба и ОСА псевдотуберкулезного. Дальвадянцем С.М. и Тараненко Т.М. (1988) были установлены преимущества химической экстракции препарата ОСА из биомассы псевдотуберкулезного микроба по сравнению с чумным. Химическая вакцина Дальвадянца вызывает напряженный иммунитет к чуме у

лабораторных животных, и является эффективнее убитой вакцины USP, но уступает вакцинному штамму EV НИИЭГ. По данным автора (Дальвадянц и др., 1990, 1997), по ревакцинирующим свойствам она превосходит живую чумную вакцину. Эта вакцина ареактогенна, и, что очень важно, ее можно применять на фоне антибиотиков, т.е. во время начавшейся вспышки заболевания для его лечения. Вакцина рекомендована для ревакцинации в очагах чумы или при ее завозе (Домарадский, 1993).

Альтернативными методами подхода к созданию безопасных вакцин являются, в настоящее время, молекулярно-генетические методы и технологии создания рекомбинантных ДНК. На мышах проведены исследования протективных свойств противобруцеллезных препаратов, в состав которых включены специфические антигены: рибосомальный белок L7/L12, белки, содержащие Cu, Zn супероксиддисмутазы, SodC, бактериоферритин, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, люмазин синтаза Omp 31, рекомбинантные Omp 16 и Omp 19. Вызванный препаратами иммунный ответ не превосходил результаты, полученные после введения животным живой вакцины из штамма 19 ВА или вакцины RB 51. Рекомбинант Omp 18, экспрессированный в *E. coli*, вызывал протекцию у мышей, но введение его в комбинации с Omp 38, напротив способствовало развитию бруцеллезной инфекции. Наличие в препаратах рекомбинантных белков пептидил-пролил-цис-транс изомераза и DnaK, приводило к образованию значительного количества антител, обладающих низкой протективной активностью. Вакцина, содержащая синтезированный белок Omp 31 и люмазин синтазу, была эффективна против *B. ovis*, так же как вакцина Rev 1, и против *B. melitensis*. Пока эти вакцины дают обнадеживающие результаты только в экспериментах на лабораторных животных (Corbel, Feodorova, 2011).

Определенные успехи были достигнуты при создании полисахарид белковых конъюгатов, включающих синтетические комплексы полисахаридов O полисахаридов *B. abortus* и поринов, или O полисахаридов *B. melitensis* с бычьим

сывороточным альбумином, которые индуцировали выработку антитела и протекцию у мышей против соответствующих вирулентных штаммов (Corbel, Feodorova, 2011).

ДНК-вакцины, имеющие нуклеотидные последовательности генов, ответственных за продукцию следующих антигенов бруцелл L7/L12, SodC, Omp 31, Omp 25 и IalB индуцировали высокий уровень защиты у мышей, при введении вакцин в липосомах. Все исследования проведены пока только на лабораторных животных. Попытки создать живые векторные вакцины пока не увенчались успехом. Кроме того, использование оральных вакцин при проведении массовой профилактики удобно и экономично, но насколько безопасно введение в макроорганизм живых векторных вакцин, неизвестно (Corbel, Feodorova, 2011).

Поиск высокоэффективных и безопасных для животных и человека средств иммунопрофилактики бруцеллеза в последние годы преимущественно направлен на изыскание щадящих способов инактивации микроорганизмов, а также методов выделения структурных компонентов бруцелл, позволяющих сохранять их иммуногенные свойства. Поэтому, выбор оптимальной антигенной основы для создания противобруцеллезных вакцин для животных и человека является актуальной задачей (Winter, Rowe, Duncan, 2002).

Конструирование вакцин нового поколения для профилактики туляремии затруднено, поскольку для *F. tularensis* к настоящему времени не определены иммунодоминантные антигены и специфические вирулентные детерминанты (Sjostedt, 2003). В настоящее время проводятся работы по поиску новых протективных антигенов, которые могут быть использованы при конструировании субъединичных вакцин (Holm, Tarnvik, Sandstrom, 1980; Surcel et al., 1989; Sjostedt, Sandstrom, Tarnvik, 1990 a, b; Fulop et al., 1995, 2001; Conlan, 2004). Активно изучают защитную роль ЛПС при формировании иммунного ответа (Sandstrom, et al., 1992; Sjostedt, Sandstrom, Tarnvik, 1992; Elkins, et al., 1993; Fulop et al., 1995., 2001).

Актуальность проблемы профилактики туляремии определяется наличием природных очагов этой инфекции, находящихся во многих странах северного полушария планеты, эпизоотическая активность которых ежегодно подтверждается обнаружением значительного числа положительных на туляремию проб из объектов внешней среды. Исследования направлены на разработку новых эффективных и безопасных вакцин против туляремийной инфекции.

Ежегодно регистрируемые эпизоотии и заболевания людей чумой, наличие природных очагов, выделение атипичных и мультиантибиотикорезистентных штаммов *Y. pestis* свидетельствуют об эволюции микроорганизма, и дополнительной угрозе возникновения эпидемий, что требует совершенствования специфических средств профилактики чумы (Коротяев, Бабичев, 2002; Williams et al., 1978; Chanteau et al., 1998).

Российскими учеными Ю.А. Книрелем, В.А. Федоровой и А.П. Анисимовым (2011) предложен новый подход создания рекомбинантного штамма чумного микроба. Проведена направленная делеция гена в вакцинном штамме EV, кодирующего ацилтрансферазу – фермент, отвечающий за присоединение одной из жирных кислот к ЛПС. Это привело к снижению токсичности ЛПС, и, как следствие, к исключению ряда побочных эффектов, ослабляющих иммунитет. Введение сконструированного штамма различным видам лабораторных животных, показало его сниженную реактогенность и более высокую безопасность, по сравнению с исходным штаммом. Эти результаты дают возможность рассматривать новый штамм как прототип высокоэффективной, безвредной и безопасной живой чумной вакцины (Feodorova et. al., 2007, 2009; Книрель, Федорова, Анисимов, 2011). Другим биотехнологическим подходом к повышению безопасности вакцин было создание антиидиотипических (АИТ) вакцин, не содержащих материала патогена, что полностью исключает риск реверсии даже аттенуированного бактериального штамма в организме вакцинируемого с полным сохранением способности иммуноглобулиновых «копий» протективных антигенов индуцировать выработку

протективного иммунитета. Это было продемонстрировано недавно в работе Девдариани З.Л. и Федоровой В.А. (2006), где отмечалось, что были получены мышинные антиидиотипические антитела к белкам *Y. pestis* с молекулярной массой 72, 54, 25 и 87 кД, кодируемым плазмидой вирулентности возбудителя чумы (pCad, pLcr). Комплементарность к исходным антигенам была подтверждена с использованием иммунохимического, функционального, иммунологического и иммунобиологического критериев. Т. Burrows в 50-х годах прошлого столетия отметил протективные свойства белка LcrV чумного микроба (Burrows et al., 1963). Весьма перспективным, с точки зрения повышения безопасности профилактических препаратов, является современный метод конструирования субъединичных вакцин. Так, в Мичиганском университете США, российский ученый В. Мотин, сконструировал рекомбинантный белок LcrV, ставший компонентом субъединичной чумной вакцины (Motin et al., 1994). Введение указанной вакцины мышам обеспечивало высокий уровень активной и пассивной защиты от экспериментальной чумной инфекции (Feodorova, Corbel, 2009; Feodorova, Motin, 2011).

Для создания двухкомпонентной рекомбинантной вакцины, содержащей протективные антигены F1 и LcrV, кодируемый химерным геном, используют два способа. Один из них применяют в США. Сконструирован белок, включающий нуклеотидные последовательности двух исходных генов в одной рамке считывания (F1-V). Оральное или интраназальное введение этой вакцины предохраняло белых мышей от аэрозольного заражения. Однократная подкожная вакцинация защищала от бубонной и легочной чумы в течение года. И, кроме того, у вакцинированных животных отмечали высокий титр антител. Второй способ был предложен в Великобритании. Создана двухкомпонентная субъединичная вакцина, содержащая смесь антигенов (F1+V), обладающая выраженной протективной активностью и аддитивным эффектом действия. Эта вакцина защищала мышей от бубонной и легочной чумы, т.е. оказалась более иммуногенной и безопасной, чем убитая USP вакцина. В ближайшие годы планируется представить эту вакцину к

лицензированию в Великобритании. Независимые исследования ученых из Японии и США привели к созданию рекомбинантного штамма чумного микроба *Y. pestis* KIM 1001. В геном этого вирулентного штамма был введен ген ацилтрансферазы 1pxL. Вакцинация этим штаммом защищала лабораторных животных от подкожного и интраназального заражения чумой. Существенным недостатком полученного штамма является возможность реверсии в вирулентную форму в результате утраты экспрессии 1pxL (Feodorova, Corbel, 2009).

Эпитопные вакцины – также повышение безопасности вакцин, ввиду отсутствия в препарате живых или убитых цельных клеток патогена. Однако зачастую они характеризуются более слабой иммуногенностью за счет более узкой специфичности протективного иммунного ответа. Были проведены исследования протективной активности эпитопов рекомбинантного антигена ТЗSS *Y. pestis*, таких как YpkA, YopH, YopE, YopK, YopM, YopN, YopD и YscC. Показано, что лишь введение YopD эффективно защищал от чумной инфекции белых мышей при заражении бескапсульным штаммом чумного микроба. Однако введение вирулентного штамма *Y. pestis* CO92, имеющего капсулу F1, после иммунизации защиты не вызывало (Andrews, 1999; Leary et al., 1999; Goodin et al., 2005).

На основе гетерологичных авирулентных для человека бактерий *Salmonella spp.*, *Lactococcus spp.*, аденовирусов, вирусов стоматита или оспы енота, создаются живые рекомбинантные вакцины, аналогичные субъединичным. В них клонируют гены одного или двух протективных антигенов чумного микроба F1 (Caf1) либо LcrV. Такая рекомбинантная вакцина впервые была создана в России в 1994 г. сотрудниками ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболенск) – Гремяковой с соавт. (Гремякова, 1994;). Она стимулировала не только продукцию специфических антител, как субъединичные вакцины, но и Т-клеточный иммунитет (Гремякова и др., 1996, 1997; Гремякова, 2004; Anisimov et al., 2004; Feodorova, Corbel, 2009).

В последние 20 лет активно развивается разработка и конструирование противочумных вакцин третьего поколения — рекомбинантных и ДНК-вакцин, основанных на технологии рекомбинантных ДНК. Это новое поколение вакцин, которые лишены многих недостатков традиционных профилактических препаратов. Они должны быть более безопасными, в результате проведения направленной делеции детерминант вирулентности, а значит невозможности её реверсии. При этом рекомбинантные и ДНК-вакцины должны индуцировать выраженный специфический иммунный ответ на протективные антигены за счет сохраненной способности к размножению живого рекомбинантного микроорганизма (ограниченное время) на месте введения (Книрель с соавт., 2011).

В настоящее время, одним из ряда предложенных перспективных кандидатов в рекомбинантные вакцины, является V антиген (антиген «вирулентности») чумного микроба. Впервые его обнаружили английские ученые Берроуз Т. и Бекон Дж. в середине 50-х гг прошлого столетия (Burrows, Bacon, 1963). V антиген обладал выраженными протективными свойствами, и это было подтверждено в 1994 г. Motin V.L. (1994). Он впервые показал, что сконструированный им рекомбинантный LcгV обеспечивал высокий уровень активной и пассивной защиты мышей от чумы (Feodorova, Corbel, 2009). V антиген входит в состав двухкомпонентных субъединичных вакцин, которые разрабатывают западные ученые (Burrows, Bacon, 1963; Книрель с соавт., 2011). Группой английских ученых Titball R. *et. al.* предложена вакцина, содержащая LcгV в эквимолярной смеси с фракцией первой (F1), являющейся вторым рекомбинантным компонентом (Titball, Williamson, 2001; 2004). Как отмечают авторы, каждый из этих антигенов обладает выраженной протективной активностью, и в комбинации создают аддитивный эффект, защищая в эксперименте мышей от бубонной, и лёгочной чумы. В Великобритании указанная вакцина весьма успешно прошла первые две фазы клинических испытаний. Она оказалась более безопасной и иммуногенной, чем убитая USP вакцина. Возможно, она будет лицензирована как препарат для иммунизации людей. Разработаны две

формы вакцины: растворимая и деградируемая в привитом организме. Вторая форма помещена в полиэфирные микросферы, что позволило повысить в 1.7–2.5 раза протективную активность комбинированной вакцины (Книрель с соавт., 2011; Titball, Williamson, 2001; 2004; Feodorova, Corbel, 2009). «Американская» двухкомпонентная рекомбинантная вакцина содержит «фьюжен» белок F1-LcrV (то есть те же антигены), кодируемый химерным геном, который включает нуклеотидные последовательности двух исходных генов в одной открытой рамке считывания. Как отмечают авторы, однократное подкожное введение этой вакцины, начиная с 14-го дня после инъекции, защищало в течение года мышей от экспериментальной бубонной и лёгочной чумы, а при интраназальной или оральной вакцинации – даже от аэрозольного заражения. У вакцинированных животных иммунитет коррелировал с наличием в сыворотке крови высоких титров специфических антител классов IgA к F1 и IgG к LcrV (Книрель с соавт., 2011; Titball, Williamson, 2004; Feodorova, Corbel, 2009).

Еще одним, новым направлением в разработке противочумных рекомбинантных вакцин является создание, так называемых «съедобных» вакцин, иными словами, трансгенных растений (томаты, картофель и т.д.), в которых происходит наработка протективных антигенов. Такие вакцины должны быть весьма удобны, так как принимаются орально (Alvarez *et al.*, 2006; Arlen *et al.*, 2008; Del. Prete *et al.*, 2009).

Для конструирования субъединичных рекомбинантных вакцин в качестве векторов предложены гетерологичные и авирулентные для человека следующие микроорганизмы: вирусы стоматита или оспы енота, аденовирусы, *Salmonella spp.*, *Lactococcus spp.*, в которых клонируют гены одного или двух (F1 (Caf1) и/или LcrV) протективных антигенов *Y. pestis*. Перечисленные микроорганизмы не только индуцируют продукцию специфических антител, но и в отличие от субъединичных вакцин, стимулируют также Т-клеточный иммунитет. Научным коллективом – Гремяковой Т., Степаншиной В., Коробовой О. и Анисимовым А. (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболенск) в 1991 г. был создан один из кандидатов в



рекомбинантную чумную вакцину (Гремякова, 1991; 1994; Anisimov *et al.*, 2004; Anisimov, Amoako, 2006). В основе этой экспериментальной вакцины был использован штамм *Salmonella minnesota* R595/GSA, который экспрессировал повышенное количество F1. Введение аутобредным мышам этой вакцины создавало невосприимчивость их к экспериментальной чуме уже с первого дня после иммунизации. Но для морских свинок она оказалась менее иммуногенной. При сравнительной оценке протективной эффективности живой и убитой вакцин, оказалось, что для мышей она примерно одинакова (Гремякова, 1991; 1994; 2004). Аналогичные результаты были получены спустя три года английскими учеными, которые капсульный антиген F1 экспрессировали в *Salmonella typhimurium* SL3261 и провели тестирование.

Таким образом, несмотря на различные способы повышения безопасности вакцин из вирулентных штаммов возбудителей бруцеллеза, туляремии и чумы лицензированными остаются только живые вакцины из аттенуированных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ.

Использование в настоящее время генноинженерных методов при конструировании вакцин нового поколения, не исключает поиска способов усовершенствования имеющихся живых вакцин путем повышения их безопасности. Наиболее безопасными являются убитые корпускулярные вакцины, содержащие полный спектр бактериальных антигенов. Одним из методов щадящей инактивации вакцинных штаммов, с целью получения безопасных вакцин, мог бы стать метод фотодинамического воздействия (ФДВ) на бактериальные взвеси. Так как в настоящее время ФДВ, в некоторых случаях, используется для лечения кожных инфекционных заболеваний, в частности, при лечении кожного акне, как метод альтернативный антибиотикотерапии (Hamblin, 2004; Guffey, 2006; Hongcharu, 2010).

Слово "лазер" составлено из начальных букв (аббревиатура) слов английской фразы "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation", что означает "усиление света в результате вынужденного излучения". Лазер является источником

электромагнитного излучения видимого, инфракрасного и ультрафиолетового диапазонов, основанный на вынужденном излучении атомов и молекул. По сравнению с другими источниками света лазер обладает рядом уникальных свойств, связанных с когерентностью и высокой направленностью его излучения. 16 мая 1960 г. Т. Мейман продемонстрировал работу первого оптического квантового генератора - лазера (Maiman, 1960). Современные лазерные установки дают возможность получить оптическое излучение нужного спектрального диапазона, варьировать мощностью излучения, частотой повторения импульсов, их длительностью, размером сечения лазерного пучка и т.д. Лазерное излучение может использоваться как для стимулирования жизненно важных процессов в клетках и организмах, так и для их подавления. Последствия таких воздействий исследуются различными методами современной биологии и медицины. Начиная с 1965 года, проводятся активные исследования действия лазерного излучения на биологические объекты. Были получены данные о воздействии лазера на различные уровни организации живых систем: клеточный (Клебанов с соавт., 1997; Королев с соавт., 1997; Кару с соавт., 1991; Клебанов, 2001; Prodouz et al., 1992; Daniels et al., 1994; Morimoto et al., 1994; O'Kane et al., 1994; Knappe et al., 1995; Logan et al., 1995; Manteifel, Karu, 2005), молекулярный (Панасюк и др., 1987; Тифлова, Кару, 1987; Генкин с соавт., 1989; Романова с соавт., 1993; Karu et al., 2005.), и генетический (Callaghan et al., 1996). В экспериментальных и клинических исследованиях обнаружено влияние лазерного излучения на микроциркуляцию крови (Козлов с соавт., 1993, 1998), изменения агрегационных и адгезивных свойств клеток крови (Брилль с соавт., 1997), клеточной пролиферации (Клебанов, Владимиров, 1999; Karu, 1989, 1999), увеличение бактерицидности (Клебанов с соавт., 1997; Восканян, 2003). Широкое практическое применение лазеры получили в медицине. Имеются сведения об использовании лазерного излучения при лечении различных острых и хронических инфекционных заболеваний, гнойно-септических осложнений (Кару с соавт., 1982; Девятков с соавт., 1998; Красавин, 1991; Karu, 1999 2003; Tuchin, 2007).

В настоящее время ведутся исследования основополагающего характера, связанные с изучением механизмов воздействия лазерного излучения на живые организмы. В качестве возможных механизмов действия лазеров исследуются несколько основных гипотез:

*Гипотеза о взаимодействии лазерного излучения с компонентами дыхательной цепи переноса электронов.* Механизм взаимодействия лазерного излучения с компонентами цепи переноса электронов (Кару, 1989; Pastore et al., 1994) состоит в следующей цепочке событий. При гипоксии, из-за недостатка кислорода, происходит восстановление ферментов-переносчиков в дыхательной цепи и падение трансмембранного потенциала митохондрий. Световое излучение приводит к реактивации ферментов, таких как цитохромоксидаза, восстанавливает поток электронов в дыхательной цепи и увеличивает трансмембранный потенциал. Как следствие, повышается внутриклеточная концентрация  $Ca^{2+}$  и увеличивается продукция АТФ. Упомянутые явления стимулируют внутриклеточные процессы.

*Реактивация металлосодержащих ферментов.* Данная гипотеза (Горбатенкова, Владимиров с соавт., 1989; Девятков с соавт., 1998) объясняет противовоспалительные эффекты низкоинтенсивного лазерного излучения. Предполагается, что такие железосодержащие или медьсодержащие ферменты как каталаза, супероксиддисмутаза (СОД), церулоплазмин способны поглощать свет в красной области диапазона. В дальнейшем реактивированные ферменты принимают участие в антиокислительных процессах. При этом считается, что при облучении гемсодержащих молекул каталазы происходит их структурная перестройка, ведущая к активации фермента. В свою очередь, механизм реактивации СОД может состоять в депротонировании гистидиновых остатков при дальнейшем восстановлении нативной структуры его активного центра.

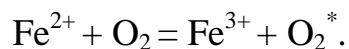
*Неспецифическое влияние на биополимеры.* В рамках гипотезы о неспецифическом влиянии света на биополимеры (Генкин с соавт., 1989) предполагается, что излучение может изменять заряд белков крови и их

конформационное состояние. В результате происходит интенсификация транспорта различных веществ через клеточную мембрану.

*Неспецифическое влияние на структуру воды.* Гипотеза о неспецифическом влиянии лазерного излучения на структуру воды (Захаров с соавт., 1989) предполагает, что под воздействием светового поля изменяется пространственное расположения молекул, приобретая кластерный характер. В результате изменяются гидрофобные взаимодействия белков.

*Свободнорадикальный механизм.* Свободнорадикальный механизм взаимодействия светового излучения с клетками (Клебанов с соавт., 1998, 2001, 2002) основан на гипотезе о следующей последовательности событий. Лазерное излучение поглощается эндогенными хромофорами (вероятнее всего, порфиринами). При этом предполагается, что хромофоры способны поглощать свет вблизи длины волны излучения используемого лазера. Эти хромофоры выступают в роли фотосенсибилизаторов. При этом первичные фотохимические реакции связывают с фотоокислением липидов в клеточных мембранах, фотолизом комплексов оксида азота  $NO$ , фотореактивацией супероксиддисмутазы. Фотосенсибилизаторы, после поглощения световой энергии, переходят в возбужденное состояние. В результате взаимодействия возбужденных молекул порфирина с кислородом образуется синглетный кислород. Молекулы синглетного кислорода чрезвычайно активны и вступают в свободнорадикальные реакции с липидами, входящими в состав клеточных мембран. Как следствие, изменяется структура мембраны. Вероятнее всего, в клеточной мембране появляются дополнительные каналы, увеличивающие ионную проницаемость, в том числе и для ионов кальция  $Ca^{2+}$ . В активированных клетках увеличивается продукция разнообразных биологически активных соединений - супероксидный анион-радикал, гипохлорит-ион, а также оксид азота  $NO$ . При этом инициация перекисного окисления липидов (ПОЛ) может быть обусловлена различными свободными радикалами, но первостепенную роль играют промежуточные продукты восстановления кислорода, его активные формы:

супероксид-анион-радикал ( $O_2^*$ ), пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), гипохлорит-анион ( $ClO^-$ ), а также оксид азота ( $NO$ ) и др. Образование активных форм кислорода является следствием неполного одно-, двух- или трехэлектронного восстановления кислорода (Владимиров с соавт., 1972, 1991; Козлов, 1973; Прайор, 1975; Фридович, 1979; Фархутдинов с соавт., 1983; Соколовский, 1988; Клебанов, Чичук, 2001; Tyler, 1975; Katz et al., 1984). Наиболее распространено образование  $OH^*$  (гидроксильного радикала) за счет восстановления кислорода металлами переменной валентности или восстановленными органическими соединениями, такими как флавин. Вначале происходит реакция типа:



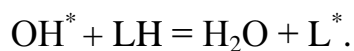
Получающийся при этом свободный супероксидный радикал  $O_2^*$  может превращаться в перекись водорода:



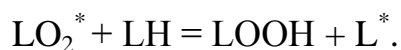
которая, в свою очередь, может давать гидроксильный радикал при реакциях восстановления:



Гидроксильный радикал чрезвычайно активен. Взаимодействуя с ненасыщенными жирными кислотами ( $LH$ ), этот радикал отнимает у них электрон с образованием свободного радикала жирной кислоты:



Радикал  $L^*$  легко связывает молекулярный кислород; образуется перекисный радикал липида  $LO_2^*$ . Этот радикал вступает в дальнейшую реакцию цепного окисления, взаимодействуя с новой молекулой жирной кислоты, входящей в состав фосфолипида:

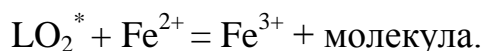


Образующийся липидный радикал  $L^*$  вновь вступает в реакцию с кислородом, и это чередование процессов продолжается до тех пор, пока свободные радикалы  $L^*$  и  $LO_2^*$  не исчезнут в результате реакции обрыва цепи. Реакция обрыва может произойти по одному из трех механизмов:

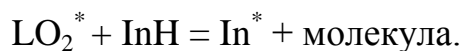
1. Взаимодействие свободных радикалов друг с другом:



2. Взаимодействие радикала с восстановленной формой металла переменной валентности, например, с ионом  $Fe^{2+}$ :

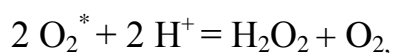


3. Реакция радикала с молекулой антиоксиданта (InH):

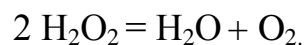


Процесс образования гидроксильного радикала прерывается, если в системе одновременно присутствуют два фермента:

супероксиддисмутаза осуществляет реакцию:

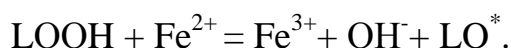


и каталаза, разлагающая перекись водорода

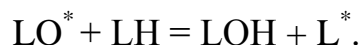


Эти ферменты защищают клетку от повреждающего действия гидроксильного радикала.

Особенности протекания ПОЛ в биологических мембранах заключается в том, что этот процесс катализируется ионами двухвалентного железа. Ионы железа взаимодействуют с гидроперекисями, которые являются продуктом реакции цепного окисления:



В результате образуются новые свободные радикалы, которые дают начало новой цепи окисления липидов:



Таким образом, реакция окисления липидов в присутствии  $\text{Fe}^{2+}$  становится разветвленной, самоускоряющейся реакцией.

Действие продуктов ПОЛ нейтрализуется неферментным и ферментным звеньями антиоксидантной системы.

По-видимому, эта гипотеза наиболее полно объясняет события, происходящие при фотодинамическом воздействии (ФДВ) на клетки. Синглетный кислород, образующийся при лазерном облучении фотосенсибилизатора, инициирует ПОЛ и, как следствие, нарушение клеточных мембран. То есть, метод ФДВ использовали для киллинга, в частности, патогенных бактерий как средство альтернативное антибиотикотерапии. На наш взгляд, было бы весьма перспективно использовать

лазерное излучение для инактивации бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV с целью повышения их безопасности. В литературе отсутствуют сведения о проведении аналогичных исследований.

#### **1.4. Оценка безопасности живых вакцин**

Безопасность живых вакцин оценивают по методам, указанным в ГОСТах, Методических указаниях и других нормативных документах, регламентирующих требования к вакцинам. В частности безопасность живых вакцин *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ определяют в лабораторных исследованиях на чувствительных животных. Оценку безвредности, остаточной вирулентности и реактогенности вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА проводят на морских свинках, белых мышах и телятах согласно ГОСТу 18589-73 «Вакцина живая сухая против бруцеллеза сельскохозяйственных животных из штамма № 19» (1997). Оценку аналогичных показателей вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проводят на морских свинках и белых мышах по методическим указаниям «Основные требования к вакцинным штаммам туляремиального микроба: МУ 3.3.1.2161—07» (2007). Следуя требованиям этих нормативных документов, для оценки безопасности живых вакцин необходимо выполнение следующих условий: проведение экспериментов с использованием разных видов чувствительных животных; лабораторные животные должны содержаться в условиях вивария, на стандартном рационе; для получения полной и объективной информации о состоянии привитых лабораторных животных в эксперименте должно быть несколько опытных и обязательно контрольная группа животных; проводится широкий спектр исследований, включающий биологические, патоморфологические, гистологические и другие эксперименты, что, безусловно, является процессом длительным, требующим значительных финансовых затрат.



Учитывая вышесказанное, немаловажным, на наш взгляд, является разработка новейших высокоинформативных методов оценки безопасности вакцин. Разработка и создание компьютеризированных диагностических комплексов, включающих биосистему (микроорганизм – лабораторное животное) и физический датчик для объективной регистрации количественных изменений, происходящих в биосенсорном звене.

Известно применение метода спекл-имиджинга, в англоязычной литературе этот метод называется *LASCA* (от английского *Laser Speckle Contrast Analysis*), для визуализации церебральных сосудов белых крыс. Изучение изменений гемодинамики проводятся *in vivo* в режиме реального времени, без трепанации черепа (Briers, Webster, 1996; Briers, 2001; Dunn et al., 2001; Yu et al., 2004; Draijer et al., 2006; Kruijt et al., 2006; Li et al., 2006; Zhu et al., 2007; Miao et al., 2010; Kalchenko et al., 2011). Другим современным методом определения состояния микрососудов и движения крови в них является метод спекл-микроскопии (Galanzha et al., 2002). Впервые этот метод был применен для измерений потоков крови в отдельном сосуде сетчатки глаза в начале семидесятых годов прошлого века (Riva, 1972; Mishina, 1974). В настоящее время с помощью этого метода было проведено изучение лимфо- и гемодинамики сосудов брыжейки белых крыс в норме и при патологии (Riva, 1972; Mishina, 1974; Aizu et al., 1989, 1991, 1992, 1998, 2000; Бриль, 1992, 2001; Галанжа, 2002; Ульянов, 1994; Galanzha, 2000, 2001, 2002; Solovéva, 2001; Zharov, 2002, 2003; Ul'yanov, 1995, 1997, 1998, 2001; Tuchin, 1999). Сообщений об использовании перечисленных методов для оценки реактогенности бактериальных вакцинных штаммов на морских свинках, нами не обнаружено.

Таким образом, из представленного анализа литературы очевидно, что на сегодняшний день наиболее эффективными средствами профилактики бруцеллеза, туляремии и чумы в РФ и некоторых странах СНГ являются лицензированные живые аттенуированные вакцины *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ.

Однако в настоящее время особо актуальным является разработка фундаментальных основ повышения безопасности живых вакцин для более широкого их применения.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись штаммы грамотрицательных бактерий: *Escherichia coli* B6, *E. coli* K12, *E. coli* O1; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27533, *P. aeruginosa* ATCC 27853; а также вакцинные штаммы *Brucella abortus* 19 ВА; *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ; *Yersinia pestis* EV НИИЭГ.

Штаммы *E. coli* B6, *E. coli* K12, *E. coli* O1, *P. aeruginosa* ATCC 27533 были получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ГИСК имени Л.А. Тарасевича, г. Москва; культура *P. aeruginosa* ATCC 27853 – American Type Culture Collection, США; вакцинные штаммы *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 и *Y. pestis* EV – Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов, а так же ФГУП «НПО «Микроген», г. Омск.

Для выращивания микроорганизмов использовали следующие питательные среды: *E. coli* spp. – агар Эндо, ГРМ бульон, ГРМ агар, pH 7,3; МПА, pH 7,2; *P. aeruginosa* 27533 – ГРМ бульон, ГРМ агар, pH 7,3 МПА, pH 7,2; *P. aeruginosa* 27853 – Difco Vacto-agar, pH 7,4 (Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA); *B. abortus* 19 ВА – эритрит агар и эритрит бульон, pH 7,2; *F. tularensis* 15 – FT агар, pH 7,0 и МПА, pH 7,2; *Y. pestis* EV – Vacto Heart Infusion Broth (HIB), pH 7,4 (Becton, Dickinson and Company, USA). Питательные среды: агар Эндо, ГРМ бульон, ГРМ агар, МПА, бруцеллагар, FT агар - приобретены в ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора М.о., п. Оболенск, Россия.

Бактериальные взвеси готовили по стандарту мутности 42-28-85П, соответствующего года выпуска, эквивалентной 10 МЕ (ГИСК имени Л.А. Тарасевича, г. Москва, Россия) в 0,85% растворе хлорида натрия.

Работу с бактериями вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА; *F. tularensis* 15 НИИЭГ; *Y. pestis* EV НИИЭГ (III группа ПБА) и *E. coli* В6, *E. coli* К12, *E. coli* О1; *P. aeruginosa* ATCC 27533, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (IV группа ПБА) (Безопасность работы ..., <http://www.opengost.ru>) проводили согласно Санитарным правилам "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности и гельминтами. СП 1.2.731-99" и Санитарно-эпидемиологическим правилам "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней (Безопасность работы ..., <http://www.opengost.ru>).

## **2.2. Методы оценки жизнеспособности, культурально-морфологических и серологических свойств бактерий**

Жизнеспособность микроорганизмов до и после инактивации методом ФДВ исследовали бактериологическим методом, определяя количество колониобразующих единиц (КОЕ) бактерий *E. coli* В6, *E. coli* О1, *E. coli* К12, *P. aeruginosa* 27533, *P. aeruginosa* 27853, *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15, *Y. pestis* EV. С этой целью высевали 0,1 мл бактериальной взвеси в концентрации  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл на соответствующие культуре плотные питательные среды. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 10 сут, с последующим подсчетом числа выросших колоний (Теппер с соавт., 2004).

Культуральные свойства бактерий, использованных в эксперименте, до и после инактивации методом ФДВ изучали по характерной морфологии роста колоний на плотных питательных средах. Для бактерий *E. coli* spp., *P. aeruginosa* 27533, *B. abortus* 19 ВА и *Y. pestis* EV оценивали также характер роста в бульоне.

Морфологические свойства бактерий *E. coli* spp., *P. aeruginosa* 27533, *B. abortus* 19 ВА и *Y. pestis* EV исследовали в мазках, окрашенных по Граму; бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 – в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимзе.

Серологические свойства бактерий вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА до и после инактивации методом ФДВ определяли методом постановки реакции агглютинации (РА) в пробирках со специфической агглютинирующей бруцеллезной сывороткой до ее предельного титра (Инструкция по применению ..., 1973), а также в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с использованием диагностикума бруцеллезного эритроцитарного иммуноглобулинового (Профилактика и лабораторная ..., 2003; Инструкция по применению диагностикума эритроцитарного бруцеллезного иммуноглобулинового жидкого. НИПЧИ, <http://snipchi.ru>).

Серологические свойства бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 до и после инактивации методом ФДВ изучали по продукции специфических антигенов в РА пробирочным методом (Методические указания ..., 2007) и в РНГА с использованием диагностикума туляреминого эритроцитарного иммуноглобулинового (Приказ МЗ РФ № 125, 1999; Инструкция по применению диагностикума эритроцитарного туляреминого иммуноглобулинового сухого, <http://www.medsovet.info>).

Серологические свойства бактерий вакцинного штамма *Y. pestis* EV до и после инактивации методом ФДВ исследовали в РНГА с использованием диагностикума чумного эритроцитарного иммуноглобулинового (Инструкция по применению диагностикума эритроцитарного чумного иммуноглобулинового сухого, <http://snipchi.ru>).

Для изучения серологических свойств бактерий использовали следующие коммерческие препараты: сыворотку бруцеллезную диагностическую моноспецифическую адсорбированную кроличью *anti-abortion* для реакции агглютинации жидкую (ФКУЗ «Ставропольский ПЧИ» Роспотребнадзора, г. Ставрополь), сыворотку туляреминую диагностическую для реакции

агглютинации сухую (ФКУЗ «Иркутский ПЧИ» Роспотребнадзора, г. Иркутск), диагностикум эритроцитарный бруцеллезный иммуноглобулиновый жидкий (ФКУЗ «Ставропольский ПЧИ» Роспотребнадзора, г. Ставрополь), диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый сухой и диагностикум чумной эритроцитарный иммуноглобулиновый сухой (НИИ микробиологии МО РФ, г. Киров).

Пробы на образование сероводорода и индола бактериями *E. coli* spp., *P. aeruginosa* spp. до и после инактивации методом ФДВ проводили, используя системы индикаторные бумажные (СИБ) в соответствии с Инструкцией по применению систем индикаторных бумажных для идентификации микроорганизмов (СИБ) - ФСП 42-0100-3827-03 (Инструкция ..., 1973).

### **2.3. Оценка безопасности вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *B. abortus* 19 ВА по определению остаточной вирулентности, безвредности и реактогенности *in vivo***

Безопасность бактерий вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *B. abortus* 19 ВА до и после инактивации методом ФДВ определяли на морских свинках по показателям безвредности, остаточной вирулентности и реактогенности согласно нормативным документам (Бруцеллез ..., 1996; Основные требования ..., 2007). Кроме того, оценку реактогенности проводили когерентно-оптическими методами (Ульянов, 1994; Briers, 2001), используя оригинальные компьютеризированные лазерные установки, в состав которых была включена стандартная биосистема — микроорганизм - лабораторное животное.

Для оценки безвредности и остаточной вирулентности регламентированными методами двухсуточные агаровые культуры вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА или *F. tularensis* 15 НИИЭГ вводили морским свинкам подкожно в правую паховую область в объеме 1 мл. Контрольным группам животных инокулировали интактные

культуры вакцинных штаммов, а опытным – взвеси бактерий, инактивированные методом ФДВ.

Безвредность бактерий *B. abortus* 19 проверяли на животных после введения  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл. Наблюдали животных в течение 25 дней. По истечении этого срока проводили эвтаназию морских свинок и регистрировали наличие/отсутствие, выраженность макроскопических патологоанатомических изменений, характерных для бруцеллезной инфекции.

Остаточную вирулентность клеток *B. abortus* 19 ВА, введенных в дозах  $1 \cdot 10^3$ ;  $1 \cdot 10^4$  или  $2 \cdot 10^9$  м.к./мл оценивали по приживаемости бактерий в организме лабораторных животных. Для этого после эвтаназии и вскрытия морских свинок на 35 сут. наблюдения высевали на эритрит агар паховые, подчелюстные, заглочные, парааортальные лимфатические узлы, печень, селезенку и костный мозг. Посевы инкубировали в термостате при  $37^\circ\text{C}$  в течение 25 сут., просматривая их каждые 3-4 дня.

Реактогенность бактерий *B. abortus* 19 ВА определяли на морских свинках по результатам опытов по изучению безвредности и остаточной вирулентности. У животных в течение 10 суток после заражения ежедневно регистрировали местную и общую реакции организма, фиксировали температуру и массу тела, отмечали изменения в поведении животных. Состояние регионарных лимфатических узлов и мягких тканей в месте введения оценивали при пальпации.

Для проведения оценки безвредности, остаточной вирулентности и реактогенности бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 культуру вводили морским свинкам в дозе  $5 \cdot 10^9$  м.к./мл. Наблюдение за животными осуществляли в течение 30 суток. Затем оценивали морфологические показатели постмортально. Остаточную вирулентность определяли по приживаемости и распространению введенных бактерий в организме морских свинок, для этого паховые лимфатические узлы, печень и селезенку высевали на Ft-агар. При оценке реактогенности после заражения в течение первых 10 суток у морских свинок ежедневно регистрировали

местную и общую реакции: измеряли температуру и массу тела; пальпаторно оценивали состояние регионарных лимфатических узлов и мягких тканей в месте введения.

Реактогенность клеток вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 до и после инактивации оценивали, также *in vivo* когерентно-оптическими методами на организменном уровне методом спекл-имиджинга (Dann А.К., 2001; Li P., 2006) и на тканевом уровне методом спекл-микроскопии (Ульянов, 1994), используя морских свинок. При оценке реактогенности вакцин на организменном уровне методом спекл-имиджинга определяли интенсивность кровотока и состояние церебральных микрососудов. Реактогенность бактерий *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 на тканевом уровне определяли *in vivo* на морских свинках методом спекл-микроскопии по изменению состояния микрососудов брыжейки.

#### **2.4. Оборудование, реактивы и материалы**

При выполнении разных этапов настоящей диссертационной работы использовали следующее оборудование, реактивы и материалы:

- световые микроскопы «БИОЛАМ» «ЛОМО» Санкт-Петербург – при изучении культурально-морфологических свойств бактерий, а также в составе установок для спекл-микроскопии и спекл-имиджинга;

- персональный компьютер с операционной системой Windows XP - в составе компьютеризированных установок, при проведении статистической обработки экспериментальных результатов;

- пакеты Mathcad 14 Pro Academic Edition и Matlab 7.2– для проведения математического моделирования, анализа полученных данных и их статистической обработки;

- цифровые CMOS монохромные видеокамеры с высоким пространственным разрешением и малым уровнем собственных шумов (MuTech и DataRay, США)



входили в оптическую систему формирования изображения, подключенную к компьютеру – для визуализации потоков крови в капиллярах брыжейки и головного мозга лабораторных животных;

- сканирующее устройство (Newport, Франция) было включено в систему для проведения спекл-микроскопии;

- лазеры: He-Ne ЛГН-207, полупроводниковые КЛМ-650, КЛМ-980 (Оптроникс, Россия), одномодовые VCSEL (ULM Photonics, Germany), лазерные и световые диоды – для инактивации бактериальных культур и в составе установок для проведения спекл-микроскопии и спекл-имиджинга;

- микротом замораживающий МЗ-2 (Россия) – для получения ультратонких срезов с кожи молочных поросят, с целью изучения формирования спеклов в биотканях;

- микропланшеты полистироловые (ВНИИМед, Москва) – для проведения инактивации бактериальных взвесей;

- набор красок для окрашивания бактерий по Граму, Романовскому-Гимзе (ЗАО «Осирис С», Россия);

- Тб фаг - для определения чувствительности бактерий *V. abortus* 19 ВА к бруцеллезному бактериофагу (ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора, г. Ставрополь);

- метиленовый синий – метилтиониния хлорид, Methylthioninium chloride (АООТ Тверская фармфабрика, Россия) – антисептическое средство, которое применяли в качестве фотосенсибилизатора при инактивации бактерий методом ФДВ;

- диоксид титана – двуокись титана ( $TiO_2$ ), (KRONOS TITAN GmbH & Co. OHG, Германия), Titanium dioxide – кристаллы белого цвета, использовали для моделирования концентрированных многократно-рассеивающих бактериальных взвесей;

- интралипид – Intralipid (Фрезениус Каби Австрия ГмбХ, Австрия) – средство для парентерального питания, источник энергии и незаменимых жирных кислот.

Водная суспензия интралипида применялась в модельных экспериментах для имитации движущихся бактерий;

- коровье молоко, жирность 3,5 % – для имитации кожных покровов при разработке неинвазивных методов детекции биотканей в модельных экспериментах;

- кожу молочных поросят – для исследования *in vitro* процессов формирования спекл-полей в биотканях;

- хлороформ – метилтрихлорид (ОАО Аромасинтез, Россия) – анестезирующее средство;

- нембутал – натриевая соль 5-этил-5-(1-метилбутил)-2,4,6-триокси-пиримидина – лекарственный препарат из группы снотворных средство использовали для внутримышечного наркоза морских свинок (Россия);

- системы индикаторные бумажные (СИБ) – для определения образования бактериями сероводорода и индола (ФГУП «НПО «Микроген», г. Нижний Новгород).

## 2.5. Лабораторные животные

С целью изучения влияния вакцин *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после инактивации методом ФДВ на организм лабораторных животных (на организменном и тканевом уровнях) использовали морских свинок обоего пола в возрасте 3-4 мес. массой 300±50 г. Животных содержали в одинаковых условиях на стандартном рационе вивария. Для проведения эксперимента брали адаптированных к условиям опыта животных, выдержанных в лабораторных условиях в течение 5-8 дней. Для проведения исследований биомодели наркотизировали согласно международным правилам гуманного обращения с животными (Приказ № 755, 1977; Приказ № 742, 1984).

Животные были получены из лицензированного питомника филиала «Андреевка» ГУ НЦБМТ РАМН, М.о., Солнечногорского района, п. Андреевка.

## 2.6. Статистические методы

Экспериментальные данные обрабатывали методами регрессионного и корреляционного анализа, интерполяции сплайнами, сглаживания с помощью метода наименьших квадратов, медианного экспоненциального сглаживания, построения сглаженных спектральных оценок с использованием временного окна Ханна, применением быстрого преобразования Фурье и метода проверки непараметрических гипотез с использованием критерия  $\chi^2$  (Бендат, Пирсол, 1989; Кобзарь, 2006; Дженкинс, Ваттс, 1971). Графики и диаграммы выполнены в программе Excel 5.0.

### **ГЛАВА 3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* РАЗНЫХ ШТАММОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ И ОПТИМИЗАЦИИ УСЛОВИЙ ИНАКТИВАЦИИ МЕТОДОМ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ**

Основным направлением диссертационной работы являлась фотодинамическая инаktivация бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 и *Y. pestis* EV с целью повышения их безопасности. К настоящему времени известен ряд установок для инаktivации микроорганизмов. С конструктивной точки зрения, эти установки могут быть условно разделены на два типа. Первый тип установок состоит из сборника суспензии микроорганизмов, подлежащих инаktivации; сборника инаktivированной жидкости; смесителя, подключенного при помощи патрубков к сборникам; емкости для УФО смеси с днищем и крышкой, снабженной подводным и отводящим патрубками и размещенными внутри нее бактерицидными лампами, и сборника инаktivированной суспензии (Пат. SU (11) 1593216).

Второй тип установок предназначен для инаktivации микробиологических вакцин. Эти установки содержат емкость для приготовления суспензии микроорганизмов с мешалкой, установленной на вертикальном приводном валу, сообщенную с дополнительной емкостью, служащей для смешивания суспензии с инаktivированной жидкостью и имеющей патрубок для отвода этой жидкости, теплообменник для термической обработки суспензии и трубчатые бактерицидные лампы для ультрафиолетового облучения микроорганизмов (Пат. SU (13) 1714926).

Вышеперечисленные установки, во-первых, не обеспечивают 100 % инаktivацию бактериальных клеток, во-вторых, работают на длинах волн света, лежащих в ультрафиолетовом диапазоне, что может привести к изменению структуры и функции ДНК, РНК, фотоинаktivации белков и повреждению клеточных мембран (Владимиров, 2001). Упомянутые обстоятельства не позволяют использовать

описанные установки для инактивации бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 и *Y. pestis* EV с целью повышения их безопасности.

Поэтому основной задачей данного этапа диссертационного исследования было проведение модельных экспериментов по инактивации бактерий методом фотодинамического воздействия (ФДВ). Для этого необходимо было провести отбор бактериальных штаммов, фотосенсибилизатора, источников облучения, создать лабораторную установку и определить оптимальные параметры проведения инактивации бактерий методом ФДВ.

### **3.1. Выбор бактериальных штаммов, фотосенсибилизатора и длины волны облучения для проведения модельных экспериментов**

Предварительные эксперименты по инактивации бактерий проводили на модельных микроорганизмах *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp. (IV группа патогенности) (Безопасность работы ..., 2008), которые также как бактерии вакцинных штаммов бруцеллеза, туляремии и чумы являются грамотрицательными, то есть имеют сходное строение клеточной стенки (Шлегель, 1987). Это обстоятельство чрезвычайно важно, поскольку именно клеточная стенка является основным объектом при фотовоздействии (Красновский мл., 2004). Дальнейшие исследования были направлены на инактивацию клеток вакцинных штаммов *B. abortus* 19, *F. tularensis* 15 и *Y. pestis* EV (III группа патогенности).

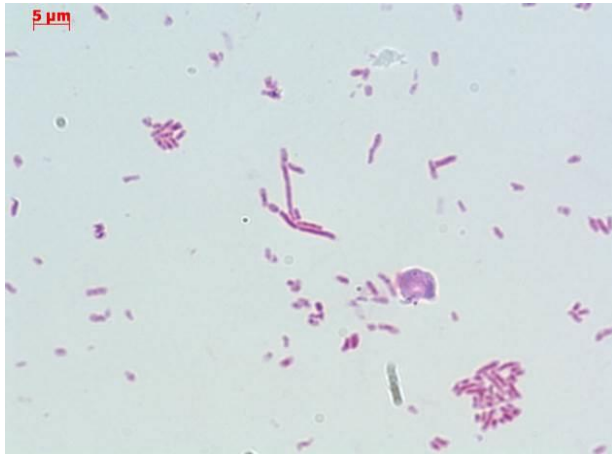
Род *Escherichia*. Непатогенные разновидности эшерихий входят в состав микрофлоры толстой кишки теплокровных, пресмыкающихся, рыб, насекомых, широко распространены в природе и являются основной факультативно-анаэробной микрофлорой кишечника человека. Типовым видом рода *Escherichia* являются бактерии вида *E. coli* (Шлегель, 1987).

Из представителей данного рода нами были отобраны три штамма, В6, K12 и O1, которые наиболее часто используют в качестве моделей в микробиологических

исследованиях. Представитель нормальной микрофлоры кишечника, штамм *E. coli* В6 – часто используемый для научного моделирования и, соответственно, хорошо изученный по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам. В наших экспериментах, проводя бактериоскопические исследования клеток *E. coli* В6, наблюдали типичные для энтеробактерий грамотрицательные, короткие, прямые, с закругленными концами, расположенные одиночно палочки (Рисунок 1, а), размеры которых в ширину составляли  $0,62 \pm 0,09$  мкм, в длину  $2,65 \pm 0,11$  мкм. В ГРМ бульоне бактерии *E. coli* В6 давали обильный диффузный рост, пристеночное кольцо и небольшой осадок сероватого цвета, который легко разбивался при встряхивании (Рисунок 1 б). На ГРМ агаре (Рисунок 1 в) *E. coli* В6 росли в виде гладких блестящих S-колоний с ровными краями до 5 мм в диаметре. На среде Эндо они образовывали плоские, интенсивно красные колонии с металлическим блеском до 7 мм в диаметре (Рисунок 1 г). *E. coli* В6 ферментировали глюкозу, лактозу, маннит, уреазу, обладали подвижностью (Таблица 1).

В экспериментах также был использован штамм *E. coli* К12, который считается универсальной моделью в общей и молекулярной генетике. Как видно на рисунке 2 а, по морфологии бактерии *E. coli* К12 представляли собой грамотрицательные палочки слегка вытянутой формы с закругленными концами, шириной  $0,88 \pm 0,12$  и длиной  $2,06 \pm 0,07$  мкм, расположенные одиночно. В ГРМ бульоне штамм *E. coli* К12 давал диффузный рост, образуя пристеночное кольцо и небольшой сероватый осадок, который легко разбивался (Рисунок 2 б). На ГРМ агаре (Рисунок 2 в) клетки штамма *E. coli* К12 образовывали выпуклые, мутные S- колонии с ровными краями 1-2 мм в диаметре; на среде Эндо – выпуклые, красные колонии 2-3 мм в диаметре (Рисунок 2 г). Бактерии штамма *E. coli* К12 были подвижны, ферментировали глюкозу, лактозу, маннит (Таблица 1).

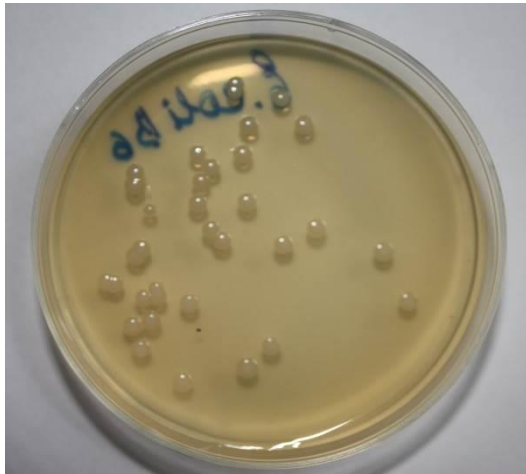
Следующую серию экспериментов проводили на энтеропатогенном представителе эшерихий *E. coli* О1 – возбудителе холероподобных эшерихиозов (Воробьев, 2004).



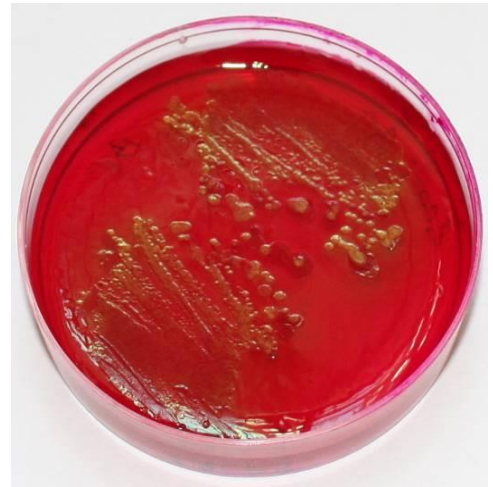
а



б



в



г

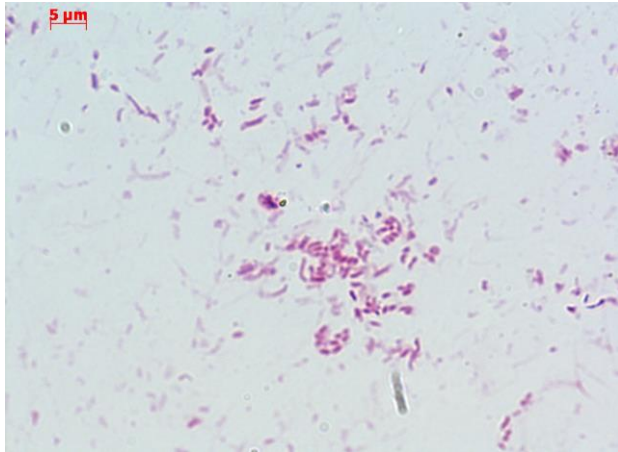
Рисунок 1 — Изучение типичных культурально-морфологических свойств штамма *E. coli* В6: а – морфология и размеры клеток, б – рост в ГРМ бульоне, в – колонии на ГРМ агаре, г – колонии на среде Эндо

Таблица 1 – Изучение биохимических свойств разных штаммов бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa*

Вид бактерий	Штамм бактерий	ПОДВИЖНОСТЬ	Среда Олькеницкого				уреаза	маннит	малонат	фенилаланин	желатина	ЛИЗИН	ПИГМЕНТ	ПИОЦИАНИН
			глюкоза	лактоза	мочевина	H <sub>2</sub> S								
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> B6	+	кГ	кГ	-	-	±	к	-	-	-	-	-	
	<i>E. coli</i> K12	+	кГ	+	-	-	-	±	-	-	-	-	-	
	<i>E. coli</i> O1	+	Г	-	-	-	-	к	±	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> 27533	+	к	к	-	+	-	-	+	+	-	+	+	
	<i>P. aeruginosa</i> 27853	+	к	к	-	+	-	±	+	+	+	±	+	

Примечание: к – кислота, г – газ, «+» - наличие признака, «-» – отсутствие признака, «±» – признак слабо выражен.





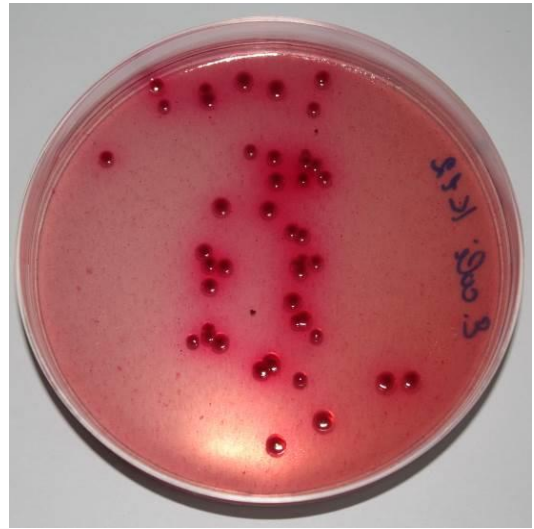
а



б



в

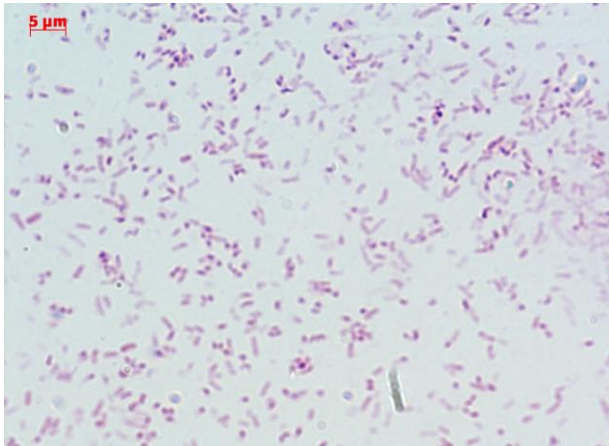


г

Рисунок 2 — Изучение типичных культурально-морфологических свойств штамма *E. coli* K12: а – морфология и размеры клеток, б – рост в ГРМ бульоне, в – колонии на ГРМ агаре, г – колонии на среде Эндо

По морфологии клетки указанного штамма представляли собой короткие грамотрицательные палочки с закругленными концами, размерами:  $0,82 \pm 0,15 \times 2,17 \pm 0,33$  мкм, которые располагались одиночно (Рисунок 3 а). На рисунке 3б показан обильный диффузный рост *E. coli* O1 с небольшим, легко разбивающимся сероватым осадком. На ГРМ агаре (Рисунок 3 в) вырастали гладкие мутные S-колонии с ровными краями 3-4 мм в диаметре. На среде Эндо – выпуклые розовые колонии до 4 мм в диаметре (Рисунок 3 г). Клетки *E. coli* O1 ферментировали маннит, малонат, глюкозу с образованием газа и сохраняли подвижность (Таблица 1).

Род *Pseudomonas*. В следующей серии экспериментов были использованы бактерии *P. aeruginosa* spp., который является представителем условно-патогенной микрофлоры, встречающейся в почве, воде, на растениях, в желудочно-кишечном тракте человека и животных. Её широкое распространение во внешней среде способствует легкому инфицированию людей и животных. В госпитальных учреждениях распространены эковары синегнойной палочки, как правило, высокоустойчивые к антибиотикам и антисептикам (Маянский, 1999). В экспериментах использовали два штамма *P. aeruginosa* 27533 и *P. aeruginosa* 27853. Согласно рисунку 4, а, клетки *P. aeruginosa* 27533 морфологически представляли собой типичные короткие подвижные грамотрицательные палочки с закругленными концами размерами  $0,59 \pm 0,02 \times 2,11 \pm 0,12$  мкм. На ГРМ агаре бактерии *P. aeruginosa* 27533 образовывали плоские слизистые колонии 3-5 мм в диаметре с ровными краями и сине-зеленым пигментом (Рисунок 4 б). Культура издавала запах, напоминающий аромат жасмина. В ГРМ бульоне бактерии *P. aeruginosa* 27533 росли диффузно с образованием пленки на поверхности (Рисунок 4 в). Типичные биохимические свойства штамма *P. aeruginosa* 27533, подтвержденные нами в процессе данного предварительного этапа исследования, представлены в таблице 1. Как и предполагалось, клетки этого штамма были подвижны, ферментировали



а



б

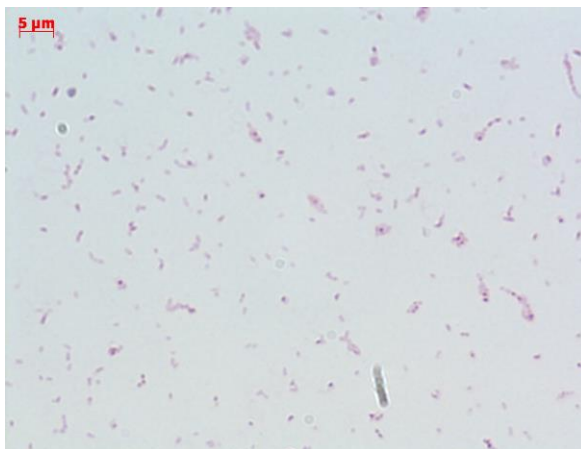


в

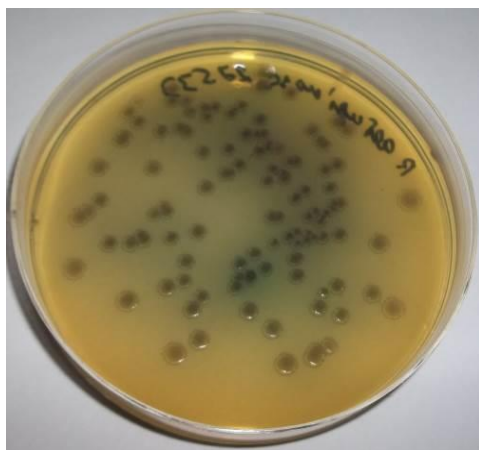


г

Рисунок 3 - Изучение типичных культурально-морфологических свойств штамма *E. coli* O: а – морфология и размеры клеток, б – рост в ГРМ бульоне, в – колонии на ГРМ агаре, г – колонии на среде Эндо



а



б



в

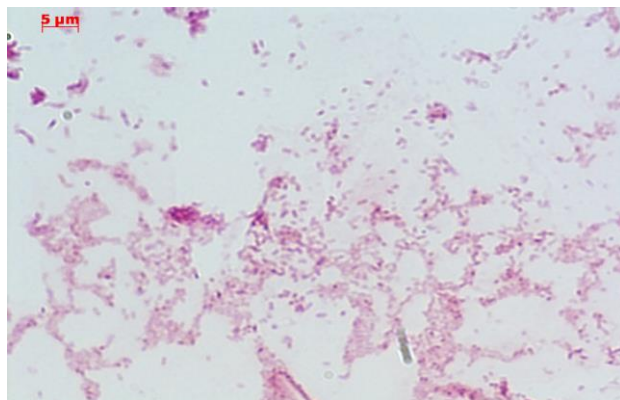
Рисунок 4 - Изучение типичных культурально-морфологических свойств штамма *P. aeruginosa* 27533: а – морфология и размеры клеток, б – колонии на ГРМ агаре, в – рост в ГРМ бульоне

глюкозу, лактозу, малонат, фенилаланин, лизин, образовывали сероводород и пигмент пиоцианин..

Дальнейшие исследования проводили с использованием бактерий штамма *P. aeruginosa* 27853. При посеве на твердые и жидкие питательные среды у микробных клеток *P. aeruginosa* 27853 была обнаружена типичная морфология для бактерий вида *P. aeruginosa*. Как видно на рисунке 5а, микроскопически они представляли собой грамтрицательные прямые палочки размерами  $0,61 \pm 0,03 \times 1,81 \pm 0,14$  мкм; которые в бульоне давали равномерное помутнение (Рисунок 5 б). При культивировании на Difco Vasto-agar в аэробных условиях при температуре 37 °С (Рисунок 5 в) образовывали круглые слизистые колонии до 3 мм в диаметре с ровными краями и зеленым пигментом. Штамм *P. aeruginosa* 27853 оказался гемолитически активен (Рисунок 5 г). В соответствии с паспортом штамма *P. aeruginosa* 27853, клетки были подвижны, ферментировали глюкозу, лактозу, маннит, малонат, фенилаланин, желатину, лизин, образовывали сероводород и продуцировали пигмент пиоцианин (Таблица 1).

Таким образом, клетки каждого из выбранных нами штаммов *E. coli* В6, *E. coli* О1, *E. coli* к12 и *P. aeruginosa* 27533, *P. aeruginosa* 27853 обладали типичными микробиологическими свойствами, и могли быть использованы как модельные при проведении экспериментов по отработке условий инактивации бактерий методом ФДВ.

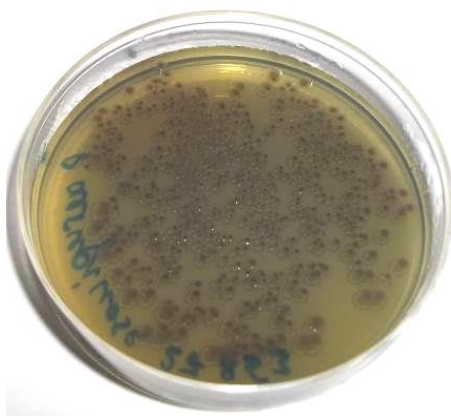
В ходе экспериментов инактивацию бактерий проводили методом ФДВ. Как известно, при ФДВ происходит повреждение биологических структур и нарушение их функций при поглощении света пигментом или красителем (акридины, антрахиноны, ряд порфиринов, рибофлавин, метиленовый синий и др.) в присутствии кислорода. Также известно, что к ФДВ чувствительны многие структуры на уровне организма, клетки и молекулы (Кару, 1985; Красновский (мл), 1990; Клебанов с соавт., 2001; Кару, 2003). Для повышения чувствительности



а



б



в



г

Рисунок 5 - Изучение типичных культурально-морфологических свойств штамма *P. aeruginosa* 27853: а – морфология и размеры клеток, б – рост в бульоне, в – колонии на Difco агаре, г – колонии на кровяном агаре

организмов (в частности микроорганизмов) к действию светового излучения применяют светочувствительные вещества фотосенсибилизаторы, к которым относят индоцианиновый зеленый, метиленовый синий, порфирины, аминолевулиновую кислоту, толуидин, тионин, фталоцианин и ряд других веществ (Большой энциклопедический словарь, 1999). При выборе фотосенсибилизатора и его базовых концентраций мы руководствовались результатами, которые изложены в работе Wilson et al. (1992), где показано действие лазерного излучения в комбинации с рядом экзогенных красителей на различные виды бактерий. В работе показано, что наиболее выраженное бактерицидное действие на все исследуемые бактерии оказывало лазерное излучение в комбинации с МС в концентрации 0,005%. Не менее важным мы посчитали тот факт, что в медицинской практике МС используют как антисептическое средство для наружного применения 1-3% спиртовой раствор, для промывания полостей и каналов – 0,02% водный раствор, для приема внутрь по 0,1 г 3-4 раза в день; при отравлениях окисью углерода, синильной кислотой, сероводородом назначают внутривенно 50-100 мл 1% водного раствора или 1% раствора в 25% растворе глюкозы; при отравлениях нитритами, анилином – внутривенно 0,1-0,15 мл 1% раствора на 1 кг массы тела (Машковский, 2005). В настоящее время МС используется в медицинской практике для проведения фотодинамической терапии (Брайцев., 1973; Посудин с соавт., 1982; Данилова с соавт., 1991; Кац с соавт., 1992; Коган с соавт., 1993; Странацко с соавт., 2001; Dougherty, 1988; Walsh, 1997). Учитывая вышеизложенный материал, для исследований в качестве фотосенсибилизатора нами был выбран краситель МС в концентрациях 0,05 %; 0,005 % и 0,0005 %.

При выборе длины волны облучения учитывали данные, опубликованные Диксон М., Уэбб Э. в 1982 году (Диксон, 1982), а в дальнейшем проиллюстрированные Наумовым С.А. с соавт. (2012) где показано, что максимум спектра поглощения раствора МС находится в красной области спектра от 640 до 670 нм (Рисунок 6).

Таким образом, для модельных экспериментов по инактивации бактерий методом ФДВ нами были отобраны штаммы бактерий *E. coli* В6, *E. coli* К 12, *E. coli* О 1, *P. aeruginosa* 27533 и *P. aeruginosa* 27853 с типичными микробиологическими свойствами; фотосенсибилизатор метиленовый синий в концентрациях 0,05 %; 0,005 % и 0,0005 %; лазерные диоды с длиной волны излучаемого света  $\lambda = 650$  нм, и световые диоды, с такой же длиной волны и шириной полосы излучения  $\lambda_{\Delta} = 10$  нм, лазер ( $\lambda = 630$  нм).

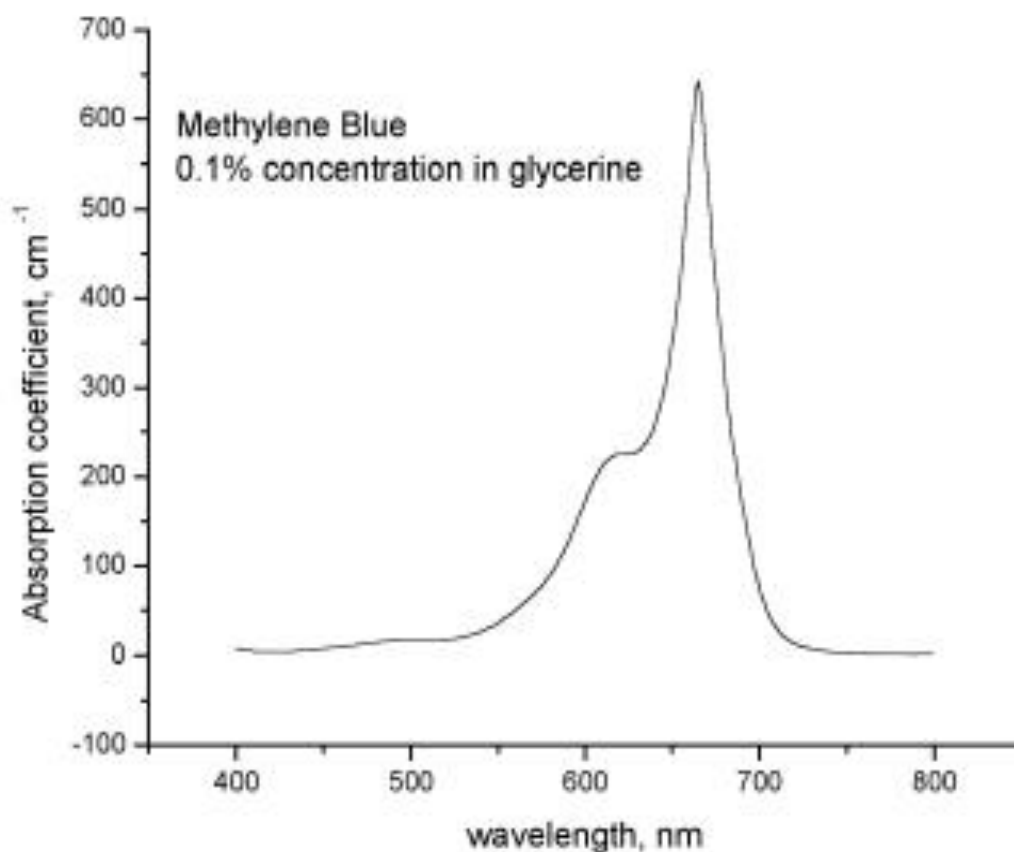


Рисунок 6 - Спектральные характеристики красителя метиленового синего  
(Наумов с соавт., 2012)



### 3.2. Разработка установки для инактивации бактерий методом фотодинамического воздействия *in vitro*

Сначала в экспериментах по ФДВ на бактерии *E. coli* В6 был использован один диод, что не позволило проводить серию опытов за короткий промежуток времени. Кроме того, нарушалась стандартность условий эксперимента. В связи с этим возникла объективная необходимость создания устройства, с помощью которого можно одновременно проводить опытные и контрольные исследования по инактивации бактерий методом ФДВ.

Для сбора установки использовали 96 луночные микропланшеты (МП). В МП № 1 вносили взвесь бактерий *E. coli* В6, предназначенную для инактивации, и раствор фотосенсибилизатора. МП № 2 представлял собой матрицу последовательно соединенных диодов, подключенную к источнику питания (Рисунок 7).

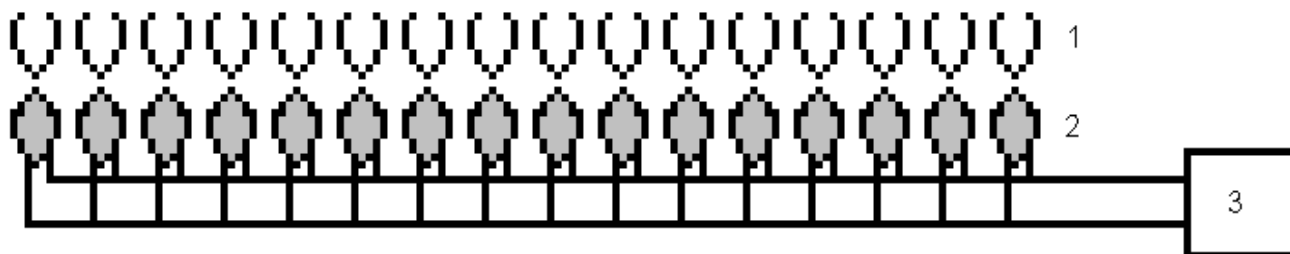


Рисунок 7 – Схема сконструированной установки для фотоинактивации бактерий *E. coli* В6 методом ФДВ: 1 – лунки микропланшета, содержащие взвесь бактерий *E. coli* В6 для облучения; 2 – лунки микропланшета с встроенными диодами; 3 – источник питания

Нами были собраны два варианта установки: в одном варианте источниками излучения служили лазерные диоды (ЛД) с длиной волны излучаемого света  $\lambda=650$  нм, во втором варианте – световые диоды (СД) с такой же длиной волны и шириной полосы излучения  $\Delta\lambda = 10$  нм. В эксперименте варьировали мощность излучения

( $P = 0,2; 0,6; 1$  мВт) и соответственно плотность мощности излучения ( $I = 1, 3, 5$  мВт/см<sup>2</sup>). Для проведения инактивации методом ФДВ в лунки МП № 1 вносили по 0,2 мл взвеси бактерий *E. coli* В6 и раствора МС в необходимой концентрации. Затем его размещали над МП № 2. Таким образом, каждая лунка МП № 1 была снабжена индивидуальным источником излучения с регулируемым током питания.

Сконструированная нами лабораторная установка позволяла воздействовать на бактериальные взвеси светом с любыми заданными параметрами. Не менее важным, на наш взгляд, являлась возможность при необходимости проводить замену матрицы, которая могла содержать диоды с различной длиной волны света и регулируемой мощностью излучения. Большим преимуществом установки является также возможность получения за один сеанс ФДВ препаративного количества (38,4 мл) инактивированной бактериальной взвеси. Этого объема должно быть достаточно для проведения экспериментальных микробиологических, серологических и биологических исследований.

Другим преимуществом установки является сохранение стерильных условий во время проведения ФДВ. Для защиты облучаемых бактерий от контаминации посторонней микрофлорой МП № 1 накрывали стерильной крышкой. Если в процессе облучения одной и той же взвеси потребуется получить образцы с различным временем воздействия света, то для этого требовалось, приподняв крышку, только извлечь содержимое лунки при помощи дозатора. При этом остальные образцы непрерывно находились под воздействием света.

Не менее важным, на наш взгляд, является компактность установки. Данные качества позволили использовать ее в боксе биологической безопасности (Рисунок 8 а) или в термостате с фиксированной температурой (Рисунок 8 б), в том случае если исследования требуют обеспечения режима облучения бактерий в процессе их роста. Малые габариты установки особенно важны в тех случаях, когда эксперименты проводят с облигатными анаэробами и культивирование микроорганизмов проходит в анаэроостате.



а



б

Рисунок 8 – Инактивация бактерий методом ФДВ в стерильных условиях бокса биологической безопасности (а); термостата (б)

Преимуществом предложенной нами установки является также то, что в термостат или анаэроустат можно поместить только занимающие малый объем планшеты с источником света и бактериальной взвесью, а все остальные составные части установки могут располагаться вне камеры.

### **3.3. Влияние различных концентраций метиленового синего на колониобразующую способность бактерий *E. coli spp.* и *P. aeruginosa spp.***

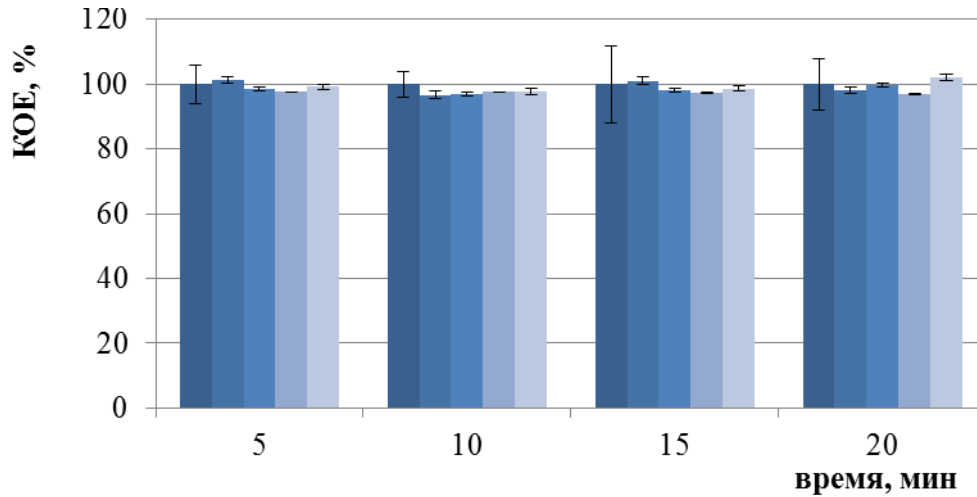
Оптимальных параметров ФДВ на бактерии *in vitro*, при которых все клетки теряли бы колониобразующую способность, в литературе нами не найдено. Поэтому в модельных экспериментах была предварительно проведена оценка зависимости количества КОЕ бактерий *E. coli* В6, *E. coli* К12, *E. coli* О1, *P. aeruginosa* 27533 и *P. aeruginosa* 27853 от: концентрации МС и, времени экспозиции взвесей указанных бактерий с МС.

В первой серии экспериментов определяли колониобразующую способность бактерий *E. coli* В6, *E. coli* К12, *E. coli* О1 и *P. aeruginosa* 27533 при экспозиции с

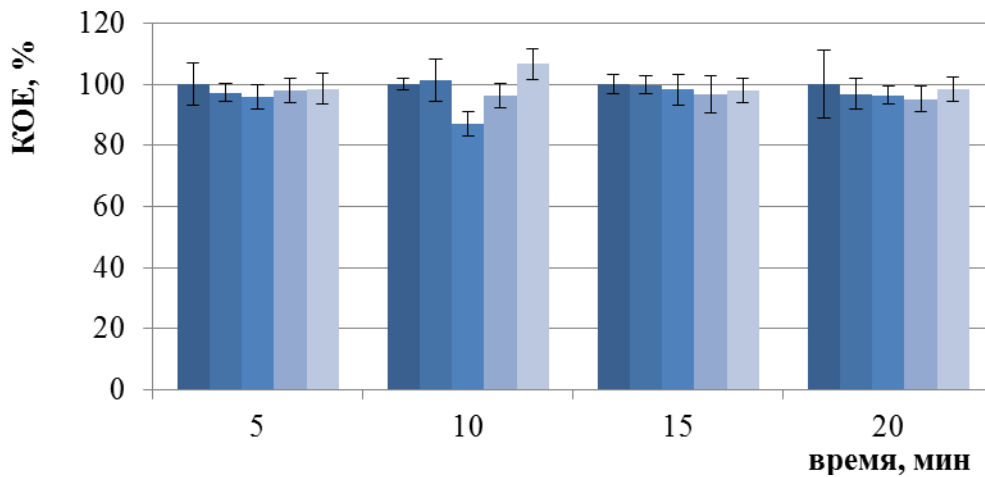
МС. Для этого готовили бактериальные взвеси в концентрации  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл. МС использовали в концентрациях 0,0005; 0,005; 0,05 %. Время экспозиции каждой бактериальной взвеси с МС варьировали от 5 до 20 мин. В опытные лунки МП № 1 вносили по 0,2 мл одной из взвеси 2-х суточных агаровых культур и по 0,2 мл МС в концентрациях 0,0005; 0,005; 0,05 %. В контрольные лунки вместо МС добавляли 0,2 мл физиологического раствора. После экспозиции в течение 5, 10, 15 или 20 мин взвеси из лунок разводили физиологическим раствором до содержания бактерий  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл и высевали в объеме 100 мкл на плотные питательные среды. После инкубации посевов в течение 48 ч при температуре 37 °С подсчитывали число КОЕ. Число выросших колоний выражали в процентах, количество КОЕ в контрольных чашках принимали за 100 %.

На рисунке 9 представлено количество КОЕ бактерий *E. coli* В6, *E. coli* К12, *E. coli* О1 и *P. aeruginosa* 27533 после экспозиции с МС различной концентрации. Как видно из представленных результатов концентрации МС 0,0005 % и 0,005 % не оказывали значимого бактерицидного действия на клетки бактерий *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* 27533 (Рисунок 9 а, б). МС в концентрации 0,05 % также незначительно подавлял рост бактерий *E. coli* spp. после экспозиции в течение 5 мин. При контакте бактерий с МС в течение 10, 15 и 20 мин число КОЕ снижалось, по сравнению с контрольными значениями (100 %): штамма *E. coli* В6 ( $49 \pm 6$  % – 20 мин), штамма *E. coli* К12 ( $51 \pm 4$  % – 10 мин), штамма *E. coli* О1 ( $47 \pm 5$  % – 15 мин). Бактерии *P. aeruginosa* 27533 были более устойчивы к действию МС, так максимальное достоверное снижение числа КОЕ отмечалось лишь до  $79 \pm 5$  % через 10 мин экспозиции с МС (Рисунок 9 в).

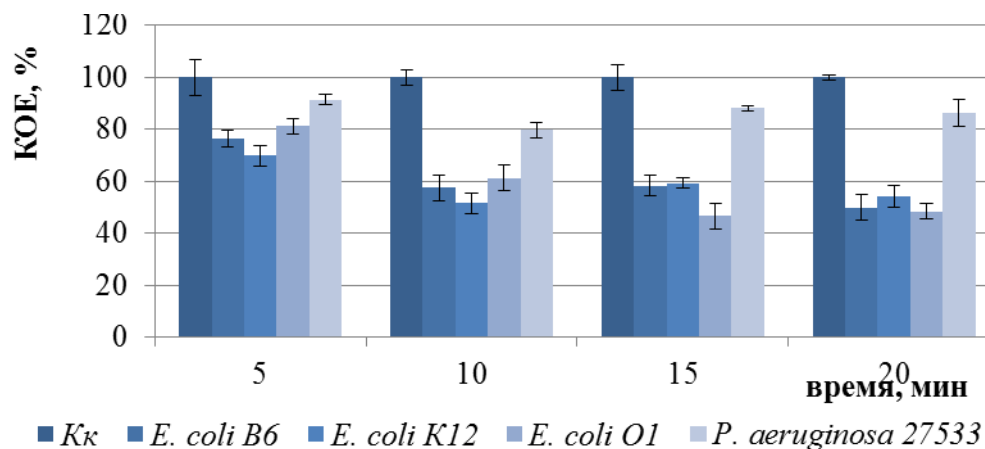
Так как МС в испытуемых концентрациях (0,0005; 0,005; 0,05 %) не вызывали выраженного угнетения роста бактерий *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp., было принято решение использовать их в экспериментах по инаktivации бактерий методом ФДВ.



а



б



в

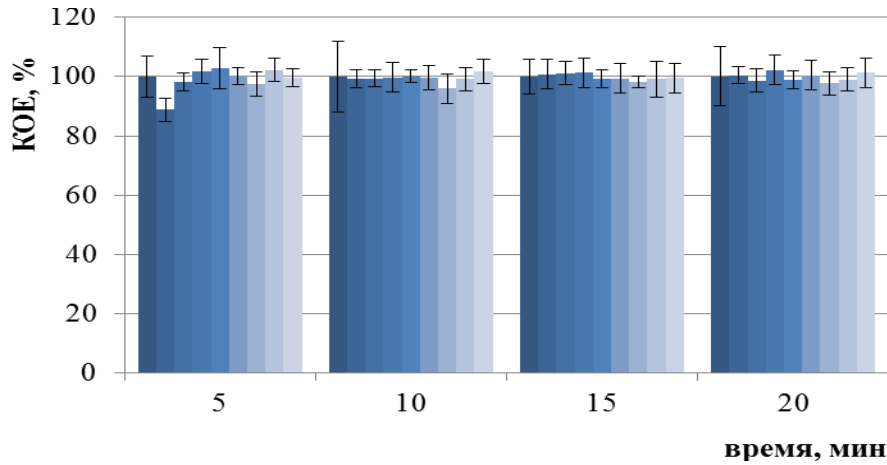
Рисунок 9 - Изменение числа КОЕ бактерий *E. coli* B6, *E. coli* K12, *E. coli* O1 и *P. aeruginosa* 27533 после экспозиции с МС в концентрациях 0,0005 % (а); 0,005 % (б); 0,05 % (в), в течение 5-20 мин: Кк - контроль культуры

### 3.4. Влияние на колониобразующую способность бактерий

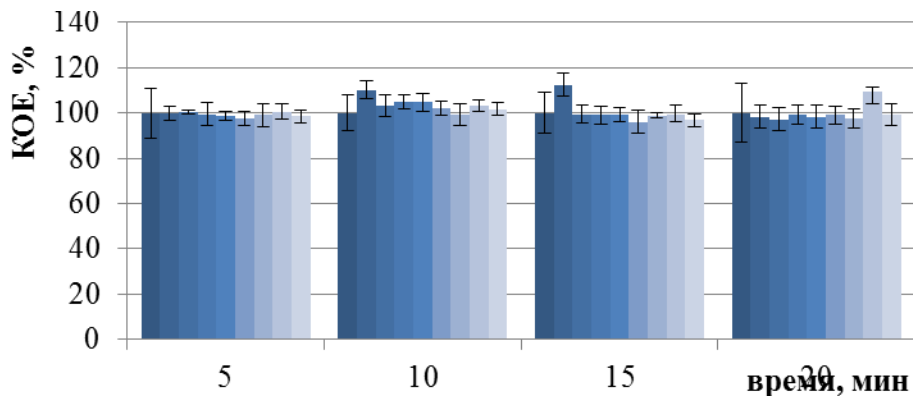
#### *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp. красного излучения разных источников

Во второй серии экспериментов определяли количество КОЕ бактерий *E. coli* В6, *E. coli* К12, *E. coli* О1 и *P. aeruginosa* 27533 после воздействия красного излучения. Использовали, как и в первой серии опытов, 2-х суточные агаровые культуры указанных штаммов бактерий в концентрации  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл. В эксперименте сравнивали действие лазерных и световых диодов, используя матрицы с лазерными диодами – ЛД ( $\lambda = 650$  нм) или световыми диодами – СД ( $\lambda = 650 \pm 10$  нм). Облучение проводили на созданной нами установке в течение 5, 10, 15 или 20 мин. Меняли плотность мощности излучения  $I=1$ ; 3 или 5 мВт/см<sup>2</sup>. Для постановки контроля использовали необлученные взвеси бактерий.

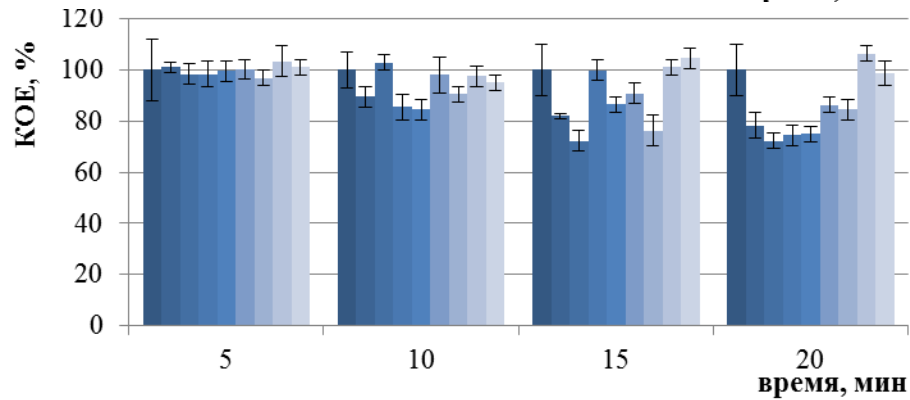
В лунки МП № 1 вносили по 0,2 мл исследуемой бактериальной взвеси и добавляли по 0,2 мл физиологического раствора (вместо 0,2 мл МС для сохранения объема облучаемой взвеси). После облучения взвесь из лунки разводили до содержания  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл, затем 100 мкл этой взвеси высевали на плотную питательную среду и инкубировали при температуре 37 °С. Через 48 ч учитывали рост КОЕ. Анализ действия ЛД и СД излучений представлен на рисунке 10. Число КОЕ бактерий *E. coli* В6, *E. coli* К12, *E. coli* О1 и *P. aeruginosa* 27533 находилось в пределах контрольных значений после воздействия ЛД или СД ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>) в течение 5, 10, 15 или 20 мин (Рисунок 10 а). Стимуляцию роста клеток *E. coli* В6 вызвало облучение ЛД ( $I = 3$  мВт/см<sup>2</sup>) в течение 10 и 15 мин; число КОЕ увеличивалось до  $110 \pm 5$  и  $112 \pm 5$  % соответственно. После воздействия излучения ЛД в течение 20 мин отмечалось незначительное повышение числа КОЕ *P. aeruginosa* 27533 –  $109 \pm 5$  % ( $I = 3$  мВт/см<sup>2</sup>) (Рисунок 10 б);  $106 \pm 3$  % ( $I = 5$  мВт/см<sup>2</sup>) (Рисунок 10 в). Как видно на рисунке 10, в, достоверно значимое снижение количества КОЕ зарегистрировано при облучении ЛД ( $I=5$  мВт/см<sup>2</sup>) в течение 20 мин: *E. coli* В6 –  $78 \pm 5$  %; *E. coli* К12 –  $75 \pm 4$  %; *E. coli* О1  $86 \pm 3$  %. Подавляло



а



б



в

Рисунок 10 - Изменение числа КОЕ бактерий *E. coli* B6, *E. coli* K12, *E. coli* O1 и *P. aeruginosa* 27533 после облучения лазерными (ЛД) или световыми диодами (СД) с заданной плотностью мощности:  $I=1$  мВт/см<sup>2</sup> (а);  $I=3$  мВт/см<sup>2</sup> (б);  $I=5$  мВт/см<sup>2</sup> (в):

Кк - контроль культуры

размножение бактерий и СД облучение ( $I = 5$  мВт/см<sup>2</sup>), вызывая снижение числа КОЕ бактерий: *E. coli* В6 ( $72 \pm 4$  % – 15 и 20 мин); *E. coli* К12 ( $84 \pm 4$  % – 10 мин,  $87 \pm 3$  % - 15 мин,  $75 \pm 3$  % – 20 мин); *E. coli* О1 ( $76 \pm 6$  % – 15 мин,  $84 \pm 4$  % – 20 мин) (Рисунок 10 в).

В результате изучения изменения числа КОЕ бактерий *E. coli spp.* и *P. aeruginosa* 27533 при облучении ЛД и СД выявлено, что как стимуляция так и подавление роста исследуемых бактерий, зависят от изменения плотности мощности красного фотодиодного излучения и времени облучения бактерий. Полного отсутствия роста исследуемых бактерий не наблюдалось и закономерности воздействия фотодиодного излучения на размножение бактерий не выявлено.

В связи с тем, что воздействие как световыми так и лазерными диодами не вызывало значительного снижения числа КОЕ бактерий *E. coli spp.* и *P. aeruginosa* 27533, то для дальнейших исследований инактивации этих штаммов методом ФДВ использовали в лабораторной установке оба вида фотодиодов.

### **3.5. Влияние на колониобразующую способность бактерий *E. coli spp.* и *P. aeruginosa spp.* фотодинамического воздействия**

Далее были проведены исследования по оценке колониобразующей способности бактерий *E. coli* В6, *E. coli* К12, *E. coli* О1 и *P. aeruginosa* 27533 после инактивации методом ФДВ в двух вариантах на сконструированной нами установке: с использованием лазерных или световых диодов. В экспериментах меняли плотность мощности облучения ( $I = 1; 3$  или  $5$  мВт/см<sup>2</sup>), концентрацию метиленового синего (МС = 0,05; 0,005; 0,0005 %) и время облучения (от 5 до 20 мин). Параллельно с опытом проводили три контрольных исследования: в первом - контроль количества КОЕ бактериальной взвеси; во втором - число КОЕ бактериальной взвеси после экспозиции только с МС; в третьем – учитывали количество КОЕ культур клеток



после облучения ЛД или СД, исключая действие фотосенсибилизатора. Результаты проведенных экспериментов представлены на рисунках 11-14.

Достоверное снижение числа КОЕ *E. coli* В6 отмечали после ФДВ ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 0,0005 %) через 5 мин до  $81 \pm 4$  % (ЛД) и  $86 \pm 5$  % (СД) (Рисунок 11 а); через 20 мин - до  $44 \pm 4$  % (ЛД) и  $31 \pm 5$  % (СД) (Рисунок 11 б). При увеличении плотности мощности излучения до  $I = 3$  мВт/см<sup>2</sup> и концентрации МС = 0,05 %, наименьшее количество КОЕ *E. coli* В6 было зарегистрировано после ФДВ через 15 мин –  $50 \pm 5$  % (ЛД) и  $52 \pm 5$  % с (СД) (Рисунок 11 в). Дальнейшее увеличение  $I = 5$  мВт/см<sup>2</sup> привело к угнетению роста бактерий *E. coli* В6 после ФДВ в присутствии МС = 0,005 % при облучении ЛД в течение 15 мин –  $36 \pm 3$  %; и СД в течение 20 мин –  $55 \pm 8$  % (Рисунок 11 б).

Анализ колониеобразующей способности бактерий штамма *E. coli* К12 после ФДВ показал, что на количество КОЕ оказывают влияние как СД, так и ЛД. Снижение числа КОЕ происходило после облучения ЛД ( $I = 3$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 0,05 %) в течение 15 мин –  $42 \pm 2$  % (Рисунок 12 в). Выраженное угнетение роста бактерий *E. coli* К12 до КОЕ =  $38 \pm 4$  % отмечали после 20 мин ФДВ ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 0,005 %) при использовании в установке СД (Рисунок 12 б). В остальных случаях ФДВ клетки штамма *E. coli* К12 были более устойчивы к ФДВ.

Выявлено подавление роста бактерий штамма *E. coli* О1, КОЕ =  $35 \pm 4$  %, вызванное облучением ЛД ( $I = 5$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 0,05 %) в течение 15 мин (Рисунок 13 в). Более чем на 40 % снижался рост изучаемых бактерий при облучении СД ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 0,005 %) в течение 20 мин – КОЕ =  $38 \pm 1$ ; и в течение 15 мин ( $I = 5$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 0,05 %) – КОЕ =  $29 \pm 5$  % (Рисунок 13 б, в). Было отмечено также снижение числа КОЕ *E. coli* О1 через 20 мин после воздействия СД ( $37 \pm 1$  %) или ЛД ( $49 \pm 3$  %) плотностью мощности 1 мВт/см<sup>2</sup> в присутствии МС = 0,05 %.

Рост бактерий штамма *P. aeruginosa* 27533 наиболее эффективен, но снижался через 15 мин ФДВ ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 0,005 %) при использовании в установке как ЛД (КОЕ =  $38 \pm 4$  %), так и СД ( $44 \pm 4$  %) (Рисунок 14 б).

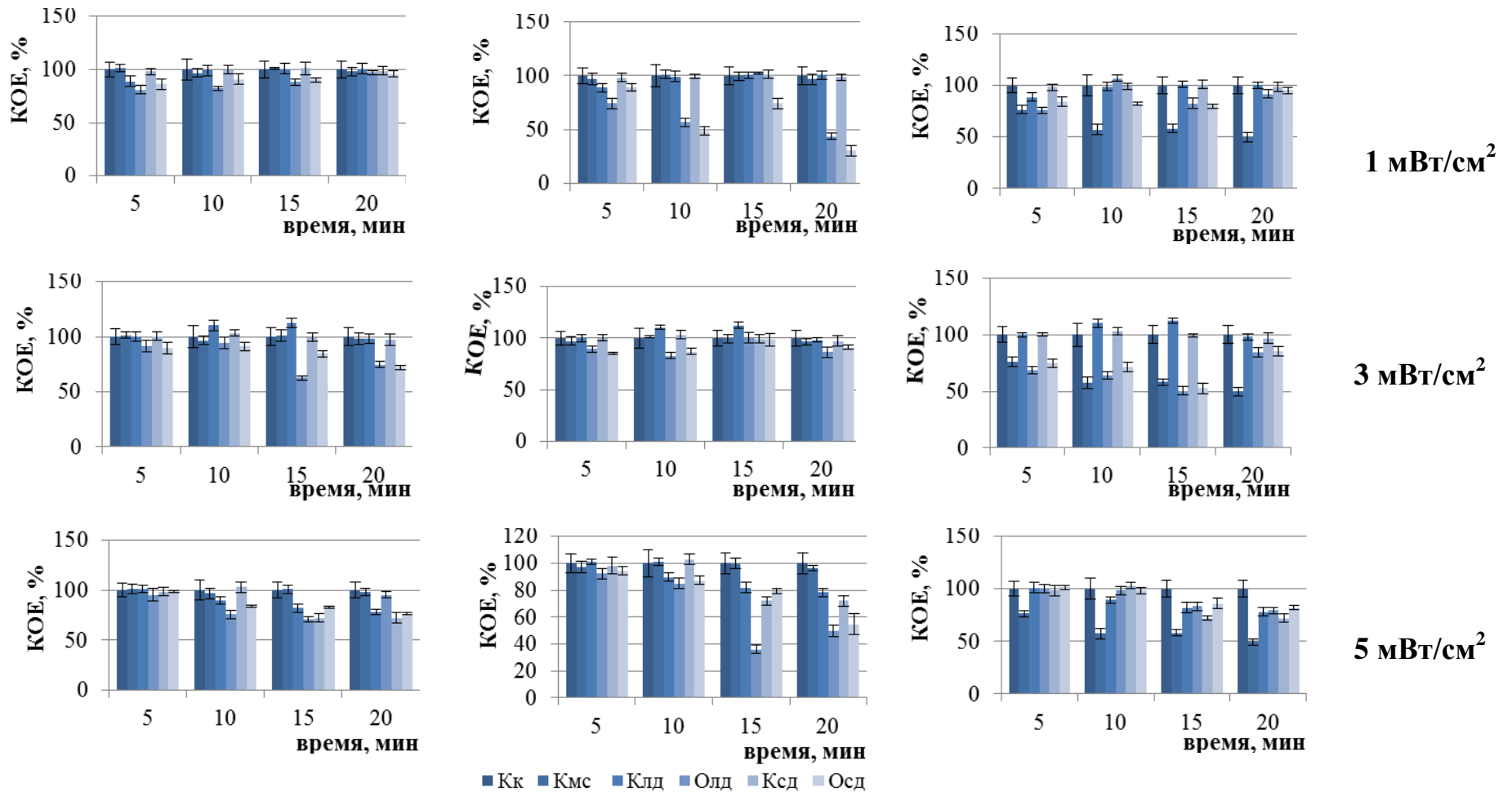


Рисунок 11 – Изменение числа КОЕ бактерий *E. coli* В6 после ФДВ с использованием лазерных диодов (Олд) или световых диодов (Осд) с заданной концентрацией МС: 0,0005 % (а); 0,005 % (б); 0,05 % (в): Кк – контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Клд – контроль облучения лазерными диодами; Ксд – контроль облучения световыми диодами

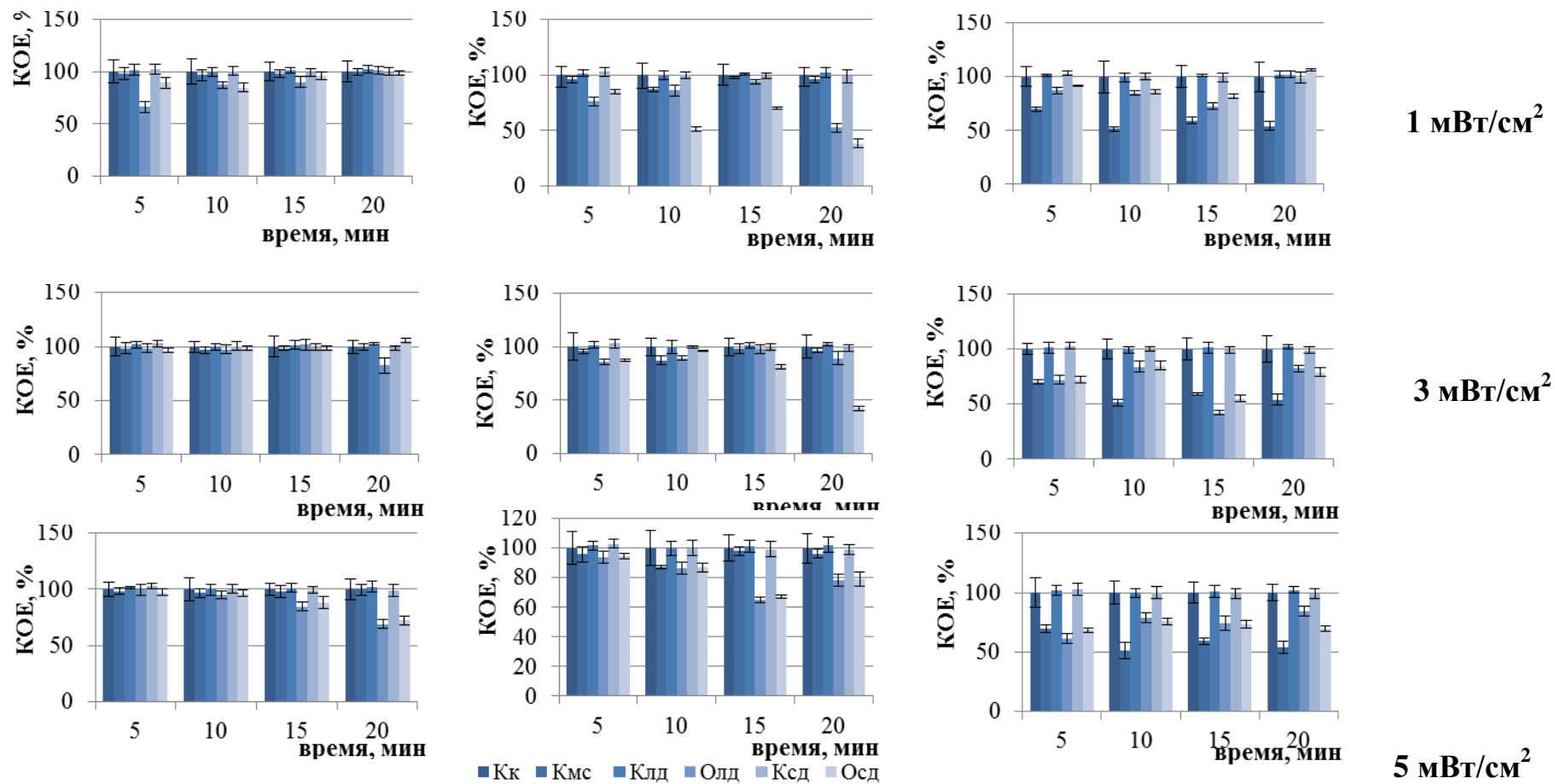


Рисунок 12 – Изменение числа КОЕ бактерий *E. coli* K12 после ФДВ с использованием лазерных диодов (Олд) или световых диодов (Осд) с заданной концентрацией МС: 0,0005 % (а); 0,005 % (б); 0,05 % (в): Кк – контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Клд – контроль облучения лазерными диодами; Ксд – контроль облучения световыми диодами

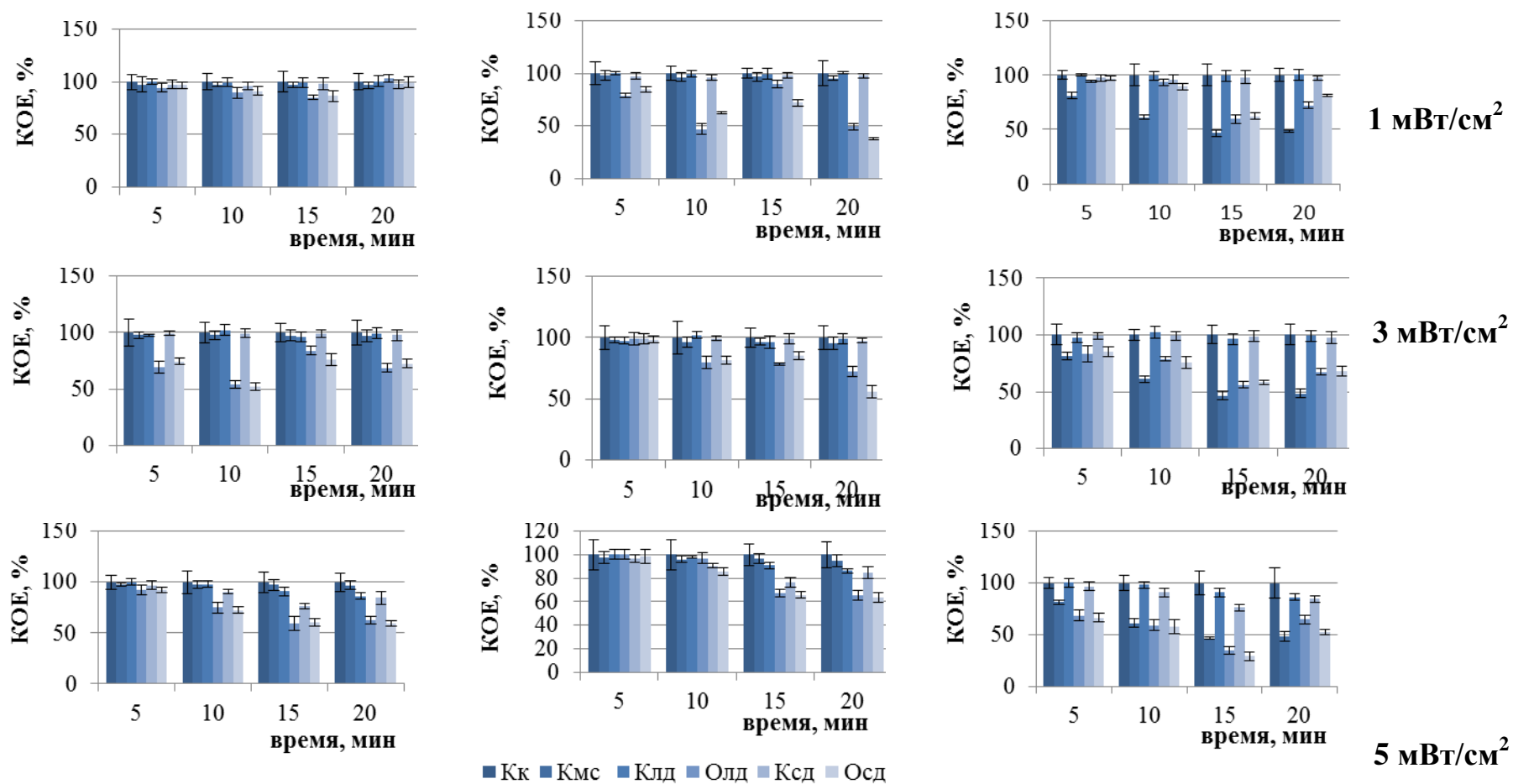


Рисунок 13 – Изменение числа КОЕ бактерий *E. coli* O1 после ФДВ с использованием лазерных диодов (Олд) или световых диодов (Осд) с заданной концентрацией МС: 0,0005 % (а); 0,005 % (б); 0,05 % (в): Кк – контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Клд – контроль облучения лазерными диодами; Ксд – контроль облучения световыми диодами

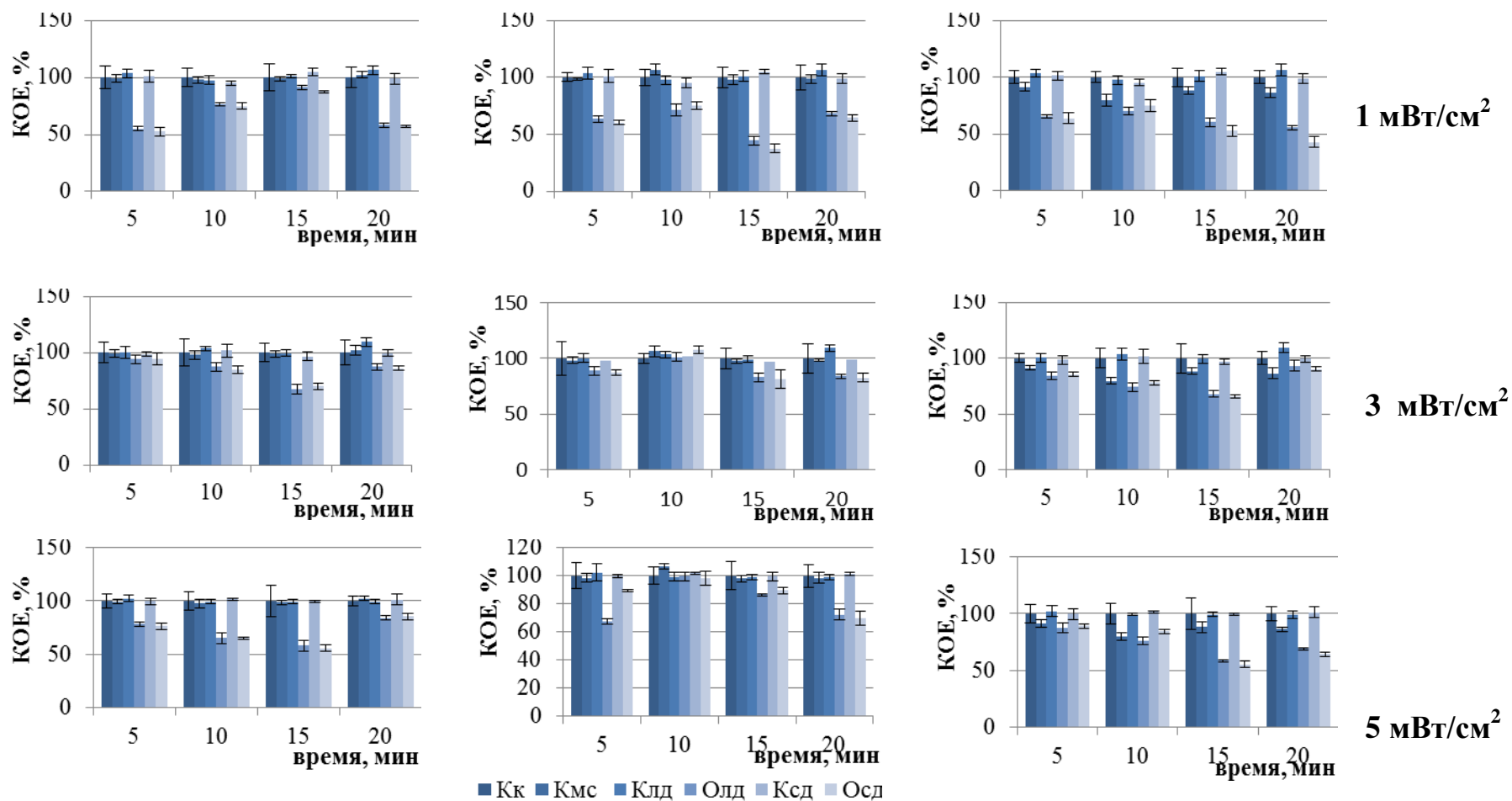


Рисунок 14 – Изменение числа КОЕ бактерий *P. aeruginosa* 27533 после ФДВ с использованием лазерных диодов (Олд) или световых диодов (Осд) с заданной концентрацией МС: 0,0005 % (а); 0,005 % (б); 0,05 % (в): Кк – контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Клд – контроль облучения лазерными диодами; Ксд – контроль облучения световыми диодами

В следующей серии экспериментов была изучена колониеобразующая способность бактерий штамма *P. aeruginosa* 27853 после ФДВ с использованием красного лазера ( $\lambda = 630$  нм,  $P = 40$  мВт,  $I = 200$  мВт/см<sup>2</sup>) и метиленового синего в двух концентрациях (0,5 и 5 %), инактивацию проводили в течение 10, 15 и 20 мин. В таблицах 2 и 3 представлены результаты опытов в сравнении с контрольными значениями числа КОЕ интактной культуры, на которую воздействовали только лазерным излучением или только МС.

Таблица 2 – Изменение числа КОЕ бактерий *P. aeruginosa* 27853 после ФДВ ( $I = 200$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 0,5 %), %

Время облучения, мин	Контроль культуры	Контроль облучения культуры без МС	Контроль культуры с 0,5% МС без облучения	Опыт, ФДВ
10	100	66 ± 4	67 ± 3	3 ± 0,4
15	100	60 ± 4	65 ± 2	2 ± 0,1
20	100	55 ± 4	72 ± 3	3 ± 0,4

Таблица 3 – Изменение числа КОЕ бактерий *P. aeruginosa* 27853 после ФДВ ( $I = 200$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 5 %), %

Время облучения, мин	Контроль культуры	Контроль облучения культуры без МС	Контроль культуры с 5% МС без облучения	Опыт, ФДВ
10	100	66 ± 4	51 ± 3	44 ± 3
15	100	60 ± 4	49 ± 1	38 ± 1
20	100	55 ± 4	48 ± 2	29 ± 2

Показано, что минимальное количество КОЕ =  $2 \pm 0,1$  % было при ФДВ на клетки *P. aeruginosa* 27853 в течение 15 мин с использованием МС в концентрации 0,5 % (Таблица 2). При повышении концентрации фотосенсибилизатора до 5 % число КОЕ, указанных бактерий, снижалось лишь до  $29 \pm 2$  % (Таблица 3).

В результате проведенных экспериментальных исследований по инактивации бактерий *E. coli* В6, *E. coli* К12, *E. coli* О1, *P. aeruginosa* 27533 и *P. aeruginosa* 27853 выявлено, что на снижение/увеличение числа КОЕ влияют изменения: источников облучения (лазер, лазерные или световые диоды); концентрации фотосенсибилизатора (МС = 0,0005; 0,005; 0,05; 0,5; 5 %); плотности мощности излучения (1, 3, 5, 200 мВт/см<sup>2</sup>), а также времени облучения (5, 10, 15, 20 мин). В ходе исследований полной инактивации культур не зарегистрировано и не выявлено закономерностей снижения/повышения числа КОЕ, в зависимости от параметров ФДВ.

Как показали проведенные исследования, на колониобразующую способность бактерий *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp. при проведении инактивации влияют различные параметры ФДВ, которые подобрать эмпирическим путем чрезвычайно сложно и для этого потребуются весьма продолжительное время. Поэтому, нами было принято решение провести анализ взаимодействия бактериальных клеток и лазерного излучения, построить математическую модель их взаимодействия для определения оптимальных параметров ФДВ, при которых будет происходить 100 % инактивация бактерий.

### **3.6. Оптимизация условий инактивации бактерий *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp. методом фотодинамического воздействия (математическое моделирование)**

В предварительных экспериментах было рассмотрено влияние фотосенсибилизатора МС, лазерного и фотодиодного излучений, а также ФДВ на рост бактерий *E. coli* В6, *E. coli* К12, *E. coli* О1, *P. aeruginosa* 27533,

*P. aeruginosa* 27853. При проведении указанных экспериментов 100 % инактивации бактериальных клеток не зарегистрировано. Для выбора оптимальных условий инактивации клеток необходимо провести исследование влияния бактерий на статистические характеристики спекл-полей (размер и контраст спеклов), формирующихся внутри концентрированных бактериальных взвесей под действием лазерного излучения (ЛИ). Свет лазера отличается от остального оптического излучения высокой степенью монохроматичности и пространственной когерентности. При рассеянии ЛИ на бактериальных клетках во взвеси дифракционная картина состоит из большого количества пятен случайной формы и размеров, которые хаотически расположены в пространстве – это лазерные спеклы. Если рассеяние ЛИ происходит на движущихся рассеивателях (например, бактериальных клетках, участвующих в броуновском движении), то очертания и форма спеклов непрерывно видоизменяются, а реализации спекл-поля постоянно сменяют одна другую; при этом интенсивность рассеянного поля флуктуирует во времени в любой точке пространства. Это называется динамикой спеклов. В работе было установлено, что все специфические механизмы взаимодействия ЛИ с живыми бактериями в первую очередь следует связывать не со спектральными характеристиками биообъекта и длиной волны лазера, а именно с динамикой короткоживущих биоспеклов.

*Моделирование процессов формирования биоспеклов внутри бактериальных взвесей*

Проведено экспериментальное исследование процессов формирования биоспеклов внутри бактериальных взвесей различной концентрации. Для этого использовали модельные образцы. Движущиеся бактерии имитировали водной суспензией интралипида, которую добавляли в агар. Чтобы выявить средний размер биоспеклов, необходимо было остановить броуновское движение. В этом случае в агар добавляли диоксид титана. Рассеивающие характеристики модельных образцов варьировали изменением концентрации интралипида и диоксида титана.



На рисунке 15 представлена схема экспериментальной установки, с помощью которой регистрировали и обрабатывали флуктуации интенсивности биоспеклов с чрезвычайно широким спектром в модельных образцах в режиме реального времени. Регистрация и обработка измеряемого сигнала проводилась с помощью пакета LabView 8.5.

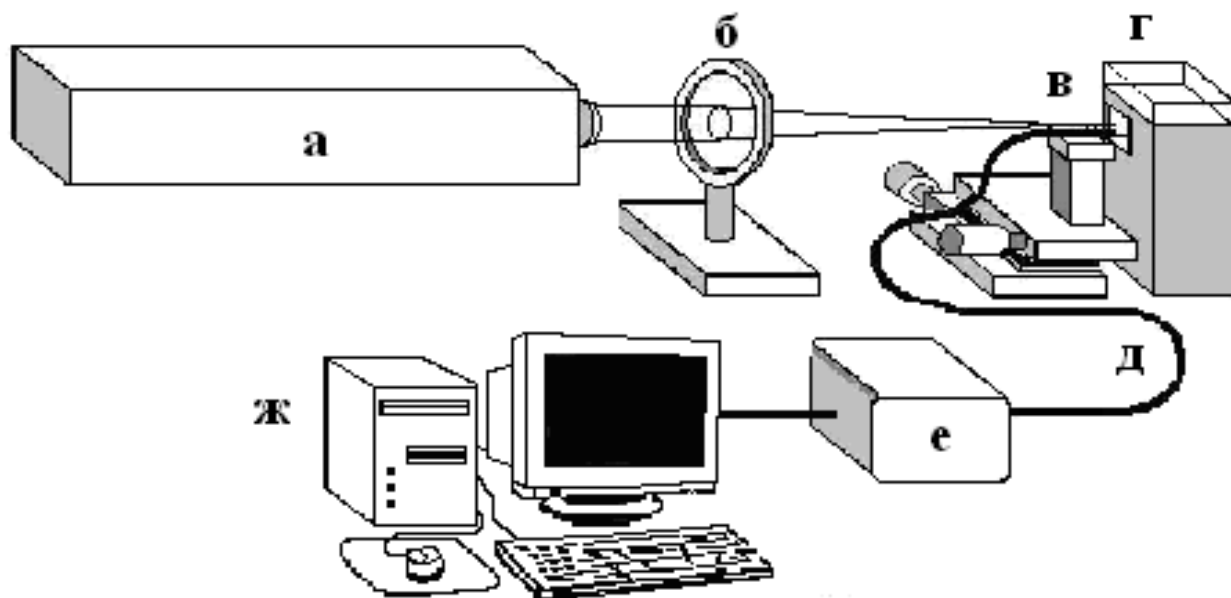


Рисунок 15 – Схема экспериментальной установки для регистрации и обработки флуктуаций интенсивности биоспеклов: а – He-Ne лазер ( $P_{\text{макс.}} = 5\text{ мВт}$ ,  $\lambda = 633\text{ нм}$ ,  $d = 1\text{ мм}$ ); б – собирающая линза с фокусным расстоянием 250 мм; в – сфокусированный лазерный пучок; г – кювета с рассеивающей взвесью; д – детектирующее оптическое волокно, соединенное с фотоприемником PDA-10 (Thorlab, США); е – двухканальная плата АЦП NI USB-5133, 8 бит, полоса 50 МГц (National Instruments, США); ж – компьютер

В ходе экспериментальных исследований были получены данные, характеризующие временные масштабы флуктуаций интенсивности спекл-полей внутри модельных образцов бактериальных взвесей различной концентрации.

Установлено, что «время жизни» спеклов определяется эффективным числом рассеивателей, т.е. концентрацией бактериальных клеток в облучаемой взвеси. На рисунке 16 представлена зависимость временных масштабов флуктуаций интенсивности спекл-поля внутри модельных образцов концентрированных бактериальных взвесей от эффективного числа рассеивателей в среде. С учетом того, что средние размеры клеток (0,6 x 2 мкм) заметно превышают длину волны красного света (650 нм), то при концентрациях бактериальных клеток до  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл эффектами многократного когерентного рассеяния можно пренебречь. В этом случае число эффективных рассеивателей в единице объема может быть принято равным концентрации бактериальных клеток во взвеси.

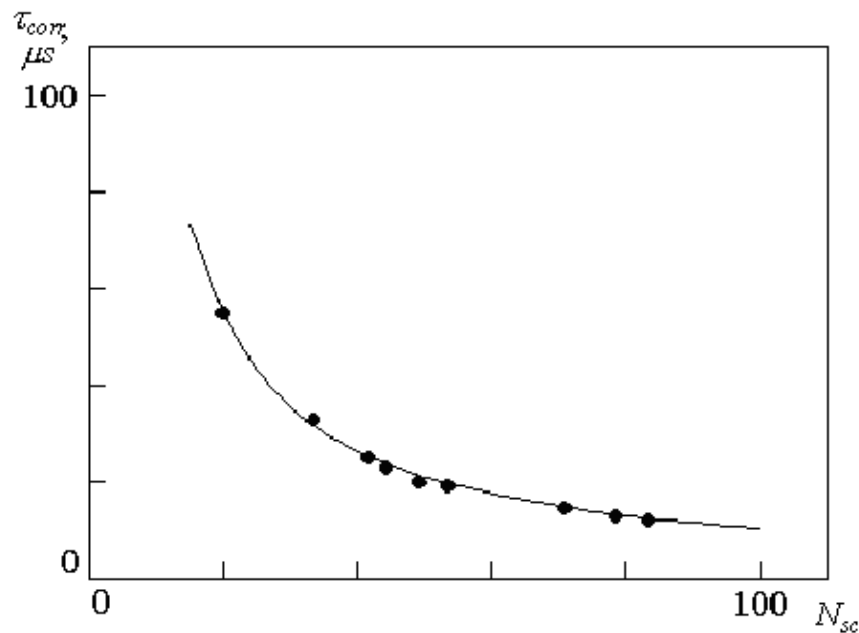


Рисунок 16 – Зависимость времени корреляции  $\tau_{corr}$  флуктуаций биоспеклов от эффективного числа рассеивателей ( $N_{sc}$ ) в среде

Таким образом, характерное среднее время флуктуаций спеклов, при котором происходит наиболее эффективное ФДВ на бактериальные клетки, может быть задано выбором соответствующей концентрации бактериальных клеток.

Экспериментальные данные находятся в хорошем соответствии с теоретическими результатами, расхождение составляет менее 3 %.

*Влияние концентрации клеток E. coli spp. и P. aeruginosa spp. на размер биоспеклов*

Учитывая, что размеры бактериальных клеток штаммов *E. coli* В6, *E. coli* К12, *E. coli* О1, *P. aeruginosa* 27533, *P. aeruginosa* 27853 близки, дальнейшие теоретические и экспериментальные исследования проводили на бактериях штаммов *E. coli* В6 и *P. aeruginosa* 27533.

Размеры спеклов, формирующихся внутри бактериальных взвесей *E. coli* В6 и *P. aeruginosa* 27533 при ФДВ измеряли методом спекл-микроскопии высокого пространственного разрешения. На рисунке 17 дано изображение спекл-микроскопа (а) и его схема (б).

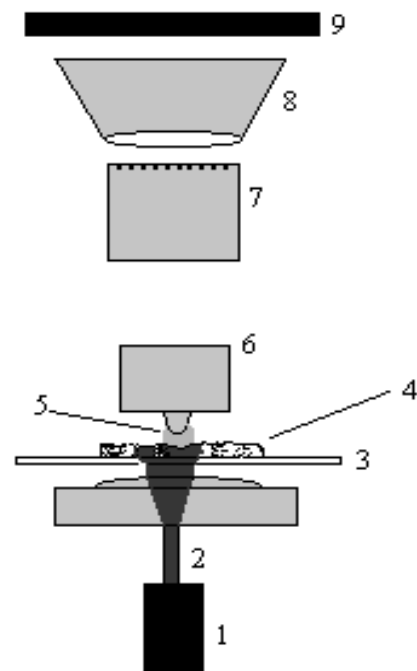
Для устранения эффектов, связанных с броуновским движением клеток, бактерии помещали в оптически прозрачный 1 % агар при температуре 45 °С. При затвердевании агара броуновское движение прекращалось, а жизнеспособность бактерий сохранялась, форма и размеры клеток не нарушались.

Типичное изображение спекл-поля, формирующегося после прохождения когерентного излучения через неподвижные бактериальные клетки, зафиксированные в застывшем агаре и флуктуации интенсивности спекл-поля показаны на рисунках 18 и 19 соответственно.

Представлены сглаженные данные, отражающие крупномасштабную амплитудную модуляцию зарегистрированного спекл-поля. Сглаживание проводилось с помощью свертки с прямоугольным окном. Область, по которой проводилось осреднение, имела размеры 70x70 пикселей. После удаления найденного двумерного тренда вычисляли автокорреляционную функцию



а



б

Рисунок 17 – Спекл-микроскоп для измерения размеров спеклов, формирующихся в бактериальной взвеси: а – общий вид; б – схема: 1 – освещающий лазерный пучок (мощность 3 мВт, длина волны 650 нм); 2 – конденсор; 3 – столик микроскопа; 4 – бактериальные клетки в застывшем агаре (толщина образцов 4 мм); 5 – капля иммерсионного масла; 6 – 90-кратный микрообъектив с апертурой 1.25; 7 – окуляр-микрометр; 8 – система формирования изображения, сопряженная с плоскостью CMOS камеры; 9 – CMOS камера Phoenix PC 1280 USB Digital Camera (MuTech, США)

пространственных флуктуаций интенсивности спеклов. Длина, на которой нормированная корреляционная функция спадает в 2.73 раза, что соответствует половине среднего размера спекла в сформировавшейся дифракционной картине.

Как показали результаты исследований спекл-поля методом спекл-микроскопии, корреляционная функция пространственного распределения интенсивности имеет вид дельта-функции. Это означает, что спекл-микроскопия не позволяет произвести точные измерения размеров спеклов, а позволяет провести лишь приближенную

оценку. Средние размеры спеклов, образующихся в бактериальных взвешах концентрацией  $10^7$ – $10^9$  м.к./мл, меньше или равны длине волны когерентного излучения, использованного в микроскопе, и составляют порядка 650 нм.



Рисунок 18 – Спекл-поле, наблюдаемое в когерентном микроскопе при рассеянии когерентного света на неподвижных бактериальных клетках

*Влияние концентрации клеток *E. coli* B6 и *P. aeruginosa* 27533 на контраст биоспеклов*

Как было показано в предыдущем разделе, измерения с помощью спекл микроскопа позволяют лишь утверждать, что размеры формирующихся спеклов соизмеримы с длиной волны излучения. В свою очередь это означает, что CMOS или CCD камеры работают в режиме пространственного интегрирования спеклов по апертуре каждой ячейки (пикселя) камеры. Как следует из результатов исследований

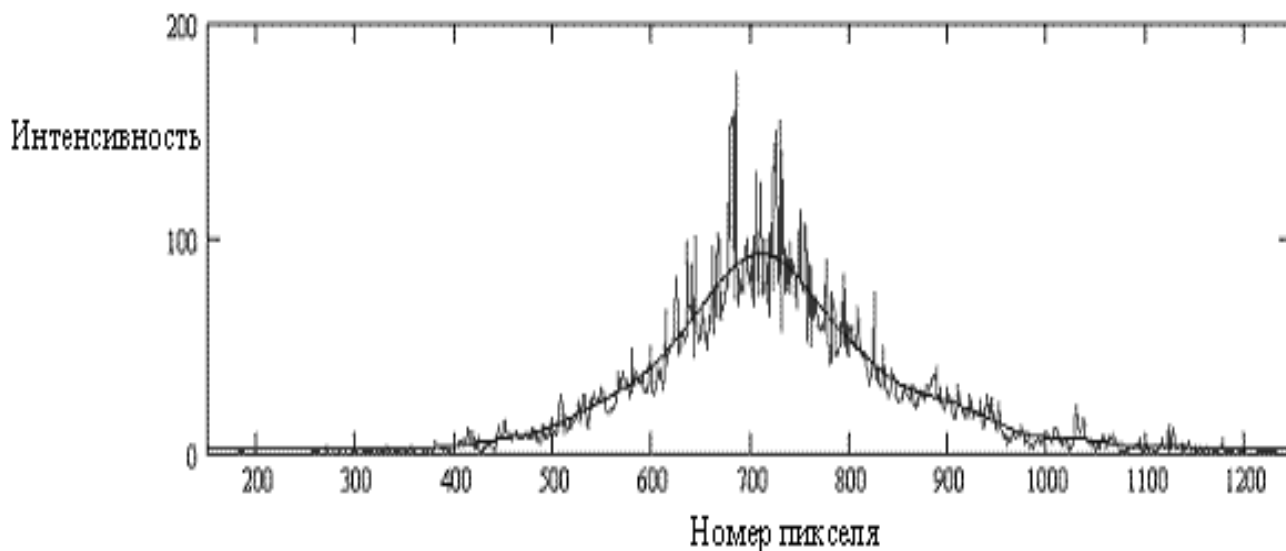


Рисунок 19 – Флуктуации интенсивности спекл-поля (одна линия из двумерного изображения)

представленных в монографии (Гудмен, 1988), в этом случае, измерения дают заниженные значения контраста спеклов, измеренное значение контраста равно:

$$C_{\text{измер}} = \frac{C_{\text{ист}}}{\sqrt{N}}, \quad (1)$$

где  $C_{\text{измер}}$  – измеренное значение контраста;  $C_{\text{ист}}$  – истинное значение контраста;  $N$  – среднее количество спеклов, попадающих в апертуру каждой ячейки камеры.

Поэтому, для определения истинного значения контраста вместо спекл-микроскопа была использована установка (Рисунок 20), собранная на основе микроскопа МБС-10 (ЛОМО). В этой установке облучение анализируемого образца также производили когерентным излучением на длине волны 650 нм. Увеличение данной системы невелико и составляет 1.2. Непосредственно за объективом установлена ирисовая диафрагма.

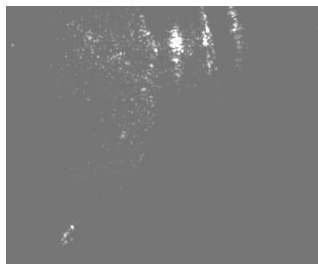
Изменение размера апертуры диафрагмы позволяет управлять размером спеклов

в плоскости наблюдения. Важно отметить, что контраст спеклов не изменяется, даже если размеры начинают превышать размеры отдельных ячеек (пикселей) CMOS камеры.

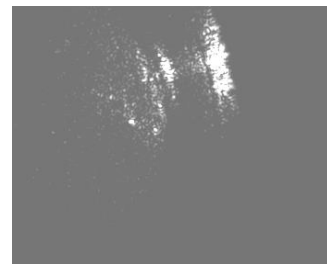


Рисунок 20 – Установка для определения контраста спеклов, формирующихся в бактериальных взвесьях

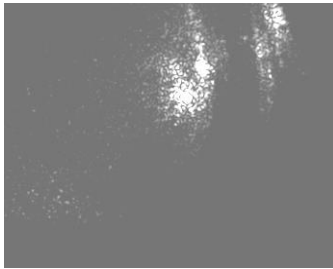
Фрагменты спекл-полей, формирующихся при рассеянии света на ансамбле кишечной и синегнойной палочек, находящихся во взвесьях с различной концентрацией представлены на рисунке 21.



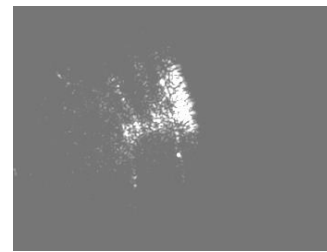
а



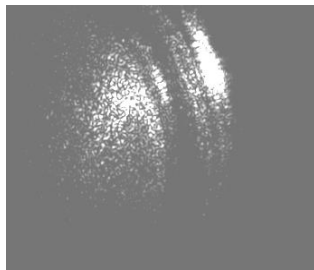
г



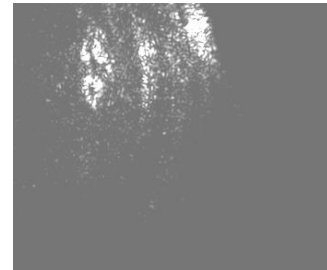
б



д



в



е

Рисунок 21 – Фрагменты спекл-полей – изображения, полученные при рассеянии когерентного излучения в образцах бактериальных взвесей: *P. aeruginosa* 27533 –  $10^5$  м.к./мл (а);  $10^7$  м.к./мл (б);  $10^9$  м.к./мл (в); *E. coli* В6 -  $10^5$  м.к./мл (г);  $10^7$  м.к./мл (д);  $10^9$  м.к./мл (е)

Из цифрового изображения спекл-поля выделяли одну центральную линию и проводили сглаживание флуктуаций интенсивности. После удаления тренда



вычисляли контраст лазерных спеклов. Пример реализации спекл-поля представлен на рисунке 22.

Как показали экспериментальные исследования, контраст спеклов зависит главным образом от концентрации клеток в бактериальной взвеси и толщины облучаемого образца.

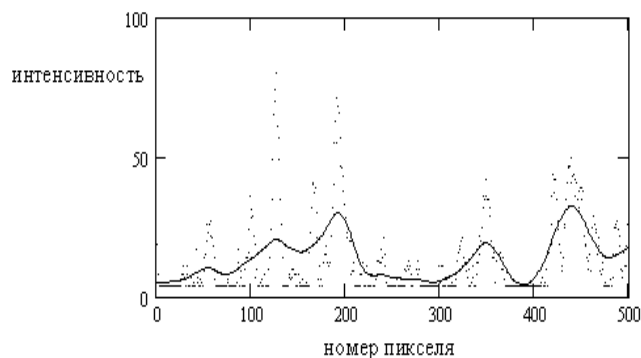


Рисунок 22 – Пример реализации спекл-поля при рассеянии света на образце, содержащего взвесь клеток *P. aeruginosa* 27533 в концентрации  $10^5$  м.к./мл: сплошная линия – сглаженные данные; точки – измеренные значения интенсивности в одной линии изображения, зарегистрированные CMOS камерой

В конфигурации обратного рассеяния, при толщине образцов 5 мм, контраст биоспеклов лежит в диапазоне:

0,60-0,65 – концентрация клеток  $10^5$  м.к./мл;

0,70-0,80 – концентрация клеток  $10^7$  м.к./мл;

0,85-0,90 – концентрация клеток  $10^9$  м.к./мл.

Таким образом, очевидно, что с ростом концентрации клеток в бактериальной взвеси увеличивается контраст и размеры спекл-полей, формирующихся внутри бактериальных взвесей при облучении. Для проведения дальнейших экспериментов использовали взвесь бактерий в концентрации  $10^9$  м.к./мл.

*Изучение роли пространственной когерентности при взаимодействии бактериальных клеток с излучением*

Как известно, оптическое излучение вызывает возбуждение молекул фотосенсибилизатора, находящегося в водном растворе. Возбужденные молекулы фотосенсибилизатора, взаимодействуя с молекулами кислорода, растворенного в водной фракции физиологического раствора, приводят к образованию синглетного кислорода ( $O_2^*$ ) - чрезвычайно агрессивного окислителя. В свою очередь, молекулы  $O_2^*$  воздействуют на клетки бактериальной взвеси (фотодинамическая реакция типа II по классификации Шенка (Красновский, 2004). Какова вероятность столкновения  $O_2^*$  с бактериальными клетками, находящимися в водном растворе? Молекулы  $O_2^*$  образуются возле каждой клетки в бактериальной взвеси (Рисунок 23).

Время жизни синглетного кислорода в водной среде составляет порядка  $\tau = 3,5 \cdot 10^{-6}$  с (Владимиров, 1989). Средняя скорость движения молекул кислорода в водной среде может быть оценена с помощью теории подобия (Седов, 1987):

$$v_{\text{вода}} = v_{\text{газ}} \cdot \frac{\mu_{\text{вода}}}{\mu_{\text{газ}}}, \quad (2)$$

Принимая во внимание, что  $\mu_{\text{вода}} \approx 10^{-4} \text{ Пуаз}$ ,  $\mu_{\text{газ}} \approx 1,78 \cdot 10^{-4} \text{ Пуаз}$ , оценка для скорости  $v_{\text{вода}}$  составляет порядка 170 м/с. Среднее расстояние  $\Delta r$  между двумя соседними молекулами  $H_2O$  может быть грубо оценено с помощью закона Авогадро.

Из упомянутого закона следует, что  $18 \text{ см}^3$  вещества содержит  $6,02 \cdot 10^{23}$  молекул, тогда:

$$6,02 \cdot 10^{23} \cdot \Delta r^3 = 18 \text{ см}^3, \quad (3)$$

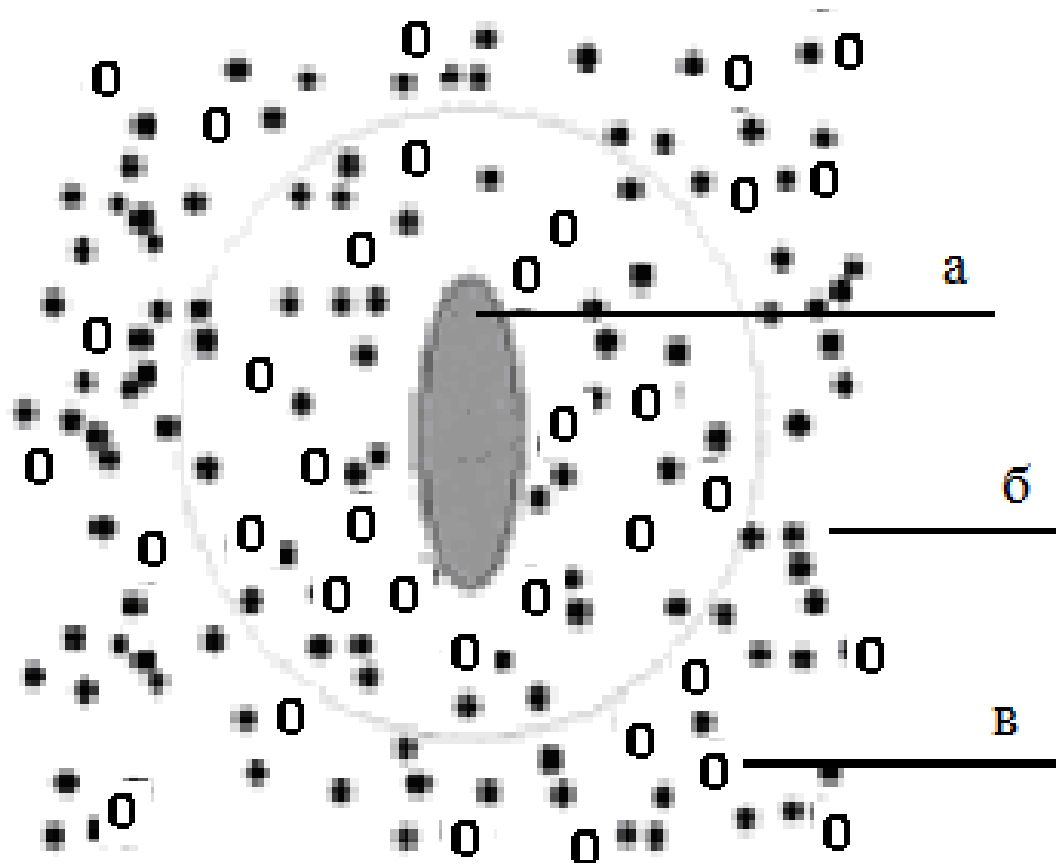


Рисунок 23 – Иллюстрация действия  $O_2^*$ , образованного в процессе ФДВ на клетку *E. coli* В б: а – бактериальная клетка, б – метиленовый синий, в – синглетный кислород

где  $V_{\text{вода}}$  – средняя скорость движения молекул кислорода в воде;  $V_{\text{газ}}$  – средняя скорость движения молекул кислорода в идеальном газе, (которая составляет 370 м/с) (Рейф, 1986);  $\mu_{\text{вода}}$  и  $\mu_{\text{газ}}$  – динамические вязкости воды и газообразного кислорода соответственно.

Из последнего соотношения следует, что  $\Delta r \approx 3 \cdot 10^{-10} \text{ м}$ .

Среднее число соударений молекул синглетного кислорода с молекулами воды за время ( $\tau$ ) жизни в возбужденном состоянии составляет:

$$N \equiv \frac{V_{\text{вода}} \cdot \tau}{\Delta r} \approx \frac{170 \frac{\text{М}}{\text{с}} \cdot 3.5 \cdot 10^{-6} \text{с}}{3 \cdot 10^{-10} \text{М}} \approx 2 \cdot 10^6 \quad (4)$$

Проведён анализ статистики соударений  $\text{O}_2^*$  с молекулами воды. После взаимодействия с молекулой  $\text{H}_2\text{O}$ , молекула  $\text{O}_2^*$  смещается на расстояние  $\Delta r$  под некоторыми случайными углами  $\theta$  и  $\varphi$  (Рисунок 24).

Как видно из приведенного выше рисунка, смещение вдоль оси  $Z$  составляет  $\Delta z = \Delta r \cdot \cos(\theta)$ ; смещение вдоль оси  $Y$  -  $\Delta y = \Delta r \cdot \sin(\theta) \sin(\varphi)$ , смещение вдоль оси  $X$  -  $\Delta x = \Delta r \cdot \sin(\theta) \cos(\varphi)$ .

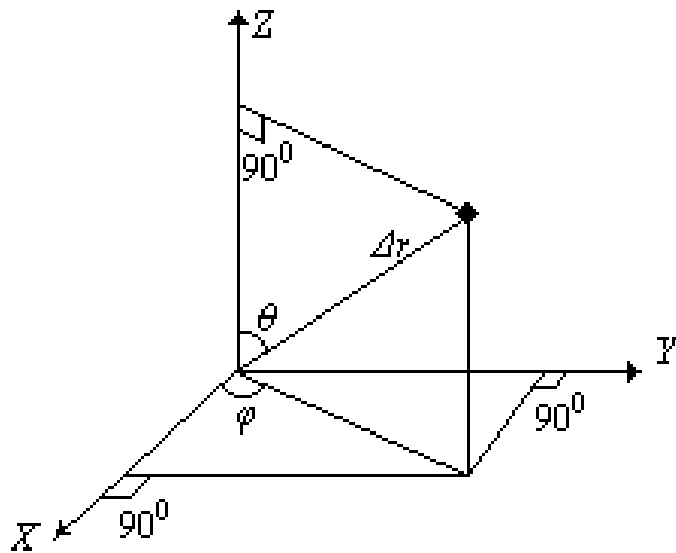


Рисунок 24 – Возможные направления смещения молекулы синглетного кислорода после взаимодействия с молекулой кислорода:  $\Delta r$  – расстояние смещения,  $X, Y, Z$  – оси смещения,  $\theta, \varphi$  – углы смещения

После некоторого числа  $N$  взаимодействий  $\text{O}_2^*$  с молекулой воды, полное смещение  $\text{O}_2^*$  вдоль оси  $Z$  равно:

$$\Delta z = \sum_{i=1}^n \Delta z_i = \Delta r \cdot \left\{ \cos(\theta_1) + \cos(\theta_1 + \theta_2) + \cos(\theta_1 + \theta_2 + \theta_3) + \dots + \cos\left(\sum_{i=1}^n \theta_i\right) \right\}, \quad (5 \text{ a})$$

полное смещение  $O_2^*$  вдоль оси  $Y$  равно:

$$\Delta y = \sum_{i=1}^n \Delta y_i = \Delta r \cdot \left\{ \sin(\theta_1) \sin(\varphi_1) + \sin(\theta_1 + \theta_2) \sin(\varphi_1 + \varphi_2) + \dots + \sin\left(\sum_{i=1}^n \theta_i\right) \sin\left(\sum_{i=1}^n \varphi_i\right) \right\}, \quad (5 \text{ б})$$

полное смещение  $O_2^*$  вдоль оси  $X$  равно:

$$\Delta x = \sum_{i=1}^n \Delta x_i = \Delta r \cdot \left\{ \sin(\theta_1) \cos(\varphi_1) + \sin(\theta_1 + \theta_2) \cos(\varphi_1 + \varphi_2) + \dots + \sin\left(\sum_{i=1}^n \theta_i\right) \cos\left(\sum_{i=1}^n \varphi_i\right) \right\}, \quad (5 \text{ в})$$

Если некоторая случайная величина  $\xi_i$  равномерно распределена на интервале  $[0; 2\pi]$ , то тогда все суммы, а именно  $(\xi_1 + \xi_2)$ ,  $(\xi_1 + \xi_2 + \xi_3)$ , ...,  $\sum_{i=1}^n \xi_i$ , будут также распределены в интервале  $[0; 2\pi]$ . Безусловно, подобное заключение справедливо лишь в том частном случае, если проводится ренормализация каждой суммы  $(\xi_1 + \xi_2)$ ,  $(\xi_1 + \xi_2 + \xi_3)$ , ...,  $\sum_{i=1}^n \xi_i$ , в интервал  $[0; 2\pi]$  в соответствии с правилом  $\xi = \xi - 2\pi \cdot \text{mantissa}\left(\frac{\xi}{2\pi}\right)$ .

Поскольку величины  $\Delta x$ ,  $\Delta y$  и  $\Delta z$  представляют собой суммы случайных величин (5 а-в), то, как показано в книге Бендат и Дж. Пирсол А. (1989),  $\Delta x$ ,  $\Delta y$  и  $\Delta z$  подчиняются гауссовой статистике, если сумма вкладов, т.е. число  $N$  достаточно велико. Таким образом, соотношения (5 а-в) могут быть существенно упрощены:

$$\Delta z = \Delta r \cdot \cos\left(\sum_{i=1}^n \theta_i\right) \quad (6 \text{ а})$$

$$\Delta x = \Delta r \cdot \sum_{i=1}^N (\sin \theta_i \cos \varphi_i) \quad (6 \text{ б})$$

$$\Delta y = \Delta r \cdot \sum_{i=1}^N (\sin \theta_i \sin \varphi_i) \quad (6 \text{ в})$$

Для среднеквадратических отклонений произведений вышеупомянутых случайных величин выполняется следующее соотношение:

$$stdev (\sin \theta_i \sin \varphi_i) \equiv stdev (\sin \theta_i \sin \varphi_i) \equiv 0.5 \quad (7)$$

Следовательно, среднеквадратические отклонения величин полных смещений молекул  $O_2^*$  вдоль осей  $X$  и  $Y$  равно:

$$\sigma_x = \sigma_y = \frac{\Delta r \cdot \sqrt{n}}{2} \quad (8)$$

Поскольку  $N$  велико, то (в силу центральной предельной теоремы) смещение молекул синглетного кислорода вдоль каждой из осей подчиняется гауссовому распределению. Функция распределения плотности вероятности имеет вид:

$$p(\Delta x) = \left[ \frac{\sqrt{2\pi} \cdot \sqrt{N} \cdot \Delta r}{2} \right]^{-1} \exp \left\{ -2 \left[ \frac{(\Delta x)^2}{(\sqrt{N} \cdot \Delta r)^2} \right] \right\} \quad (9)$$

Соотношения (8) и (9) были проверены на основе компьютерного моделирования. Гипотеза о нормальном распределении была проверена и принята с уровнем значимости  $\alpha = 0.05$ .

Полученные выражения позволяют оценить размер эффективной области взаимодействия молекул  $O_2^*$  с клетками бактерий *E. coli* В6 и *P. aeruginosa* 27533. У каждой молекулы  $O_2^*$ , участвующей в броуновском движении, есть шанс попасть в мембрану бактериальной клетки если отклонение молекулы вдоль осей  $X$  или  $Y$  не

превысит размер клетки. Это означает, что должно выполняться следующее условие:

$3\sigma_x \equiv 3\sigma_y \cong 2R_o$ . Оценка отношения  $\frac{3\sigma_x}{2R_o}$ , принимая во внимание, что молекула

$O_2^*$  претерпела  $N$  столкновений с молекулами воды:

$$\frac{3\sigma_x}{2R_o} = \frac{3 \cdot 0.28 \cdot 10^{-9} \text{ м} \cdot \sqrt{2 \cdot 10^{-6}} \cdot 0.5}{2 \cdot 0.45 \cdot 10^{-6} \text{ м}} \approx 1 \quad (10)$$

По форме клетки *E. coli* В6 и *P. aeruginosa* 27533 представляют собой палочки, а в модели они рассматривались как объекты сферической формы. При этом, радиус «эквивалентной» бактерии  $R_o$  был оценен как среднее арифметическое по осям  $X$  и  $Y$ , т.е.

$$R_o = \frac{2 \cdot 10^{-6} \text{ м} + 0.7 \cdot 10^{-6} \text{ м}}{2} = 1.35 \cdot 10^{-6} \text{ м} . \quad (11)$$

Методом математического анализа установлено, что молекулы  $O_2^*$  могут взаимодействовать с бактериальными клетками только в том случае, если они образуются под действием света в области равной  $2R$  и показанной на рисунке 25.

Размеры области эффективного взаимодействия составляют порядка 1 мкм, что сопоставимо с длиной волны света.

Полученный результат позволяет выявить роль пространственной (продольной и поперечной) когерентности излучения при его воздействии на бактериальные клетки.

Рассмотрим облучение бактериальной взвеси низкокогерентными спеклами с типичной шириной линии  $\Delta\lambda = 10$  нм при средней длине волны  $\lambda = 650$  нм. Длина продольной когерентности в этом случае составляет

$$\Delta l = \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} = 65 \cdot \lambda \approx 40 \text{ мкм} \quad (12)$$

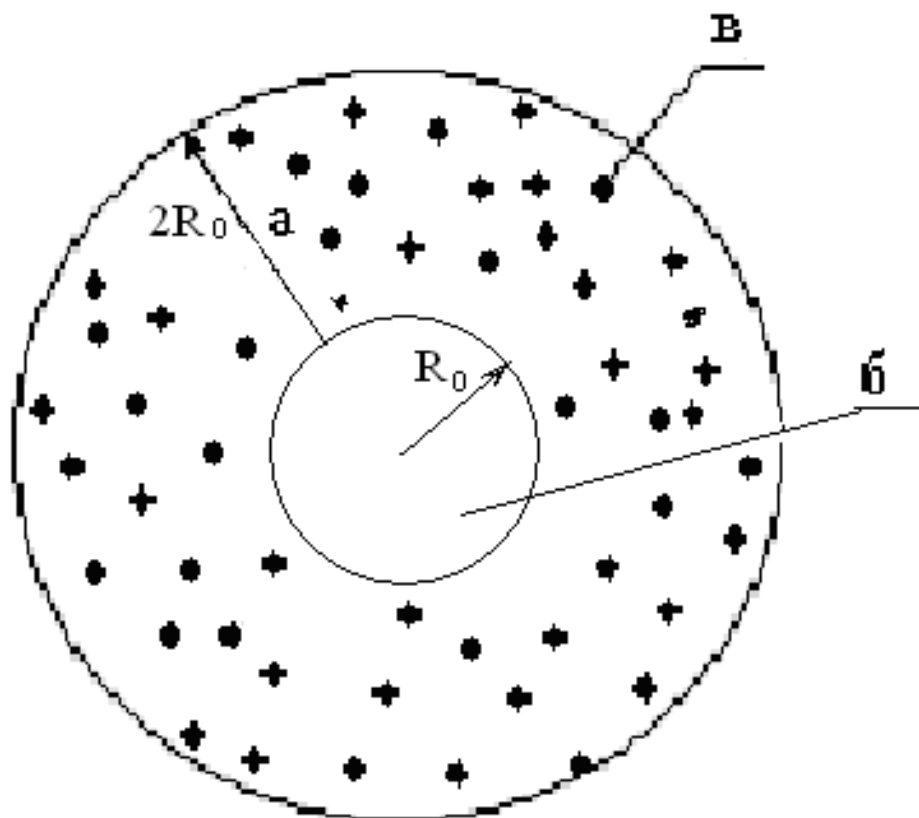


Рисунок 25 – Иллюстрация процессов взаимодействия молекул  $O_2^*$  с клетками *E. coli* В б: а – зона эффективного взаимодействия, б – бактериальная клетка; в – молекулы  $O_2^*$

Как известно, продольный размер  $\varepsilon_{\parallel}$  спеклов (в том числе и в случае низкокогерентного излучения) описывается формулой:

$$\varepsilon_{\parallel} \approx \frac{8 \cdot \lambda z^2}{a^2}, \quad (13)$$

где  $\varepsilon_{\parallel}$  - средний продольный размер спеклов;  $\lambda$  – длина волны,  $z$  – расстояние от плоскости рассеяния до плоскости наблюдения спеклов;  $a$  - поперечный размер освещенной области.



Как правило,  $z \gg a$ , следовательно  $\varepsilon_{\parallel} \gg \lambda$ . Но, даже в ближней зоне, (в проделанных экспериментах  $z \approx a \approx 1 \text{ мм}$ ),  $\varepsilon_{\parallel} \approx 10 \cdot \lambda$ , т.е. на порядок превышает длину волны.

Сравним размер эффективной области взаимодействия с продольным размером спеклов и продольной длиной когерентности. Будучи равным среднему размеру бактериальной клетки, размер области взаимодействия примерно в 100 раз меньше продольной длины когерентности и, по крайней мере, в 10 раз меньше продольного размера спеклов. Таким образом, даже при освещении низкокогерентным светом, клетки, взаимодействующие с  $O_2^*$ , находятся в пространственно однородном поле и воспринимают низкокогерентное квазимонохроматичное излучение как полностью когерентное, т.е. лазерное.

Выясним, как соотносятся поперечные размеры спеклов с размерами области эффективного взаимодействия. Средний поперечный размер спеклов определяется формулой (Марешаль с соавт., 1964):

$$\varepsilon_{\perp} \approx \frac{3\lambda \cdot z}{a}, \quad (14)$$

где  $\varepsilon_{\perp}$  – средний поперечный размер спекла,  $\lambda$  – длина волны,  $z$  – расстояние от плоскости рассеяния до плоскости наблюдения,  $a$  – поперечный размер освещенной области.

Даже в ближней зоне,  $\varepsilon_{\perp} \succ \lambda$ , т.е. по-прежнему больше размера эффективной области взаимодействия.

Таким образом, выявлено, что размеры области, где формируются молекулы синглетного кислорода, которые могут принять участие в реакциях с компонентами клеточной мембраны, довольно малы и составляют порядка 1 мм. Однако на практике размеры упомянутой области значительно меньше. Как показывают

результаты статистического моделирования, вероятность встречи движущейся молекулы синглетного кислорода с бактериальной клеткой составляет менее 5 %, если молекула синглетного кислорода находится от поверхности мембраны на расстоянии, превышающем диаметр бактериальной клетки. Данные результаты были получены в предположении, что векторы скоростей движения молекул кислорода, участвующих в броуновском движении, распределены равномерно по всем направлениям. Проведенный анализ позволяет также сделать вывод о том, что пространственная когерентность не играет принципиальной роли в процессах взаимодействия бактериальных клеток с лазерным излучением. Кроме того, световые диоды от лазерных выгодно отличает надежность. Лазерные диоды сгорают при повышении напряжения даже на 5 %, световые диоды устойчивы к перепадам напряжения в электрической сети. Световые диоды можно подключать последовательно, что обеспечит одинаковую силу тока, т.е. его стабилизацию. При использовании в промышленных установках, когда необходимо будет использовать большое количество диодов, безусловно, приобретение световых диодов значительно экономичнее.

Как показали проведенные исследования, результат инактивации клеток *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp. под ФДВ зависит от комбинации таких параметров как концентрация клеток в бактериальной взвеси, концентрации фотосенсибилизатора, плотности мощности облучения и времени облучения. Для поиска оптимального их сочетания, необходимо провести математическое моделирование.

Построение модели проводили для случая инактивации бактерий штамма *P. aeruginosa* 27853. Чтобы построить математическую модель провели серию дополнительных экспериментов по облучению клеток *P. aeruginosa* 27853. В эксперименте использовали бактериальные взвеси с концентрацией клеток  $10^5$ ,  $10^7$  и  $10^9$  м.к./мл. Концентрация МС составляла 0,05; 0,5 и 5 %. Время облучения – от 10 до 180 мин. Для каждой бактериальной взвеси экспериментально измеряли отношение:

$$M = \frac{K_c}{K_o}, \quad (15)$$

где  $M$  – величина, характеризующая степень поражения клетки,  
 $K_o$  – количество живых клеток в облучаемой взвеси,  
 $K_c$  – количество клеток, выживших после облучения.

Зависимость  $M$  от комбинированного параметра облучения  $C \cdot P \cdot T$  (концентрация МС, мощность излучения, время излучения) искали в виде (модель первого типа)

$$M(C \cdot P \cdot T) = \alpha_1 + \alpha_2 \exp \left[ -\frac{(C \cdot P \cdot T - \alpha_3)^2}{(\alpha_4)^2} \right], \quad (16)$$

где  $C$  – концентрация фотосенсибилизатора,  $P_{cp}$  – средняя мощность облучения,  $T$  – длительность облучения,  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4$  – искомые константы.

Подгонку параметров осуществляли методом наименьших квадратов. Пример нахождения теоретической зависимости, аппроксимирующей экспериментальные данные, приведен на рисунке 26. Среднее относительное отклонение экспериментальных точек от теоретической аппроксимирующей кривой составляет 9.4 %.

Аналогичные зависимости были получены при инактивации клеток штамма *P. aeruginosa* 27533 и штаммов *E. coli* B6, *E. coli* K12, *E. coli* O1 лазерными диодами на длине волны  $\lambda_0 = 650$  нм и световыми диодами на длине волны  $\lambda_0 = 650$  нм при  $\Delta\lambda = 10$  нм; плотность мощности варьировали в интервале от 1 до 5 мВт/см<sup>2</sup>. Во всех указанных случаях облучения бактерий, как полностью когерентным светом, так и

низкокогерентными спеклами относительная погрешность аппроксимации данных не превышала 15 %.

На основе результатов, полученных в эксперименте, была проведена идентификация параметров предложенной математической модели (16). При проведении идентификации было сделано важное допущение, состоящее в том, что

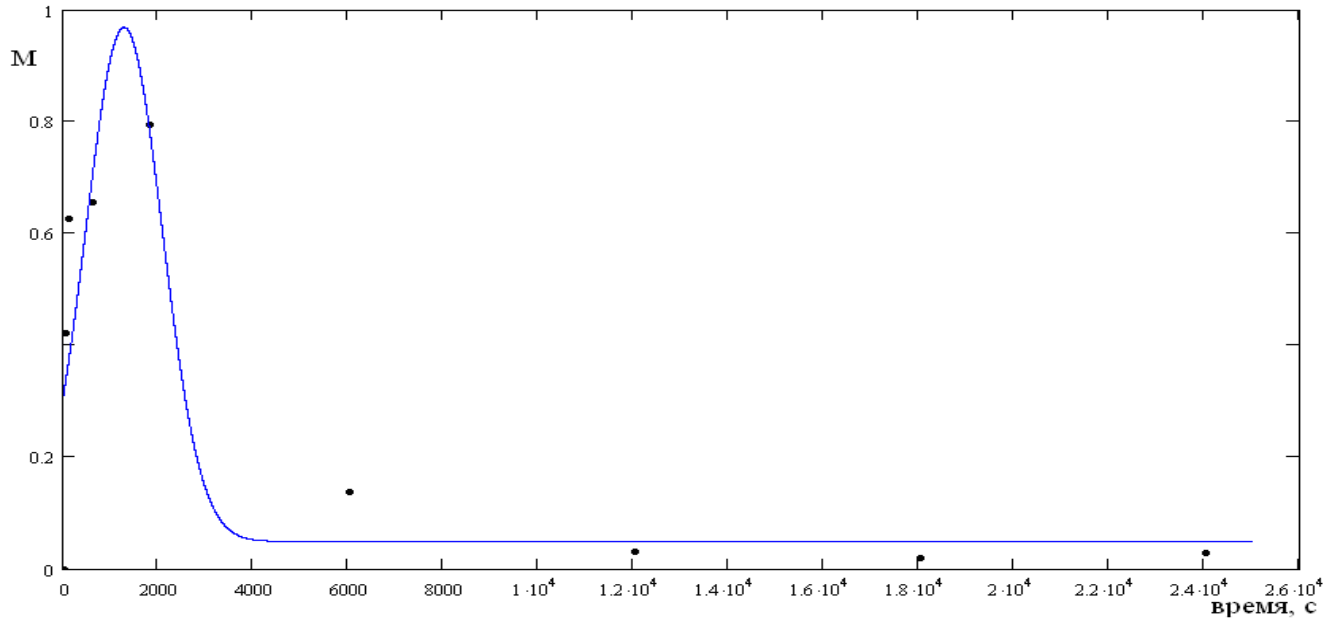


Рисунок 26 – Зависимость относительного количества выживших клеток *P. aeruginosa* 27853 от времени облучения светом лазера ( $\lambda = 630$  нм,  $I = 200$  мВт/см<sup>2</sup>): точки – экспериментальные данные, сплошная линия – аппроксимирующая кривая

средняя величина  $M$  поражения отдельной клетки в точности соответствует относительному количеству пораженных клеток во всей бактериальной взвеси.

Результаты идентификации параметров математической модели взаимодействия излучения с клетками представлены в таблице 4.

Интересно отметить, что значения коэффициентов, определенных для различных штаммов микроорганизмов при воздействиях диодного и лазерного излучений, в ряде случаев, значительно отличаются между собой. Это означает, что предложенная

нелинейная модель не универсальна, а описывает поведение системы «клетка-лазерное излучение» в достаточно узком интервале значений.

При значительном изменении условий облучения (плотность мощности излучения, длительность облучения, концентрация фотосенсибилизатора и т.д.) нужно проводить повторную идентификацию параметров модели на основе экспериментальных данных.

С использованием предложенной математической модели было проведено компьютерное моделирование процессов облучения бактериальных клеток динамическими спекл-полями. Для характеристики степени поражения мембраны бактерий *P. aeruginosa* 27853 в результате фотодинамического воздействия использовали характеристику  $Lesion \equiv 1 - M$ .

Разработанная модель позволяет найти режимы, при которых происходит гарантированная инактивация бактерий *P. aeruginosa* 27853. Это дает возможность в эксперименте ограничить область искомых параметров. Результаты численного моделирования с использованием модели первого типа (на примере облучения взвеси клеток *P. aeruginosa* 27853 мощным высококогерентным излучением,  $\lambda = 630$  нм,  $I = 200$  мВт/см<sup>2</sup>) представлены на рисунке 27. Степень фотопоражения клеток увеличивается с течением времени, стремясь к максимальному значению равному 1, соответствующему полной инаktivации всех клеток взвеси (Рисунок 28). При этом максимум распределения смещается к 1. Как показывают вычисления, вероятность инаktivации всех клеток взвеси близка к 1 при длительности облучения более 40 мин (Рисунок 27 е).

Согласно проведенным предварительным экспериментам по инаktivации бактерий *E. coli* spp., *P. aeruginosa* spp. методом ФДВ и математическому моделированию установлены оптимальные параметры фотовоздействия:

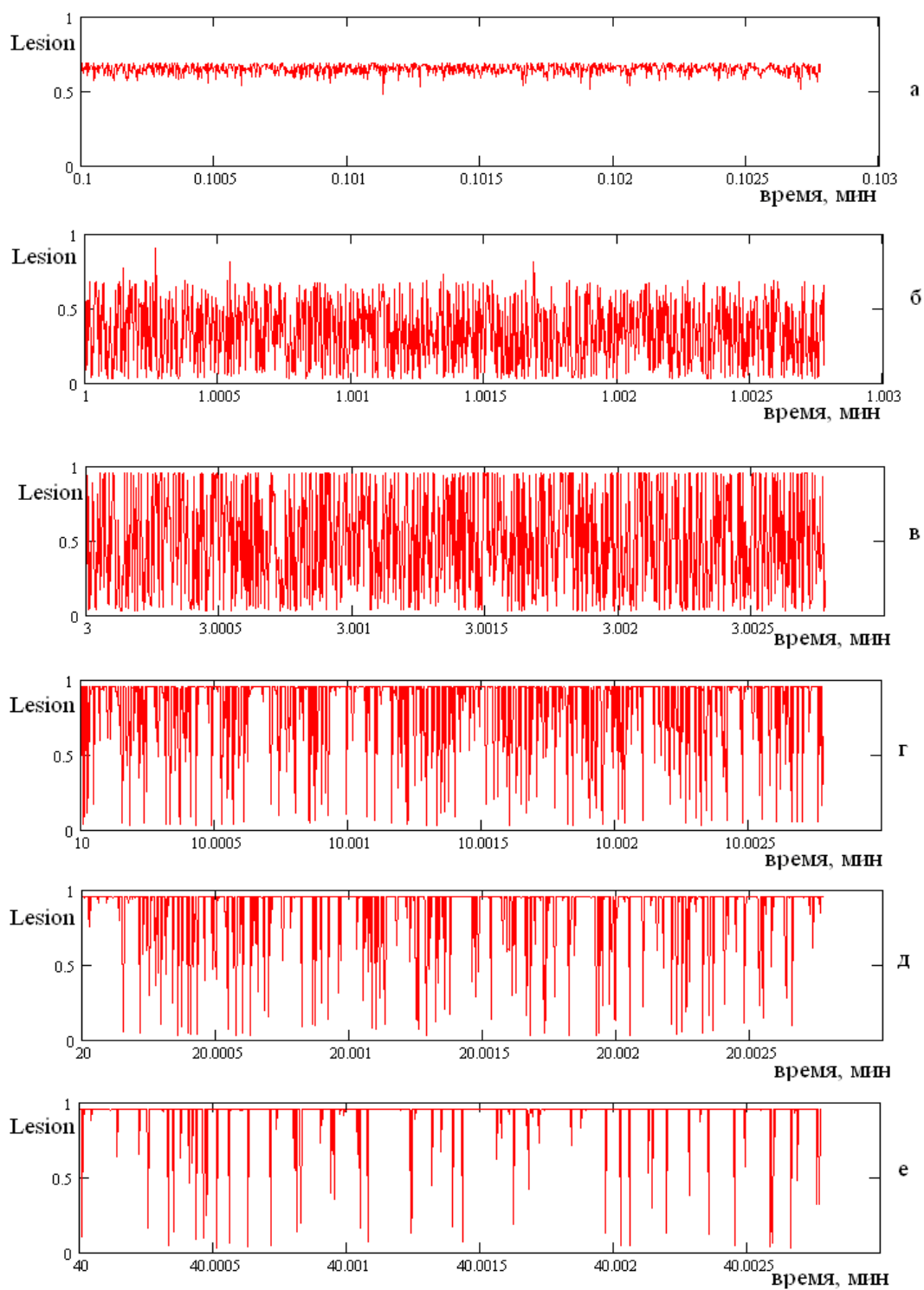
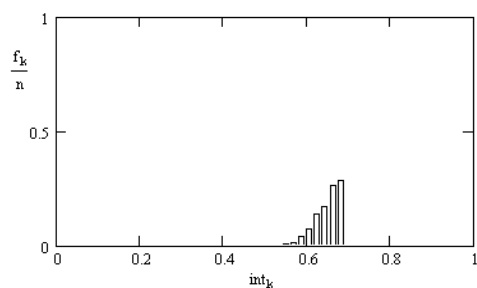
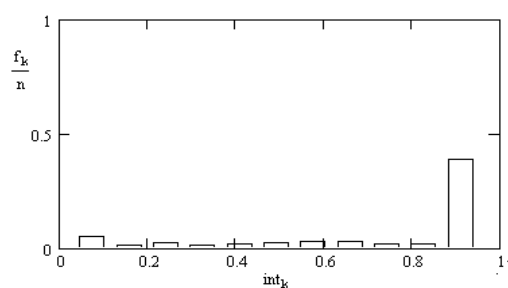


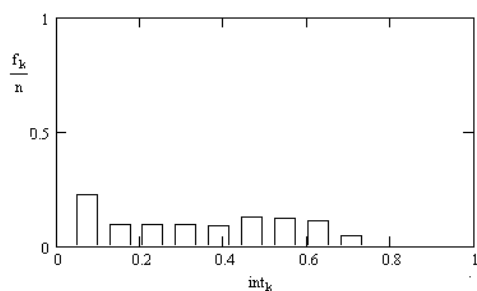
Рисунок 27 – Временная динамика величины Lesion клеток *P. aeruginosa* 27853 при облучении когерентным светом: а – после 6 сек облучения; б – после 1 мин облучения; в - после 3 мин облучения; г – после 10 мин облучения; д – после 20 минут облучения; е – после 40 мин облучения



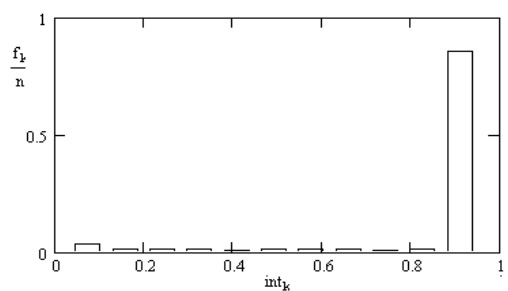
а



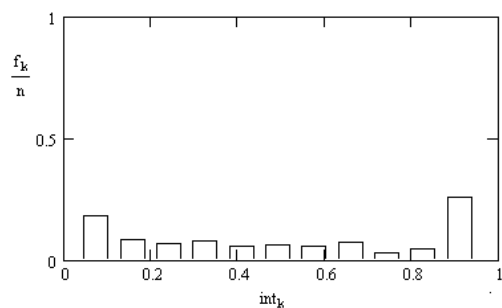
г



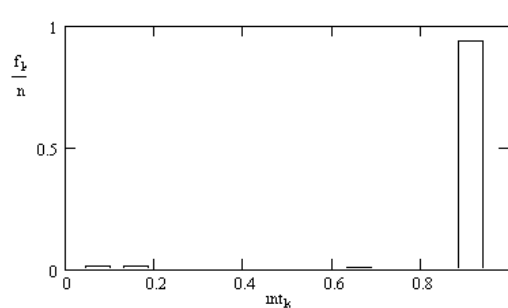
б



д



в



е

Рисунок 28 – Изменение функции плотности вероятности величины Lesion с течением времени: а - после 6 сек облучения; б – после 1 мин облучения; в - после 3 мин облучения, г – после 10 мин облучения; д после 20 минут облучения; е – после 40 мин облучения

использование бактериальных взвесей в концентрации  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл, раствора метиленового синего в концентрации 0,005 %, применение световых диодов в лабораторной установке для инактивации бактерий с плотностью мощности излучения  $1 \text{ мВт/см}^2$ .

### 3.7. Колониеобразующая способность и культурально-морфологические свойства бактерий *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp. после проведения инактивации методом фотодинамического воздействия

Инактивацию бактерий *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* 27533 проводили на сконструированной установке методом ФДВ в течение 5-360 мин при следующих условиях: концентрация клеток в бактериальной взвеси  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл, концентрация раствора МС = 0,005 %; плотность мощности излучение  $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>. На бактерии *P. aeruginosa* 27853 воздействовали лазером ( $I = 200$  мВт/см<sup>2</sup>), концентрация МС = 0,5 или 5 %, время инактивации 10-180 мин. После инактивации взвеси бактерий *E. coli* В6, *E. coli* К12, *E. coli* О1, и *P. aeruginosa* 27533 высевали на плотные питательные среды, инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 10 сут, ежедневно просматривая чашки и, фиксируя число КОЕ.

Результаты изменения количества КОЕ бактерий *E. coli* В6, *E. coli* К12, *E. coli* О1 после ФДВ (0,005 % МС,  $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>) представлены на рисунках 29 - 32.

После 5 мин ФДВ число КОЕ снижалось у представленных штаммов по сравнению с контрольными величинами: *E. coli* В6 (Осд – 89±5 %; Кмс – 97±5 %; Ксд – 98±4 %), *E. coli* К12 (Осд – 85±5 %; Кмс – 96±5 %; Ксд – 103±3 %), *E. coli* О1 (Осд – 85±2 %; Кмс – 98±5 %; Ксд – 97±3 %). На 15 мин отмечали незначительную активацию роста бактерий по сравнению с 10 мин воздействия, но она меньше контрольных значений.

Начиная с 20 мин ФДВ, количество КОЕ снижалось, и после 60 мин воздействия рост бактерий на агаре и в бульоне полностью отсутствовал.

Морфологических изменений бактерий *E. coli* В6 и *E. coli* К12 не наблюдалось. Изменений тинкториальных свойств не было. Средние размеры клеток не отличались от необлученной культуры и составляли для *E. coli* В6 – 0,61x2,68 мкм, для *E. coli* К12 – 0,42x2,10 мкм (Таблица 5).



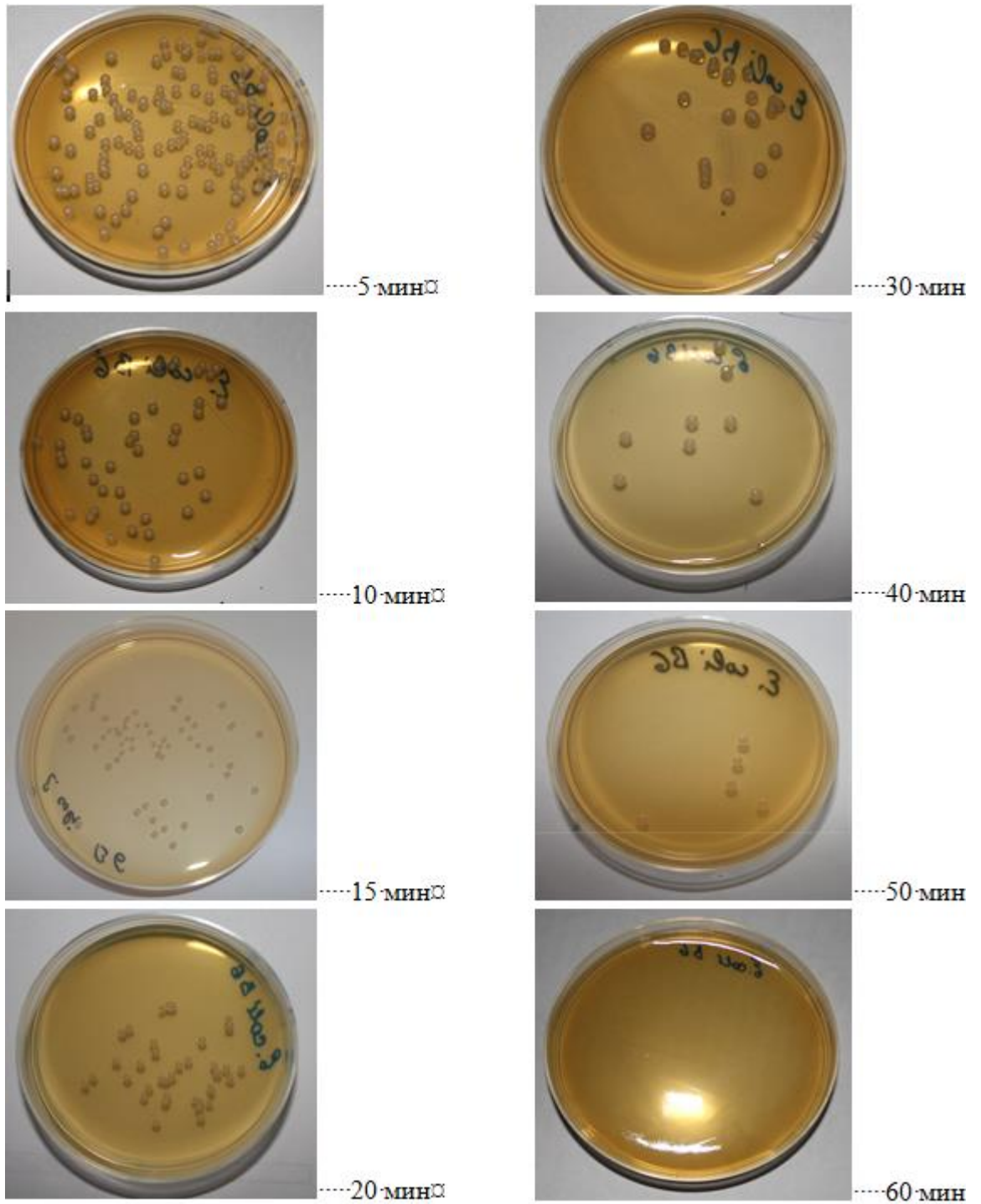


Рисунок 29 – Изменение числа КОЕ бактерий *E. coli* В6 после ФДВ  
( $I=1$  мВт/см<sup>2</sup>; МС=0,005%)

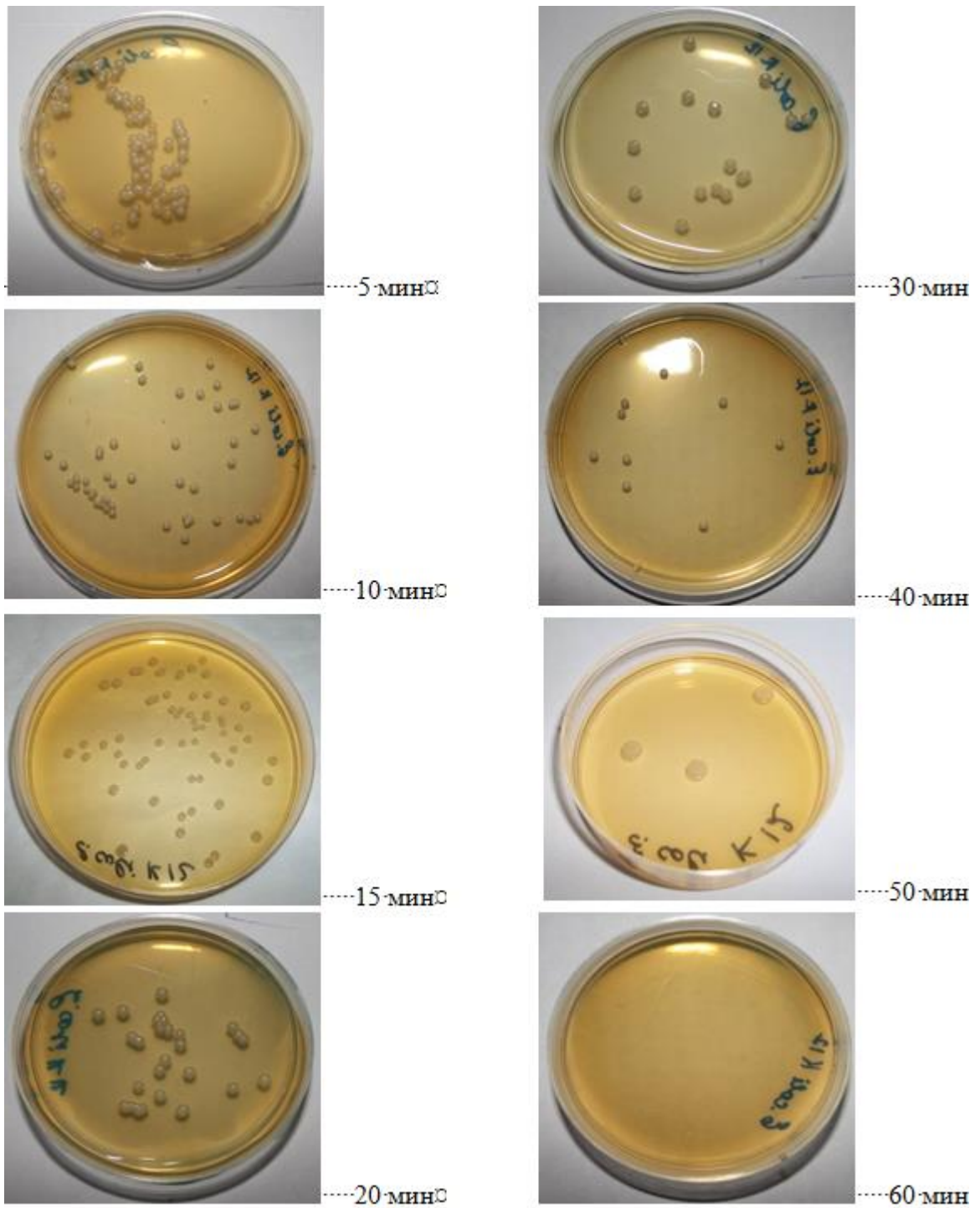


Рисунок 30 – Изменение числа КОЕ бактерий *E. coli* К 12 после ФДВ  
( $I=1$  мВт/см<sup>2</sup>; МС=0,005%)

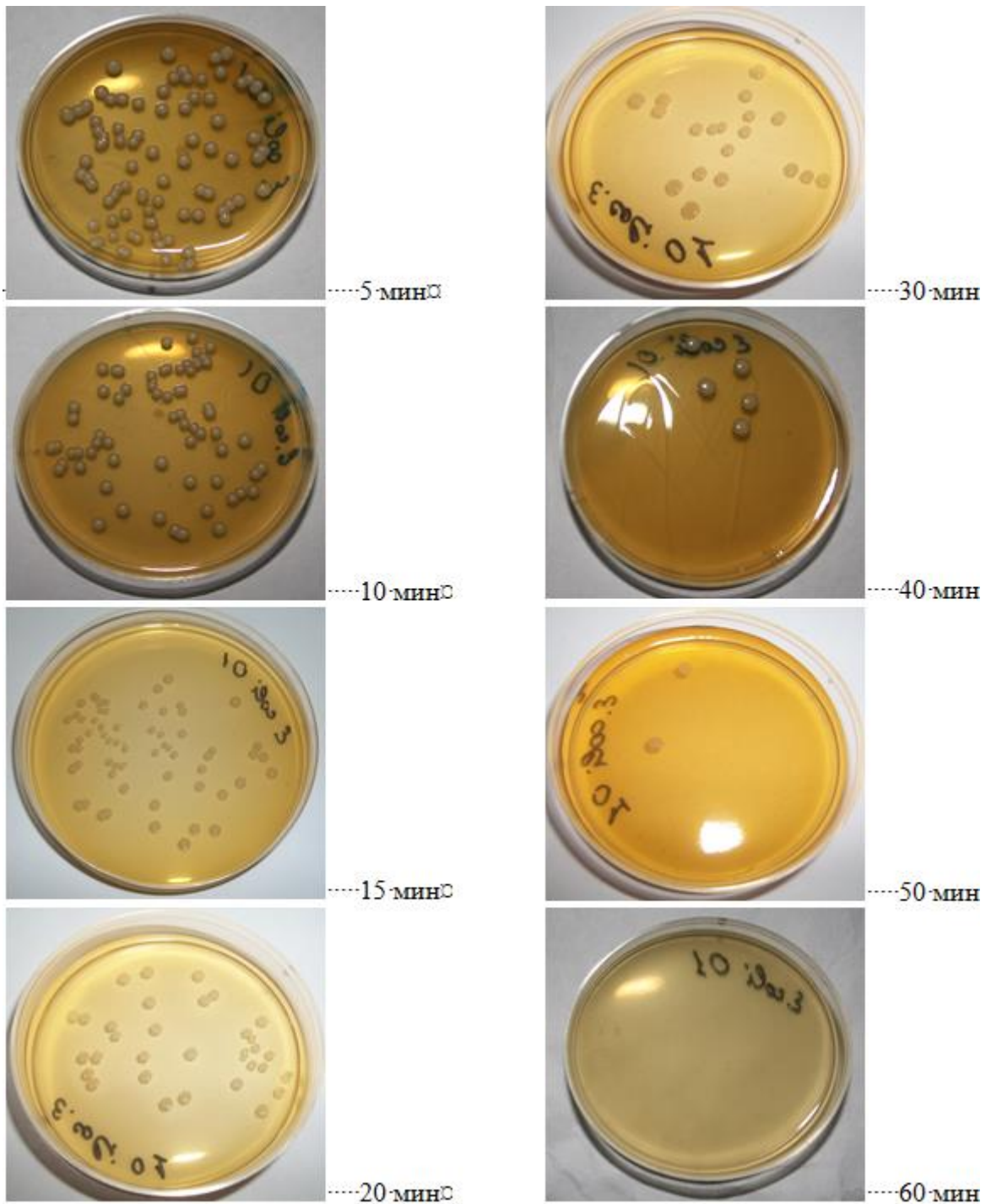
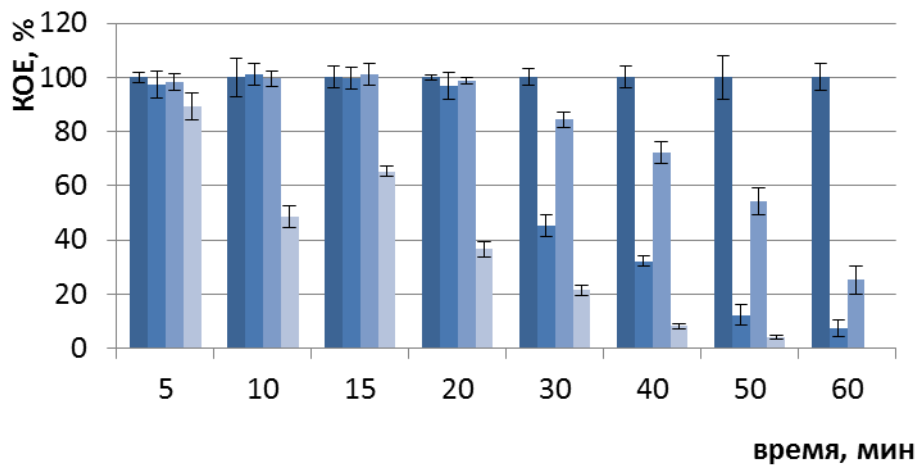
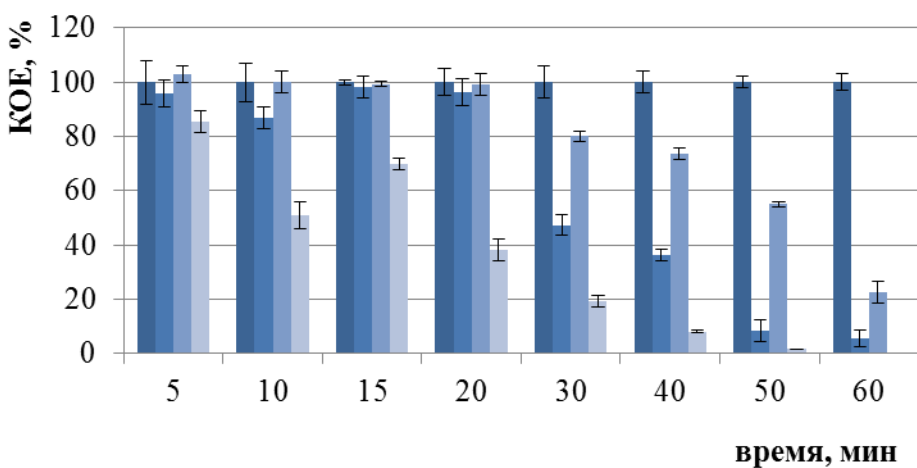


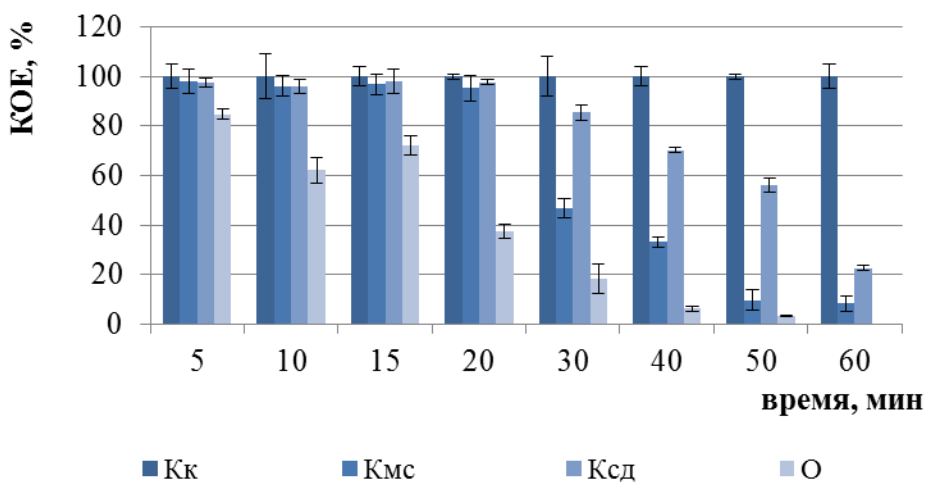
Рисунок 31 – Изменение числа КОЕ бактерий *E. coli* O1 после ФДВ  
( $I=1$  мВт/см<sup>2</sup>; МС=0,005%)



а



б



в

Рисунок 32 – Изменение числа КОЕ бактерий *E. coli* B6 (а), *E. coli* K12 (б), *E. coli* O1 (в) после ФДВ ( $I=1\text{ мВт/см}^2$ ; 0,005% МС); О – опыт, ФДВ; контроли: Кк – культуры; Кмс – МС; Ксд – облучения СД

Проведение микроскопии препаратов бактерий штамма *E. coli* O1 показало изменение морфологии клеток после ФДВ: они приобрели более вытянутую форму по сравнению с необлученной культурой 0,38 x 1,58 мкм (Таблица 5).

Таблица 5 – Размеры *E. coli* разных штаммов клеток до и после ФДВ, мкм

Штамм бактерий	Размеры клеток до ФДВ		Размеры клеток после ФДВ	
	длина	ширина	длина	ширина
<i>E. coli</i> B6	2,65 ± 0,04	0,62 ± 0,02	2,68 ± 0,04	0,61 ± 0,02
<i>E. coli</i> K12	2,12 ± 0,06	0,41 ± 0,01	2,10 ± 0,02	0,42 ± 0,01
<i>E. coli</i> O1	1,30 ± 0,04	0,42 ± 0,02	1,58 ± 0,04	0,38 ± 0,02

Колониеобразующая способность бактерий штамма *P. aeruginosa* 27533, представлена на рисунках 33 и 36. Инактивацию бактерий проводили в течение 5 – 360 мин на созданной установке, используя МС в концентрации 0,005 %, меняя плотность мощности излучения: 1; 3; и 5 мВт/см<sup>2</sup>. Несмотря на то, что гарантированная инактивация бактерий должна быть после 40 мин облучения (согласно проведенному компьютерному моделированию), в эксперименте *in vitro* мы наблюдали лишь снижение численности бактерий по сравнению с контрольными значениями. Рост бактерий снижался до 40 % через 15, 60, 120 и 180 мин ФДВ ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 0,05 %). После 6 ч ФДВ на взвесь бактерий *P. aeruginosa* 27533 отмечали стимуляцию роста клеток, число КОЕ увеличилось до 79±4 % (Рисунок 36).

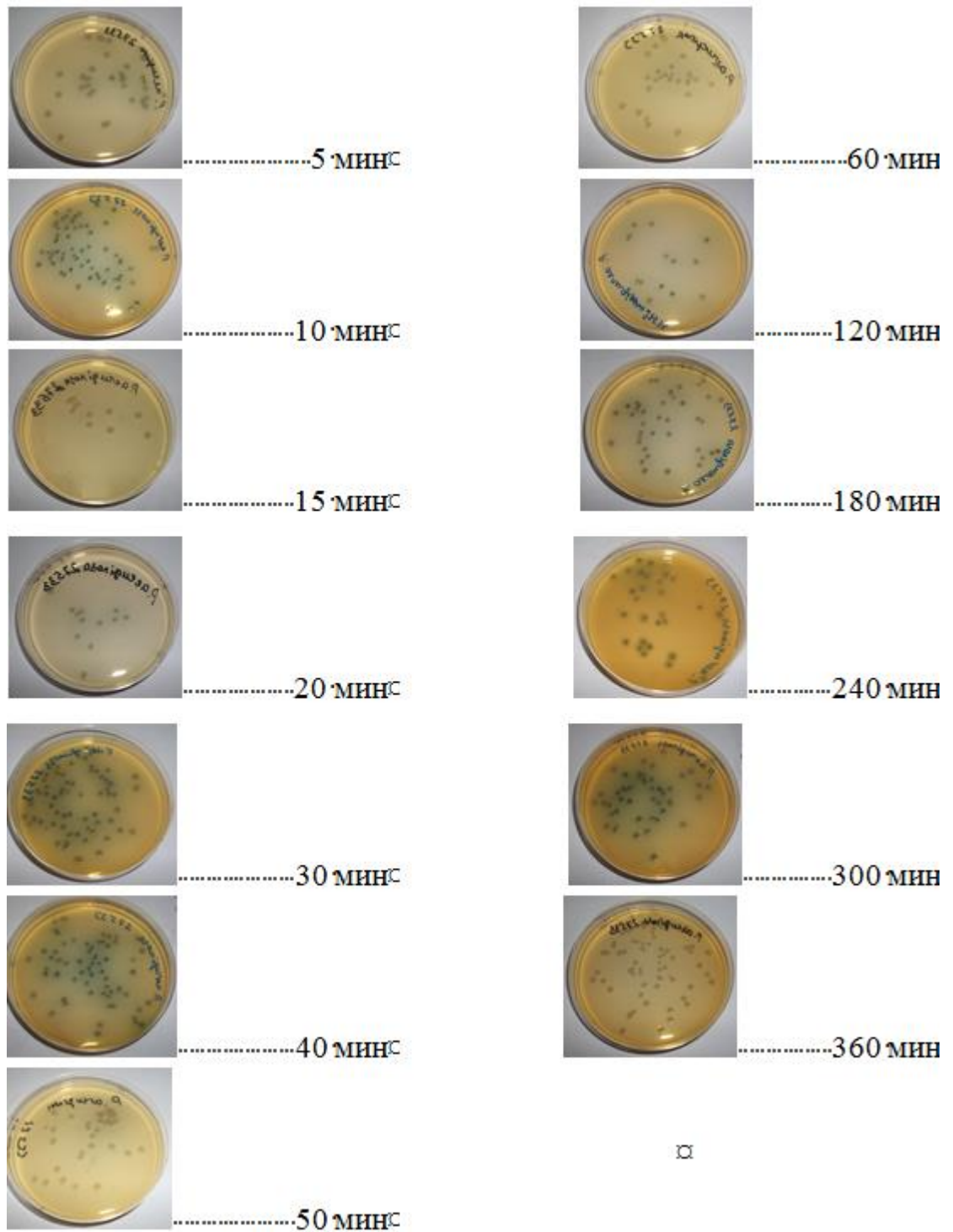


Рисунок 33 – Изменение числа КОЕ бактерий *P. aeruginosa* 27533 после ФДВ  
 ( $I=1$  мВт/см<sup>2</sup>; МС=0,005 %)

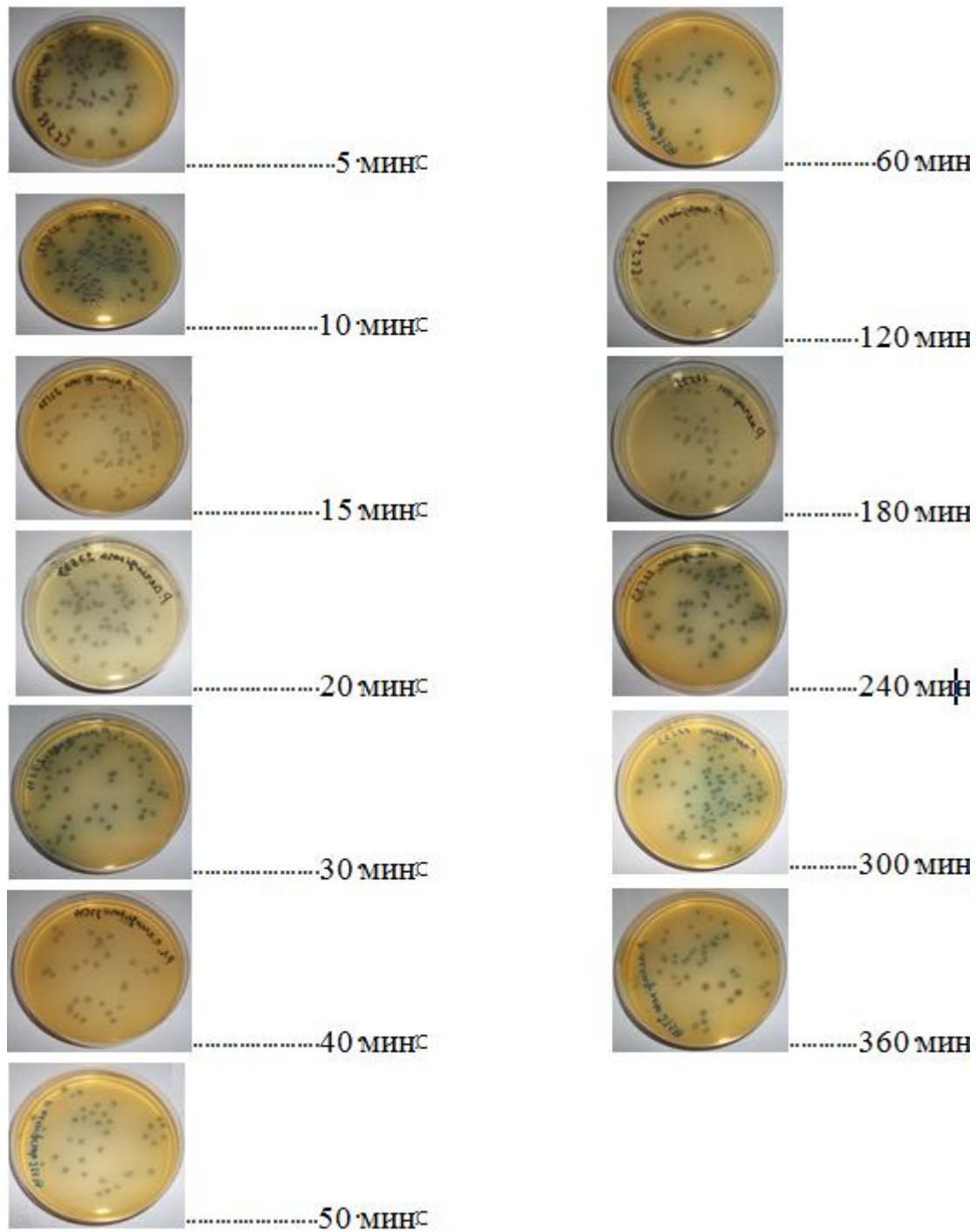


Рисунок 34 – Изменение числа КОЕ бактерий *P. aeruginosa* 27533 после ФДВ  
( $I=3$  мВт/см<sup>2</sup>; МС=0,005 %)

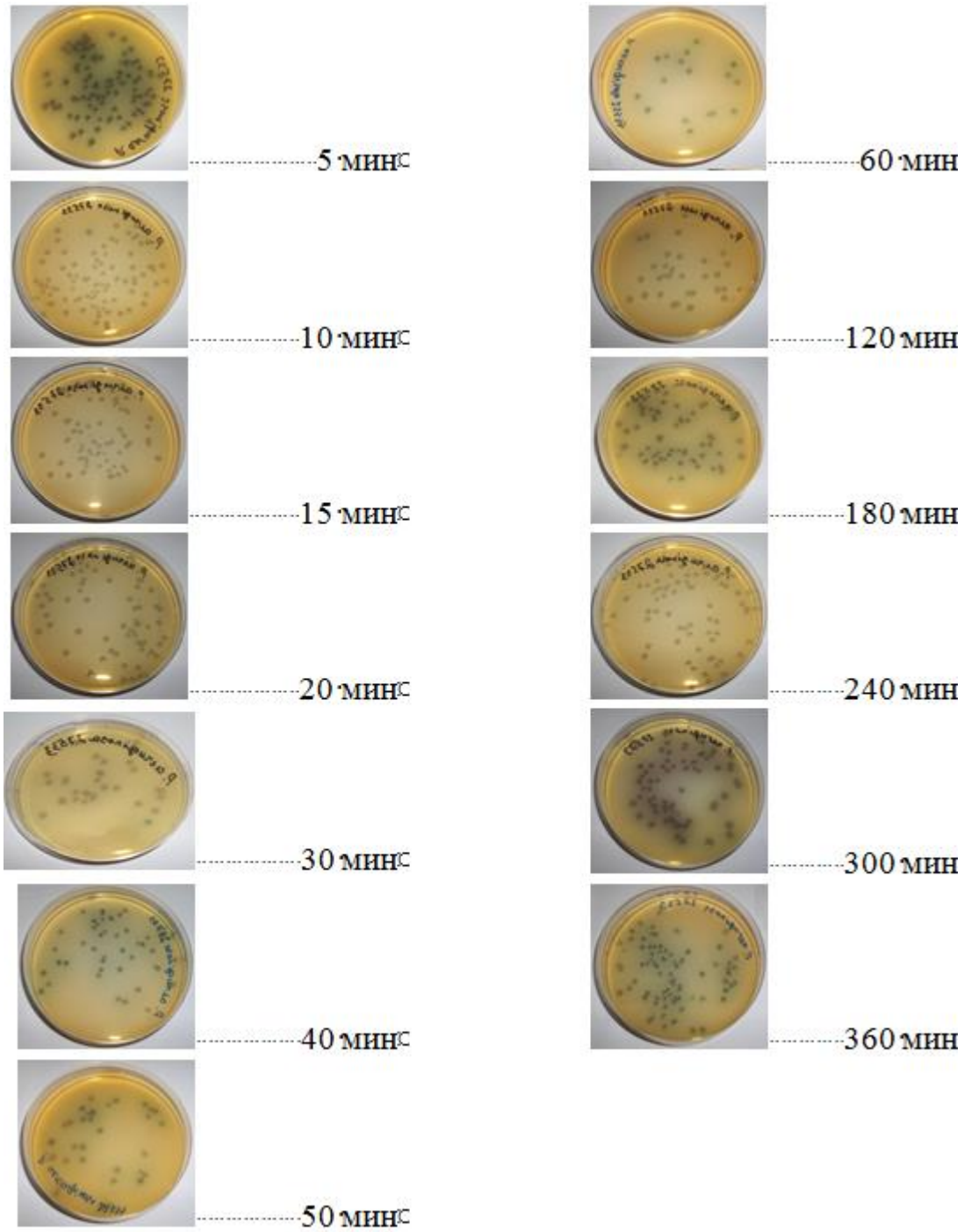
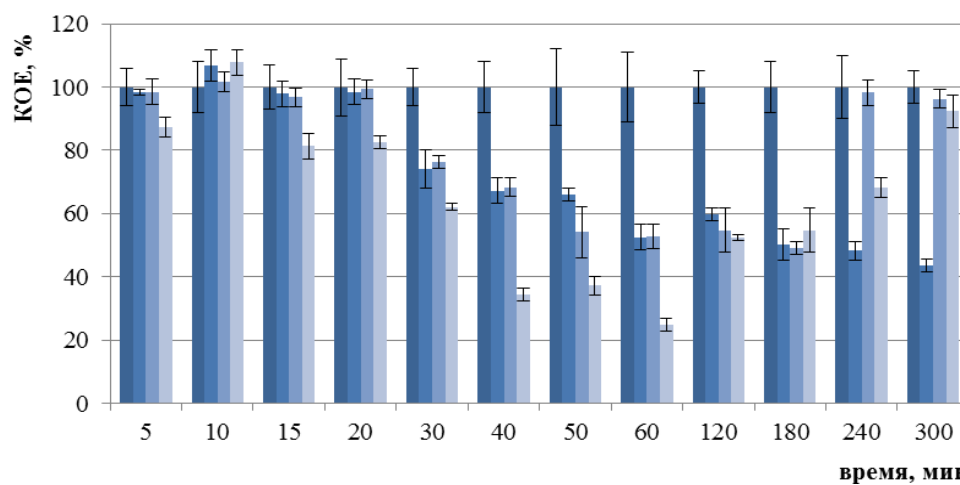
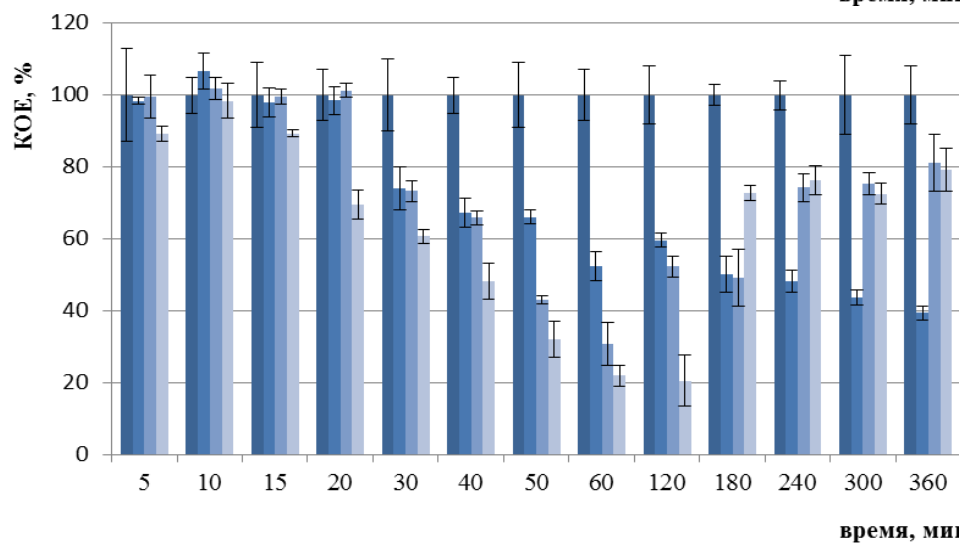


Рисунок 35 – Изменение числа КОЕ бактерий *P. aeruginosa* 27533 после ФДВ  
( $I=53$  мВт/см<sup>2</sup>; МС=0,005 %)

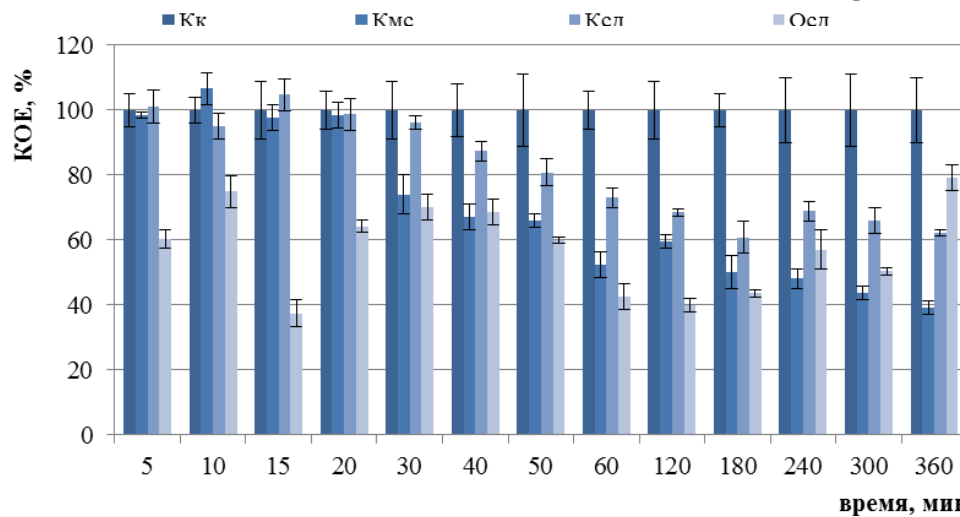




а



б



в

Рисунок 36 – Изменение числа КОЕ бактерий *P. aeruginosa* 27533 после ФДВ:

МС=0,005%;  $I=1\text{ мВт/см}^2$  (а),  $I=3\text{ мВт/см}^2$  (б),  $I=5\text{ мВт/см}^2$  (в)

Клетки штамма *P. aeruginosa* 27853 инактивировали красным лазером ( $\lambda = 630$  нм,  $I = 200$  мВт/см<sup>2</sup>). К взвеси клеток добавляли раствор МС в концентрациях 0,5 и 5 %. Результаты показаны на рисунках 37 – 39. На клетки воздействовали от 10 мин до 3 ч. Интересно отметить, что наиболее выраженный бактерицидный эффект наблюдали в опытах с меньшей концентрацией МС (0,5 %), количество КОЕ снижалось до  $2 \pm 0,1$  % ( $K_{мс} = 64 \pm 3$  %;  $K_{л} = 60 \pm 2$  %) после 15 мин ФДВ. Максимальный рост числа клеток – КОЕ =  $13 \pm 4$  % ( $K_{мс} = 52 \pm 1$  %;  $K_{л} = 51 \pm 4$  %) – регистрировали через 30 мин ФДВ ( $\lambda = 630$  нм,  $I = 200$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 0,5 %).

При инаktivации бактерий штамма *P. aeruginosa* 27853 в условиях ФДВ ( $\lambda = 630$  нм,  $I = 200$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 5 %) минимальное количество КОЕ =  $23 \pm 2$  % ( $K_{мс} = 57 \pm 5$  %;  $K_{л} = 52 \pm 2$  %) отмечали через 30 мин ФДВ, а максимальное – КОЕ =  $67 \pm 4$  % ( $K_{мс} = 31 \pm 3$  %;  $K_{л} = 34 \pm 2$  %) через 40 мин. Дальнейшее ФДВ в течение 40 - 180 мин на клетки указанного штамма бактерий приводило к снижению числа КОЕ, однако не приводило к полной инаktivации бактерий штамма *P. aeruginosa* 27853.

Бактерии штаммов *P. aeruginosa* 27533 и *P. aeruginosa* 27853 не утратили колониобразующую способность под длительным фотодинамическим воздействием красного светодиодного ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>) и лазерного ( $I = 200$  мВт/см<sup>2</sup>) излучения. Скорее всего, это связано с облигатной аэробностью, мощной антиоксидантной защитой и наличием монооксидаз (окислительных ферментов), что является общей особенностью всех псевдомонад (Маянский, 1999). Микроскопический анализ клеток *P. aeruginosa* 27533 и 27853, прошедших ФДВ не выявил изменений тинкториальных и морфологических свойств клеток (Таблица 6).

Бактерии *P. aeruginosa* 27853 при культивировании на плотных и жидких питательных средах при температуре 37 °С давали характерный рост. При облучении клеток *P. aeruginosa* 27853 с добавлением к взвеси 0,5 % МС прекращалась продукция пиоцианина (Рисунок 40). Изменения биохимической активности у бактерий упомянутого штамма после инаktivации представлены в таблице 7.

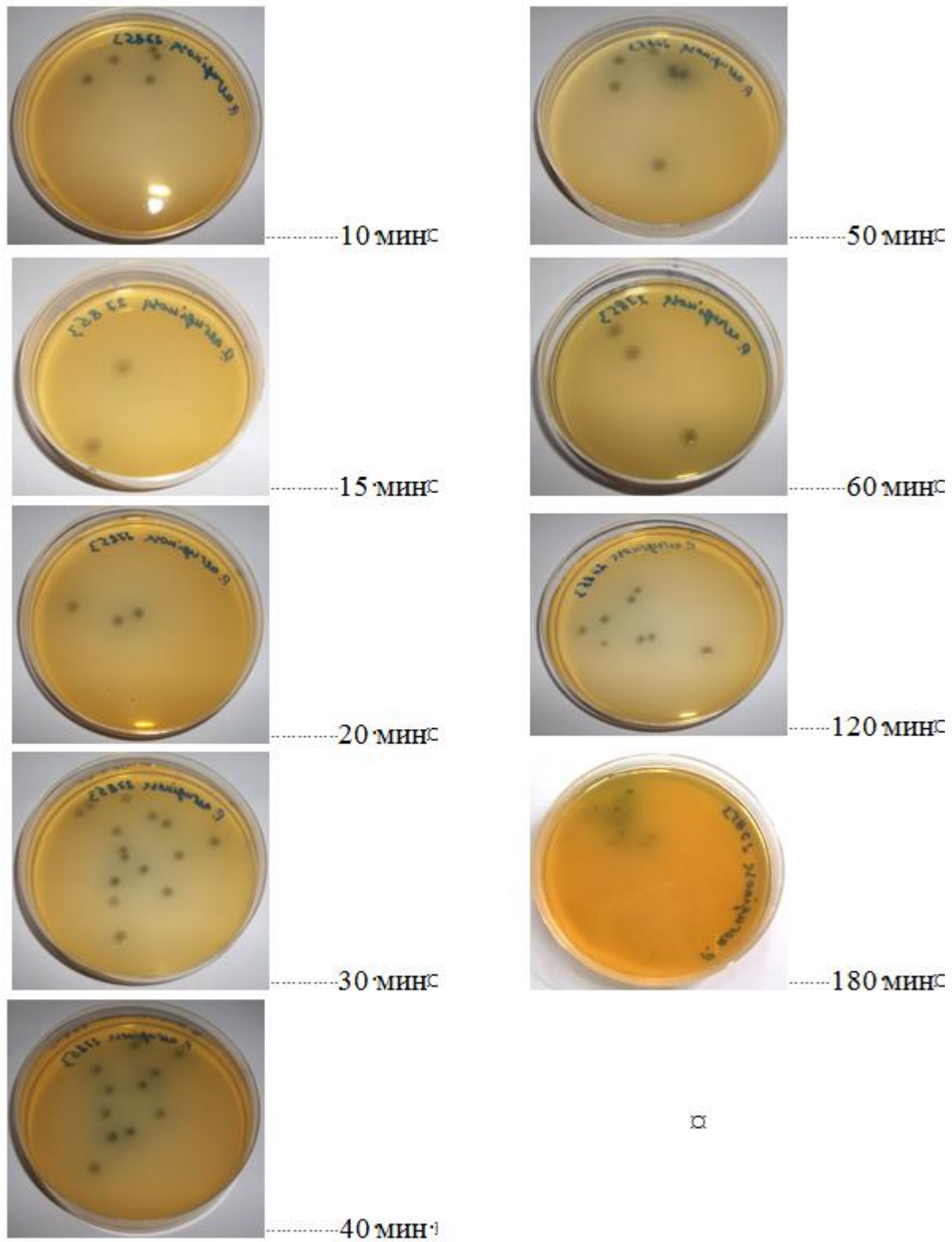


Рисунок 37 – Изменение числа КОЕ бактерий *P. aeruginosa* 27853 после ФДВ  
(МС = 0,5 %;  $I = 200 \text{ мВт/см}^2$ )

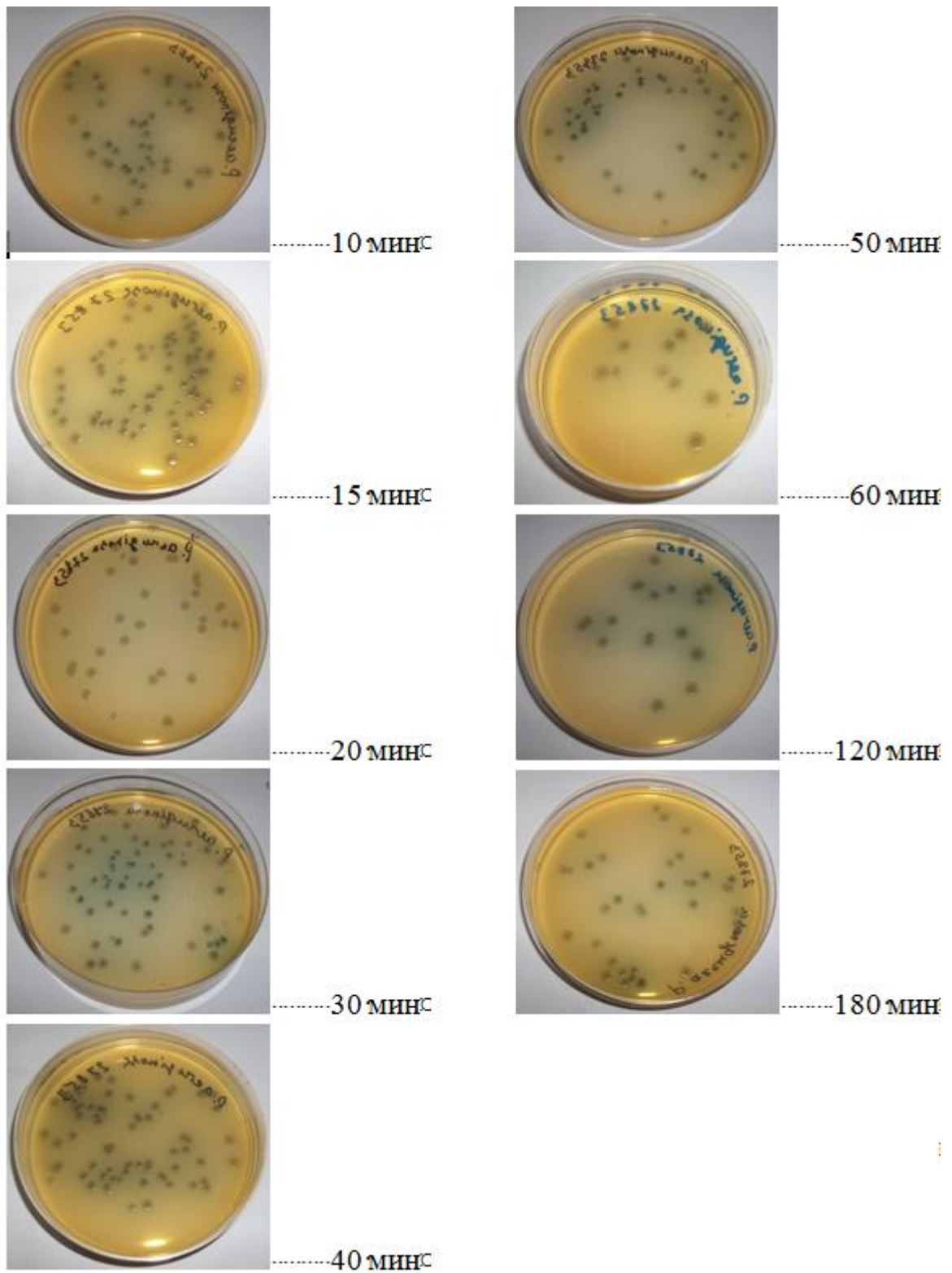
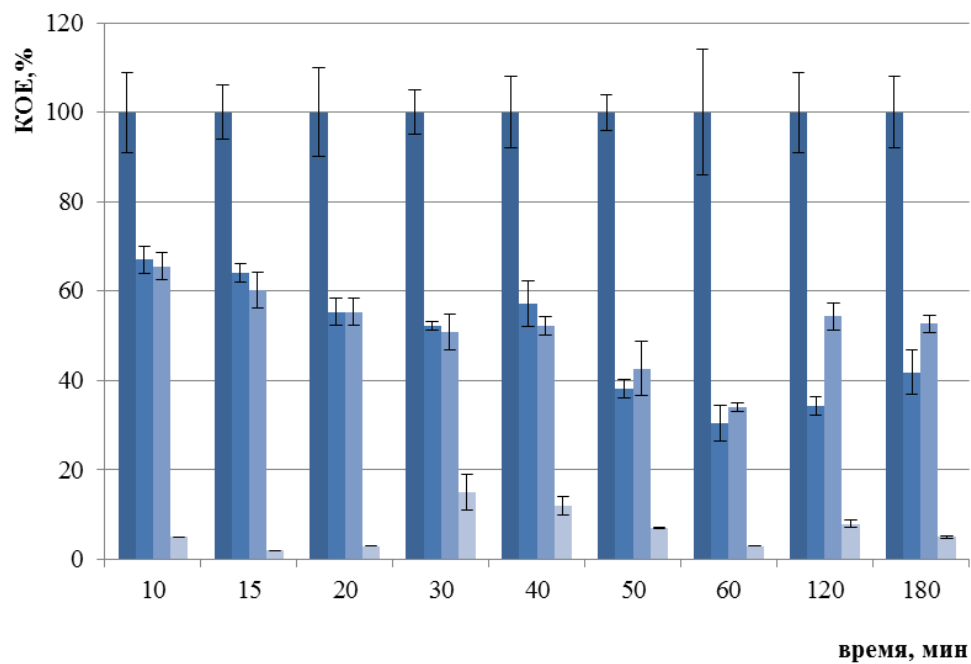
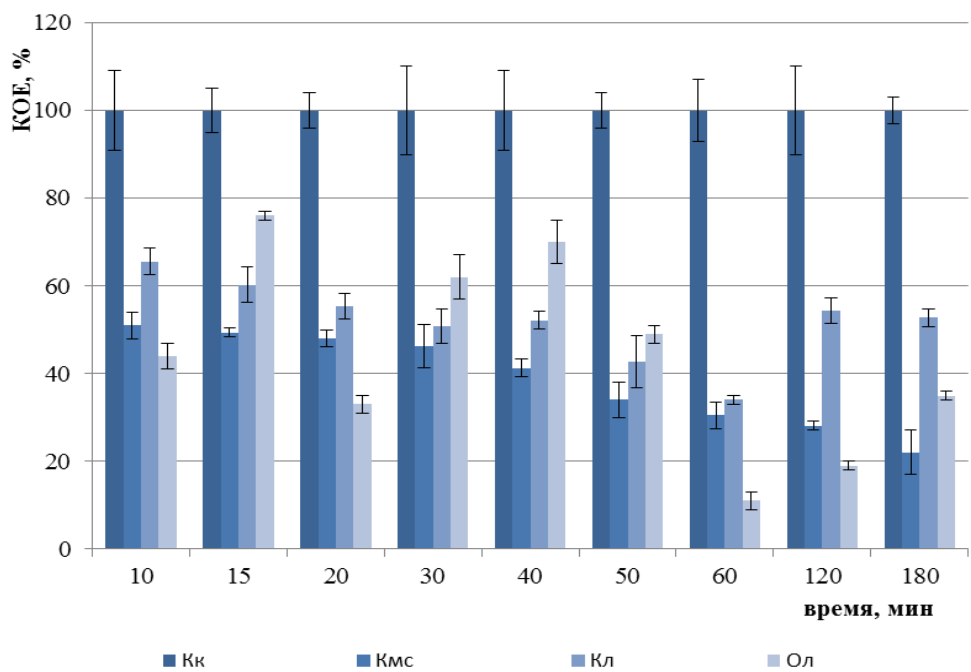


Рисунок 38 – Изменение числа КОЕ бактерий *P. aeruginosa* 27853 после ФДВ  
(МС = 5 %;  $I = 200$  мВт/см<sup>2</sup>)



а



б

Рисунок 39 - Изменение числа КОЕ бактерий *P. aeruginosa* 27853 после ФДВ:

$I=200$  мВт/см<sup>2</sup>; МС=0,5% (а); МС=5% (б)

Таблица 6 – Размеры клеток *P. aeruginosa* spp. до и после ФДВ, мкм

Штамм бактерий	Размеры клеток до ФДВ		Размеры клеток после ФДВ	
	длина	ширина	длина	ширина
<i>P. aeruginosa</i> 27533	2,11 ± 0,04	0,61 ± 0,02	2,13 ± 0,04	0,61 ± 0,02
<i>P. aeruginosa</i> 27853	2,08 ± 0,06	0,79 ± 0,01	2,10 ± 0,02	0,48 ± 0,01

При посеве взвеси *P. aeruginosa* 27853 после ФДВ на 5 % кровяной агар было отмечено отсутствие гемолитической активности в случае облучения лазером ( $I = 200 \text{ мВт/см}^2$ ) с 5 %-ным раствором МС в течение 20 мин (Рисунок 41).

Гемолитическая активность является важным фактором патогенности псевдомонад (Коротяев, 2002). Поскольку гемолитическая активность клеток штамма *P. aeruginosa* 27853 была утрачена под действием ФДВ, решено было проверить патогенные свойства этих бактерий на белых крысах. Взвесью культуры *P. aeruginosa* 27853, утратившей гемолитическую активность после ФДВ, провели накожное заражение 10-ти белых крыс. Другую группу из 10-ти крыс заразили аналогичным способом интактной культурой (контроль). Наблюдали за животными в течение 14 суток. В контрольной группе на 4-5 сутки после заражения отмечалась пиодермия, на поверхности скарифицированной кожи был сине-зеленый гной.

Зарегистрировано повышение температуры тела до  $41 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , снижение аппетита. В опытной группе животных пиодермии не наблюдали, температура тела сохранялась нормальная, отклонений в поведении животных не отмечали.

Таким образом, на первом этапе исследований были выбраны штаммы грамотрицательных бактерий *E. coli* В6, *E. coli* К12, *E. coli* О1, *P. aeruginosa* 27533, *P. aeruginosa* 27853 для проведения модельных экспериментов по инактивации бактерий методом ФДВ. Обоснованно выбран фотосенсибилизатор метиленовый

Таблица 7 – Биохимические свойства бактерий *P. aeruginosa* spp. до и после после ФДВ

Штамм бактерий	ПОДВИЖНОСТЬ	Среда Олькеницкого				уреаза	маннит	малонат	фенилаланин	желатина	ЛИЗИН	ПИГМЕНТ пиоцианин
		ГЛЮКОЗА	ЛАКТОЗА	МОЧЕВИНА	H <sub>2</sub> S							
<i>P. aeruginosa</i> 27533 до ФДВ	+	к	к	-	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 27533 после после ФДВ	+	к	к	-	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 27853 до ФДВ	+	к	к	-	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 27853 после после ФДВ	+	к	к	-	+	-	±	+	+	+	±	±



Рисунок 40 – Рост клеток *P. aeruginosa* 27853 после ФДВ (МС = 0,5 %;  $I = 200$  мВт/см<sup>2</sup>), отсутствие пигмента пиоцианина



а



б

Рисунок 41 – Рост культуры *P. aeruginosa* 27853 на 5 % кровяном агаре: интактные бактерии, гемолиз (а); бактерии после ФДВ ( $I = 200$  мВт/см<sup>2</sup>, МС = 5%) в течение 20 мин, отсутствие гемолитической активности (б)



синий и его концентрация 0,005 %. Определена длина волны облучения ( $650 \pm 10$  нм) и источник излучения (световые диоды).

Разработана и создана лабораторная установка для проведения фотоинаktivации бактерий *E. coli* B6, *E. coli* K12, *E. coli* O1 и *P. aeruginosa* 27533, которая имеет ряд несомненных преимуществ перед уже имеющимися:

во-первых, ФДВ на бактериальные клетки проходило в стерильных условиях, что позволило использовать инаktivированные бактерии для дальнейших исследований (микробиологических, серологических и биологических);

во-вторых, используя установку можно варьировать концентрацию бактериальных клеток, фотосенсибилизатора, параметры облучения, такие как длительность, доза, плотность мощности излучения;

в-третьих, за один сеанс облучения удается получить препаративное количество (38,4 мл) бактериальной взвеси;

в-четвертых, благодаря компактным размерам установки ФДВ можно проводить в ламинарном боксе, анаэроостате или термостате с фиксированной температурой.

В результате компьютерного моделирования определена область эффективного воздействия синглетного кислорода на клеточную мембрану бактерий, которая равна диаметру клетки; создана математическая модель взаимодействия бактериальных клеток и излучения, проведена идентификация параметров ФДВ на бактерии *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp.; на основе математического моделирования и компьютерного эксперимента найдены коэффициенты, определяющие нелинейную модель взаимодействия света с клетками, и показана вероятность инаktivации всех клеток взвеси при длительности облучения более 40 мин.

В эксперименте *in vitro* получены полностью инаktivированные клетки штаммов *E. coli* spp. методом ФДВ при облучении световыми диодами ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>) в течение 60 мин взвесей, содержащих  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл, с добавлением фотосенсибилизатора МС в концентрации 0,005 %.

## **ГЛАВА 4. ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ *BRUCELLA ABORTUS* 19 ВА, *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ И *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ ПОСЛЕ ИНАКТИВАЦИИ МЕТОДОМ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ**

На предыдущем этапе диссертационных исследований нам удалось получить полностью инактивированные бактерии модельных штаммов *E. coli* spp. методом ФДВ на созданной установке. Полученные результаты предопределили возможность проведения на нашей установке инактивации бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 и *Y. pestis* EV для повышения их безопасности. В экспериментах для инактивации бактерий методом ФДВ использовали созданную установку, в состав которой входили красные светодиоды ( $\lambda_0 = 650 \pm 10$  нм), плотность мощности излучения составляла  $I = 1, 3$  и  $5$  мВт/см<sup>2</sup>. В качестве фотосенсибилизатора использовали растворы МС в концентрациях 0,0005; 0,005; 0,05 %. Время взаимодействия меняли от 5 до 360 мин. Наряду с опытными исследованиями проводили контрольные, учитывая воздействие на бактерии только фотосенсибилизатора или светодиодного излучения.

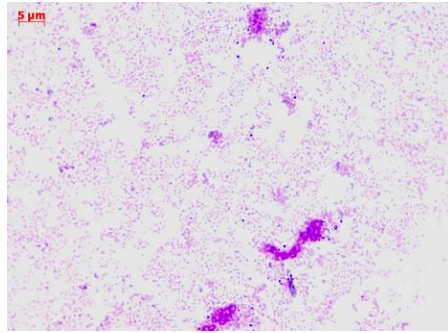
### **4.1. Характеристика культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств бактерий вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА после инактивации**

Для выполнения настоящего раздела диссертационной работы использовали бактерии вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА. На первом этапе исследований проверяли культурально-морфологические, биохимические и тинкториальные свойства для подтверждения типичных свойств выбранного штамма бактерий. Клетки *B. abortus* 19 ВА представляли собой мелкие грамтрицательные овоидные

микроорганизмы размерами  $0,3 \times 0,6$  мкм. Жгутиков не имели, спор и капсул не образовывали. На бруцеллагаре на 2-3 сутки образовывались гладкие, бесцветные, прозрачные, выпуклые (холмиком) колонии в диаметре от 1 до 4 мм, которые на 4-5 сутки мутнели. В бульоне бактерии штамма *B. abortus* 19 давали помутнение и образование слизистого осадка (Рисунок 42). Оценка биохимических свойств показала, что бактерии *B. abortus* 19 обладали уреазной активностью, выделяли сероводород. Указанные бактерии агглютинировались сывороткой бруцеллезной диагностической моноспецифической адсорбированной кроличьей *anti-abortionis* и полностью лизировались Тб фагом. Таким образом, до инактивации методом ФДВ культура *B. abortus* 19 имела типичные свойства.

В экспериментах по инактивации бактерий вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА использовали взвесь концентрацией  $2 \cdot 10^9$  м.к./мл, эквивалентную отраслевому стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-85П) 10 МЕ (Методические указания ..., 2007) соответствующего года выпуска. Затем, полученную взвесь разводили до содержания  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл. К бактериальной взвеси добавляли МС в концентрациях 0,0005; 0,005 или 0,05 %. Воздействовали излучением красных светодиодов ( $\lambda_0 = 650 \pm 10$  нм), мощностью 0,2; 0,6 и 1 мВт с плотностью мощности 1, 3 и 5 мВт/см<sup>2</sup>, соответственно. Время инактивации составляло от 5 до 60 мин. Наряду с опытными исследованиями проводили контрольные, учитывая независимое воздействие на бактерии МС и СД. Результаты представлены на рисунках 43-45.

Сравнивая результаты инактивации, следует отметить, что наиболее выраженная бактерицидная активность, при которой количество КОЕ *B. abortus* 19 снижалось до  $5 \pm 0,9$  %, была после ФДВ ( $I = 5$  мВт/см<sup>2</sup>) в течение 50 мин при добавлении в бактериальную взвесь МС в концентрации 0,05 %. При использовании концентрации МС = 0,005 % число КОЕ *B. abortus* 19 снижалось до  $9 \pm 0,2$  % после ФДВ ( $I = 3$  мВт/см<sup>2</sup>) в течение 60 мин. Минимальная концентрация МС = 0,0005 %, которую



а

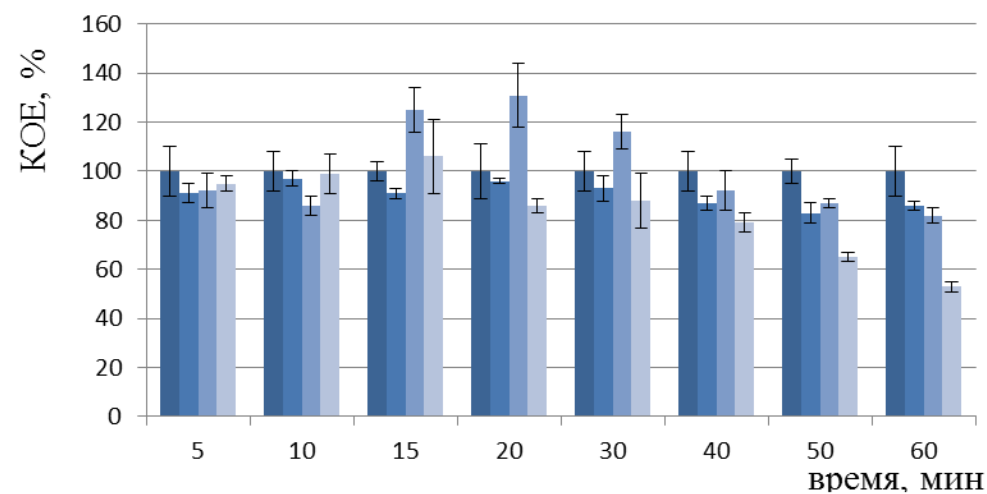


б

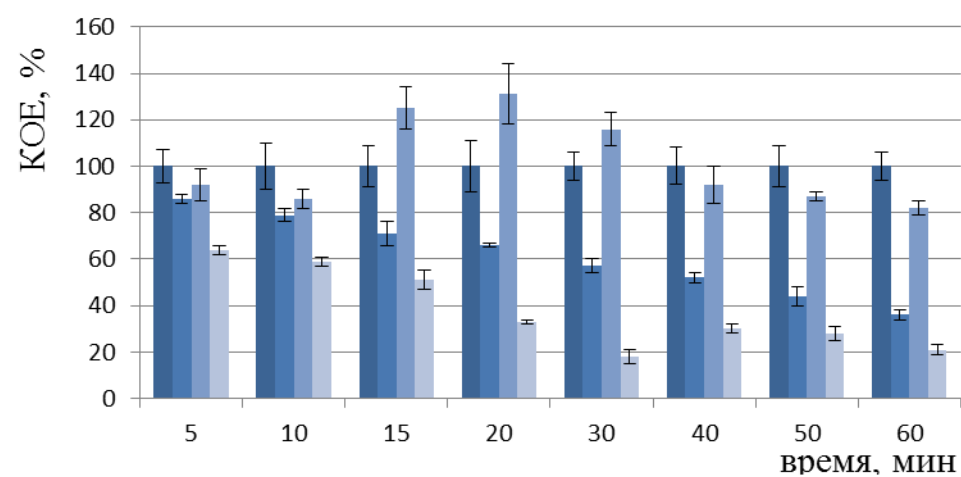


в

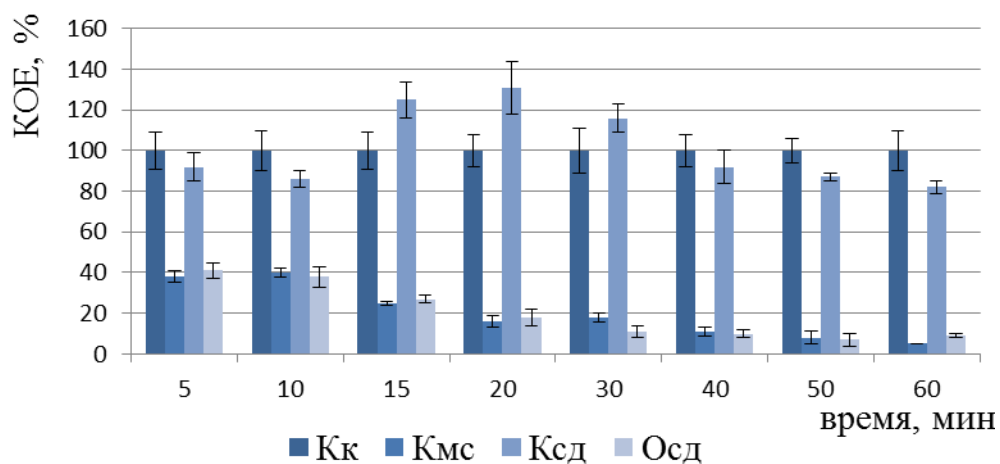
Рисунок 42 — Изучение типичных культурально-морфологических свойств штамма *B. abortus* 19 VA: а – морфология и размеры клеток, б – рост в эритрит бульоне, в – колонии на эритрит агаре



а

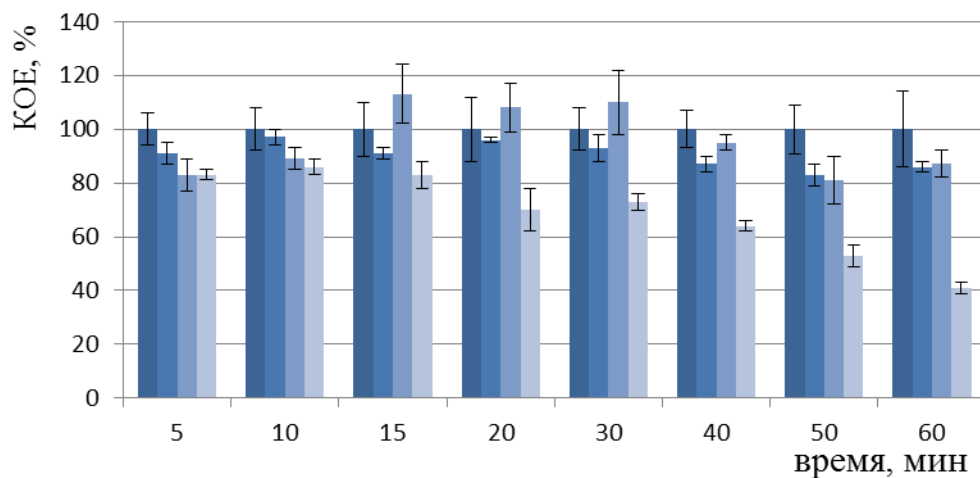


б

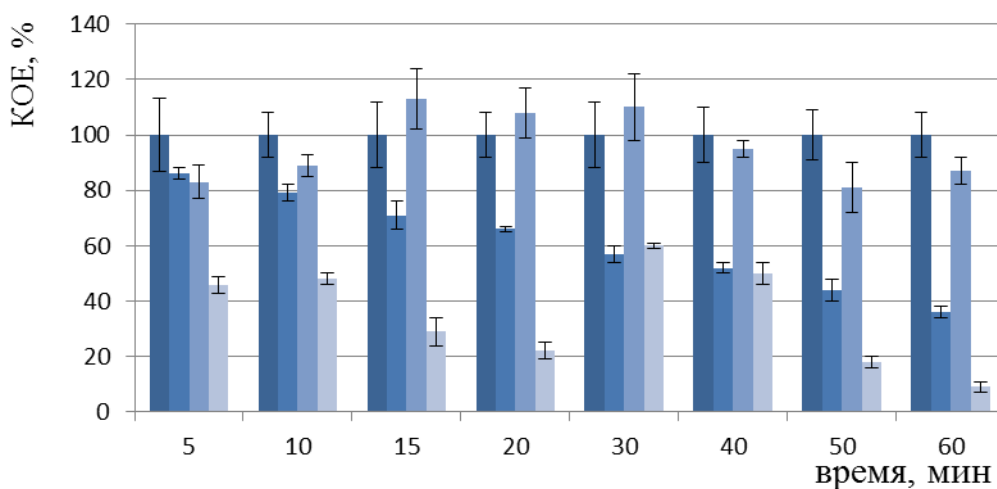


в

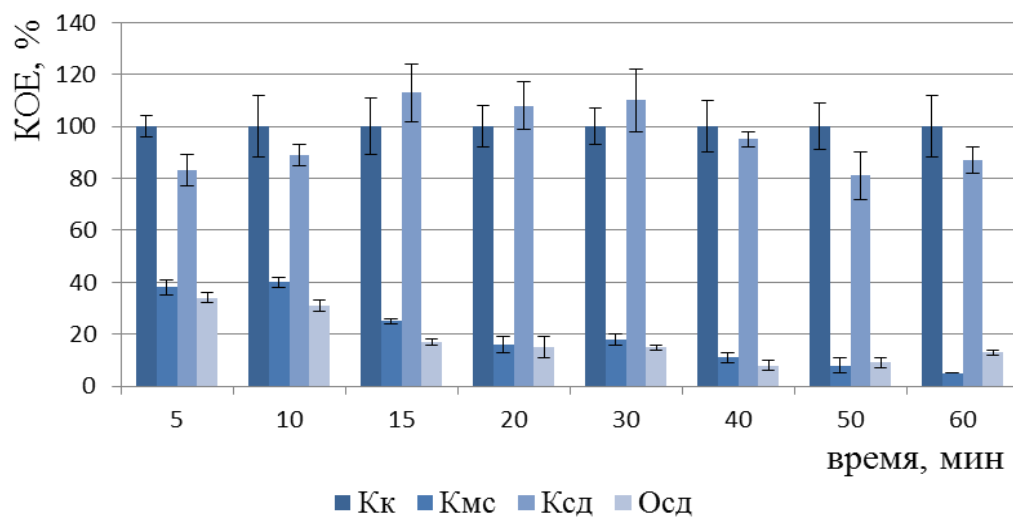
Рисунок 43 – Изменение числа КОЕ бактерий *V. abortus* 19 ВА (Осд) после ФДВ ( $1 \text{ мВт/см}^2$ ): экспозиции с МС в концентрациях 0,0005 % (а); 0,005 % (б); 0,05 % (в) в течение 5–60 мин; Кк – контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Ксд – контроль облучения световыми диодами



а



б



в

Рисунок 44 – Изменение числа КОЕ бактерий *V. abortus* 19 ВА (Осд) после ФДВ (3 мВт/см<sup>2</sup>): экспозиции с МС в концентрациях 0,0005 % (а); 0,005 % (б); 0,05 % (в) в течение 5–60 мин; Кк – контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Ксд – контроль облучения световыми диодами

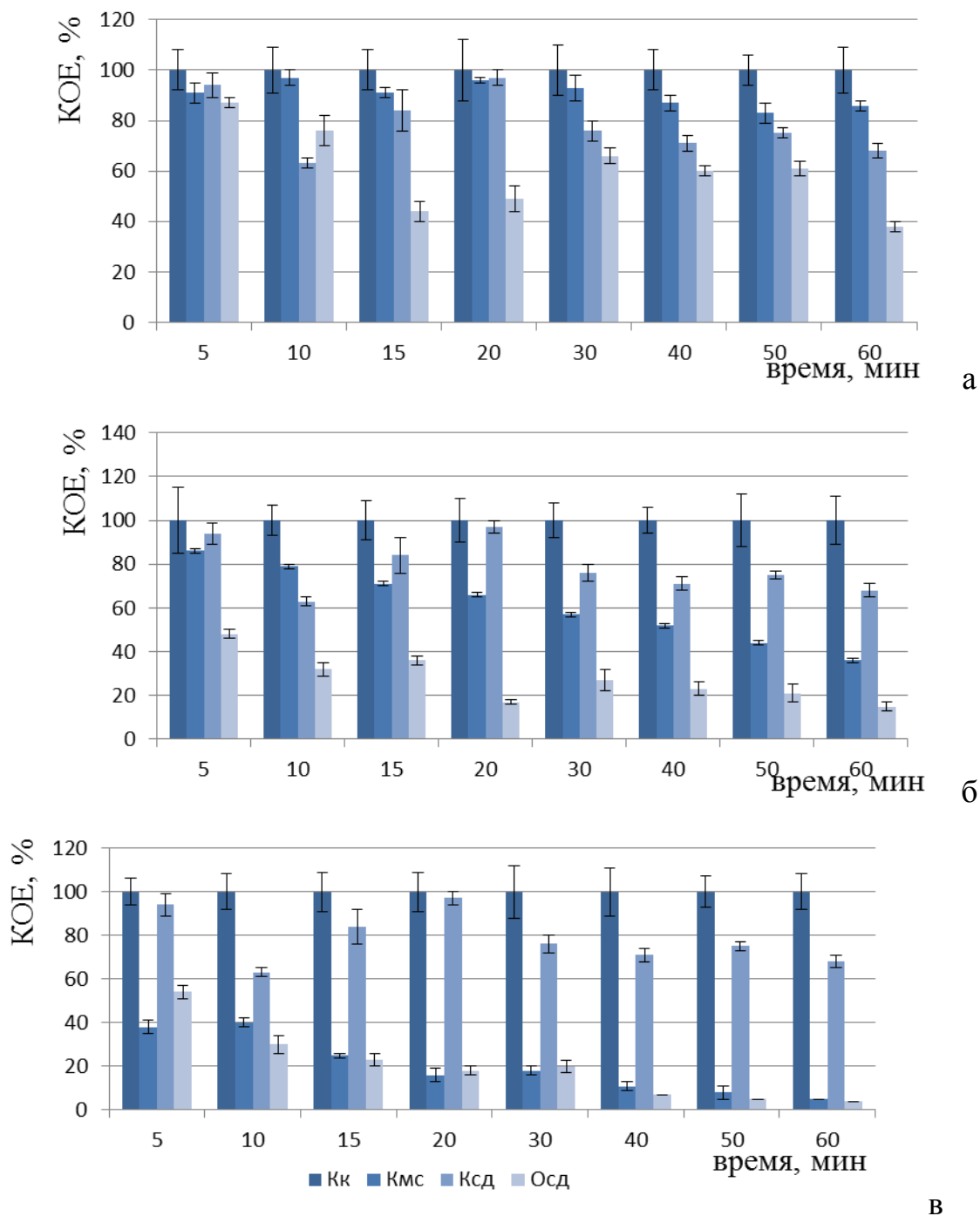


Рисунок 45 – Изменение числа КОЕ бактерий *V. abortus* 19 ВА (Осд) после ФДВ ( $5 \text{ мВт/см}^2$ ): экспозиции с МС в концентрациях 0,0005 % (а); 0,005 % (б); 0,05 % (в) в течение 5–60 мин; Кк - контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Ксд – контроль облучения световыми диодами

использовали в эксперименте, приводила к снижению числа КОЕ *B. abortus* 19 лишь до  $38 \pm 4$  % после 60 мин ФДВ ( $I = 5$  мВт/см<sup>2</sup>). В результате анализа контрольных значений КОЕ, при проведении облучения бактерий *B. abortus* 19 без фотосенсибилизатора, в ряде случаев выявлена стимуляция роста клеток. Наибольшее количество КОЕ =  $131 \pm 13$  % было при облучении в течение 20 мин световыми диодами с  $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>.

В ходе проведенных экспериментов по инактивации бактерий вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА методом ФДВ полной инактивации клеток указанного штамма зарегистрировано не было. В связи с тем, что на результат инактивации бактерий влияет комбинация параметров ФДВ, а именно концентрация фотосенсибилизатора, плотность мощности и время воздействия светодиодного излучения, проведено компьютерное моделирование взаимодействия бактериальной взвеси и светодиодного излучения. Экспериментально для каждой бактериальной взвеси *B. abortus* 19, также как и для микроорганизмов *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp., измеряли отношение:

$$M = \frac{K_c}{K_o}, \quad (17)$$

где  $K_o$  – количество живых клеток в облучаемой взвеси,

$K_c$  – количество клеток, выживших после облучения.

Модель первого типа. Зависимость  $M$  от комбинированного параметра облучения  $(C \cdot P \cdot T)$  искали в виде:

$$M(C \cdot P \cdot T) = \alpha_1 + \alpha_2 \exp \left[ -\frac{(C \cdot P \cdot T - \alpha_3)^2}{(\alpha_4)^2} \right], \quad (18)$$



где  $C$  – концентрация фотосенсибилизатора,  $P$  – средняя мощность облучения,  $T$  – длительность облучения,  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4$  – искомые константы.

После проведения подгонки параметров методом наименьших квадратов, была определена теоретическая зависимость, аппроксимирующая экспериментальные данные (Рисунок 46). Как видно эта зависимость аналогична зависимости полученной при облучении бактерий штаммов *P. aeruginosa* 27533, *E. coli* B6, *E. coli* K12 и *E. coli* O1 световыми и лазерными диодами на длине волны  $\lambda_0 = 650$  нм при  $\lambda_d = 10$  нм с плотностью мощности 1, 3 и 5 мВт/см<sup>2</sup>.

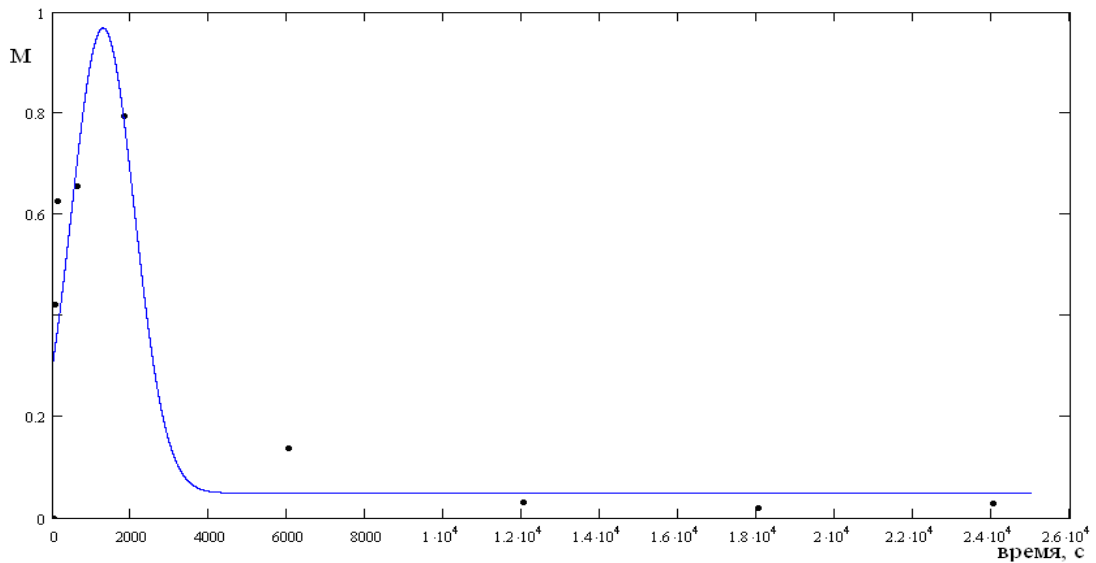


Рисунок 46 – Зависимость относительного количества выживших клеток *B. abortus* 19 ВА от времени облучения световыми диодами: точки – экспериментальные данные, сплошная линия – аппроксимирующая кривая

Идентификацию параметров математической модели (18) проводили на основе экспериментальных результатов. В таблице 8 представлены коэффициенты, определяющие нелинейную модель взаимодействия клеток *B. abortus* 19 ВА и светодиодного излучения.

Как следует из результатов компьютерного моделирования при ФДВ на взвесь бактерий *B. abortus* 19 ВА, инактивация более 99 % клеток происходит после 6 мин облучения ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>) в комбинации с 0,005 % МС.

Таблица 8 – Идентификация параметров взаимодействия клеток *B. abortus* 19 ВА и светодиодного излучения (математическая модель)

Штамм бактерий	Тип облучения	Коэффициенты, определяющие нелинейную модель				
		<i>B. abortus</i> 19 ВА	Световыми диодами	$\alpha_1 = 0,21$	$\alpha_2 = 0,264$	$\alpha_3 = 140$

Однако эти данные требуют проведения эксперимента *in vitro*, т.к. по результатам предварительных экспериментов, представленных на рисунках 43-45 видно, что облучение даже в течение 1 ч не вызывает 100 % инактивации бактерий. Дальнейшие эксперименты по ФДВ на бактерии *B. abortus* 19 ВА были проведены только при добавлении МС в концентрации 0,005 % и  $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>.

Светодиодное красное излучение ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>) в комбинации с 0,005 % МС подавляло рост бактерий *B. abortus* 19 ВА при длительности воздействия от 5 до 120 мин. Через 3 ч ФДВ рост клеток *B. abortus* 19 ВА на эритроцит агаре полностью отсутствовал, срок наблюдения 10 сут. (Рисунки 47, 48).

Электронная микроскопия инактивированных бактерий *B. abortus* 19 ВА показала, что размеры клеток незначительно увеличились (Таблица 9), тинкториальные свойства не изменились.

Поскольку сохранение антигенных свойств вакцинного штамма является крайне важным для обеспечения им высокой иммуногенности соответствующей вакцины, на наш взгляд, следовало прояснить - сохранилась ли их активность после ФДВ. Поэтому на следующем этапе мы исследовали специфическую активность антигенов

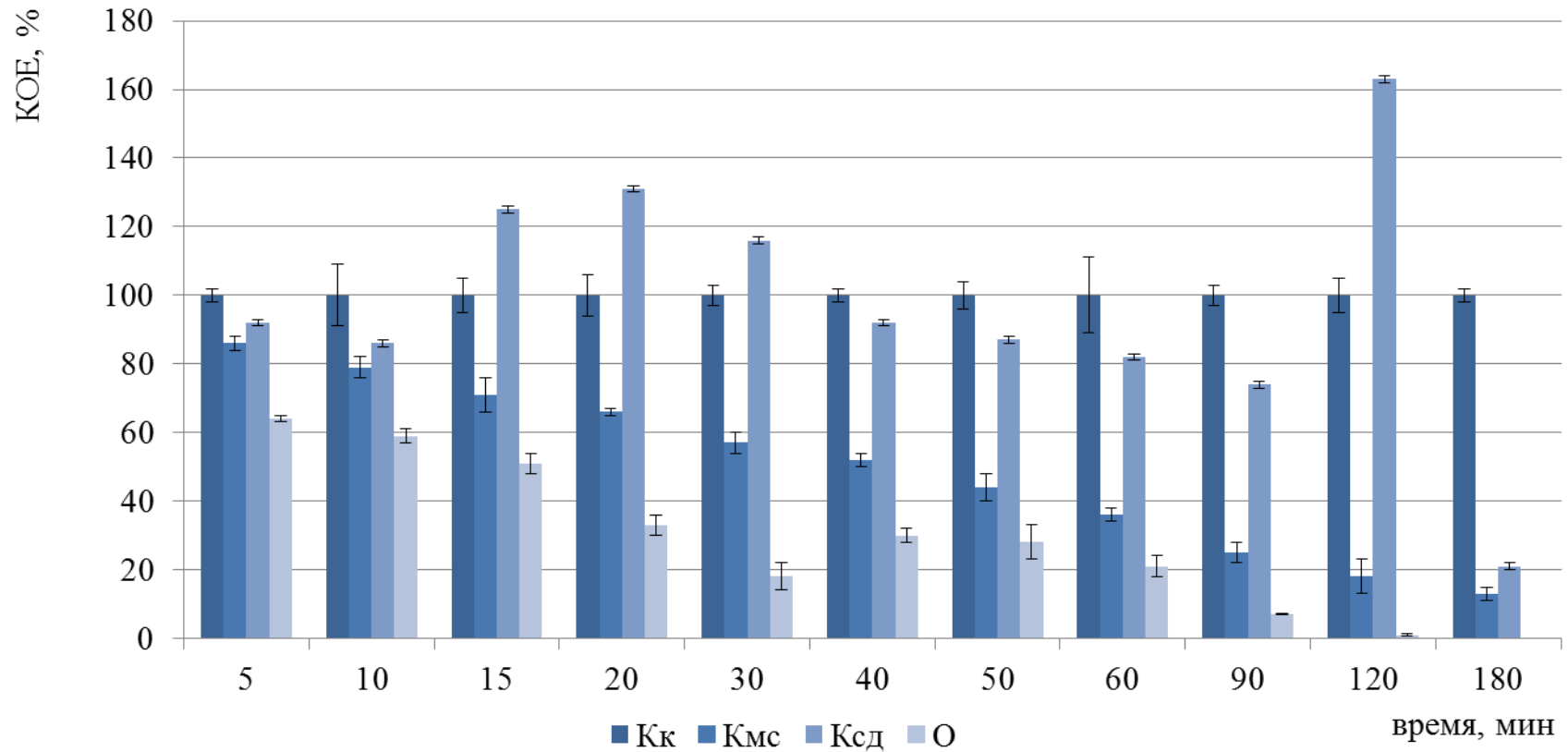


Рисунок 47 – Изменение числа КОЕ бактерий *B. abortus* 19 ВА (О) после ФДВ ( $I = 1 \text{ мВт/см}^2$ ;  $MC = 0,005 \%$ ) в течение 5–180 мин; Кк – контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Ксд – контроль облучения световыми диодами

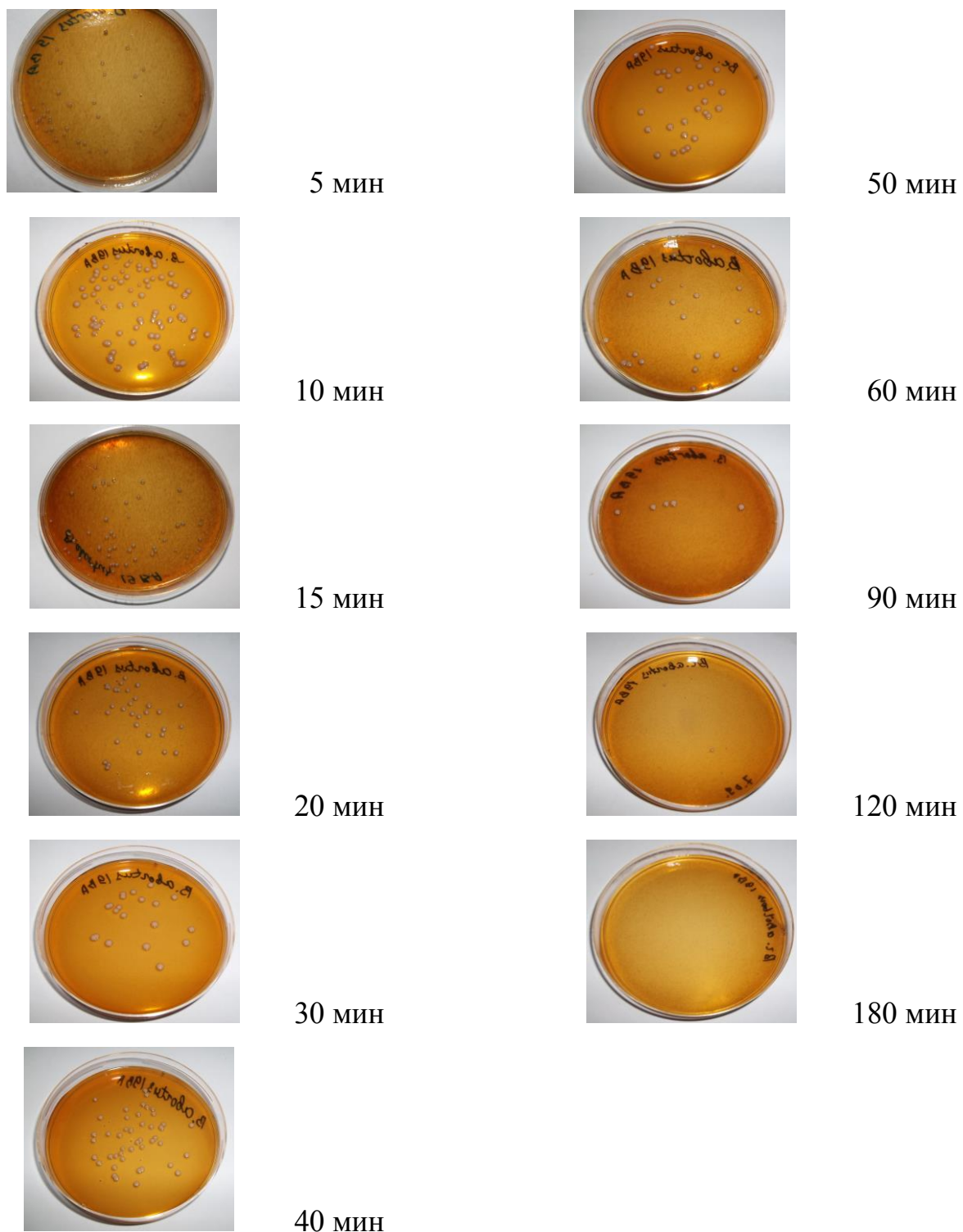


Рисунок 48 – Изменени числа КОЕ бактерий *B. abortus* 19 ВА после ФДВ:

$I=1\text{ мВт/см}^2$ ,  $МС=0,005\%$

полностью инактивированных бактерий *B. abortus* 19 ВА в наиболее часто используемой и хорошо зарекомендовавшей себя системе реакций прямой (РА) и непрямой агглютинации (РНГА). В качестве контроля использовали культуру того же вакцинного штамма, не подвергавшуюся облучению.

Таблица 9 – Размеры клеток *B. abortus* 19 ВА до и после ФДВ

	до ФДВ	после ФДВ
длина, мкм	2,40 ± 0,04	2,68 ± 0,04
ширина, мкм	0,52 ± 0,02	0,57 ± 0,02

Как и предполагалось, было выявлено сохранение антигенной активности клеток *B. abortus* 19 ВА после ФДВ. Так, в опытном и контрольном рядах пробирок РА была оценена на 3 + (до разведения сыворотки 1:160): на дне пробирок наблюдали образование выраженного агглютината с мутной надосадочной жидкостью. Следовательно, клетки вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА после ФДВ сохраняли соматический А-антиген, выявляемый коммерческой диагностической тест-системой.

Постановку РНГА с диагностикумом эритроцитарным бруцеллезным иммуноглобулиновым проводили с использованием бактерий *B. abortus* 19 ВА до и после ФДВ в течение 3 ч. Была отмечена положительная реакция (образование «зонтика») как с интактной, так и с инактивированной культурой в разведении  $3,7 \cdot 10^6$  м.к./мл на 4 + (Рисунок 49).

Таким образом, клетки вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА после инактивации методом ФДВ ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 0,005 %) в течение 3 ч полностью сохранили комплекс диагностически значимых специфических антигенов.

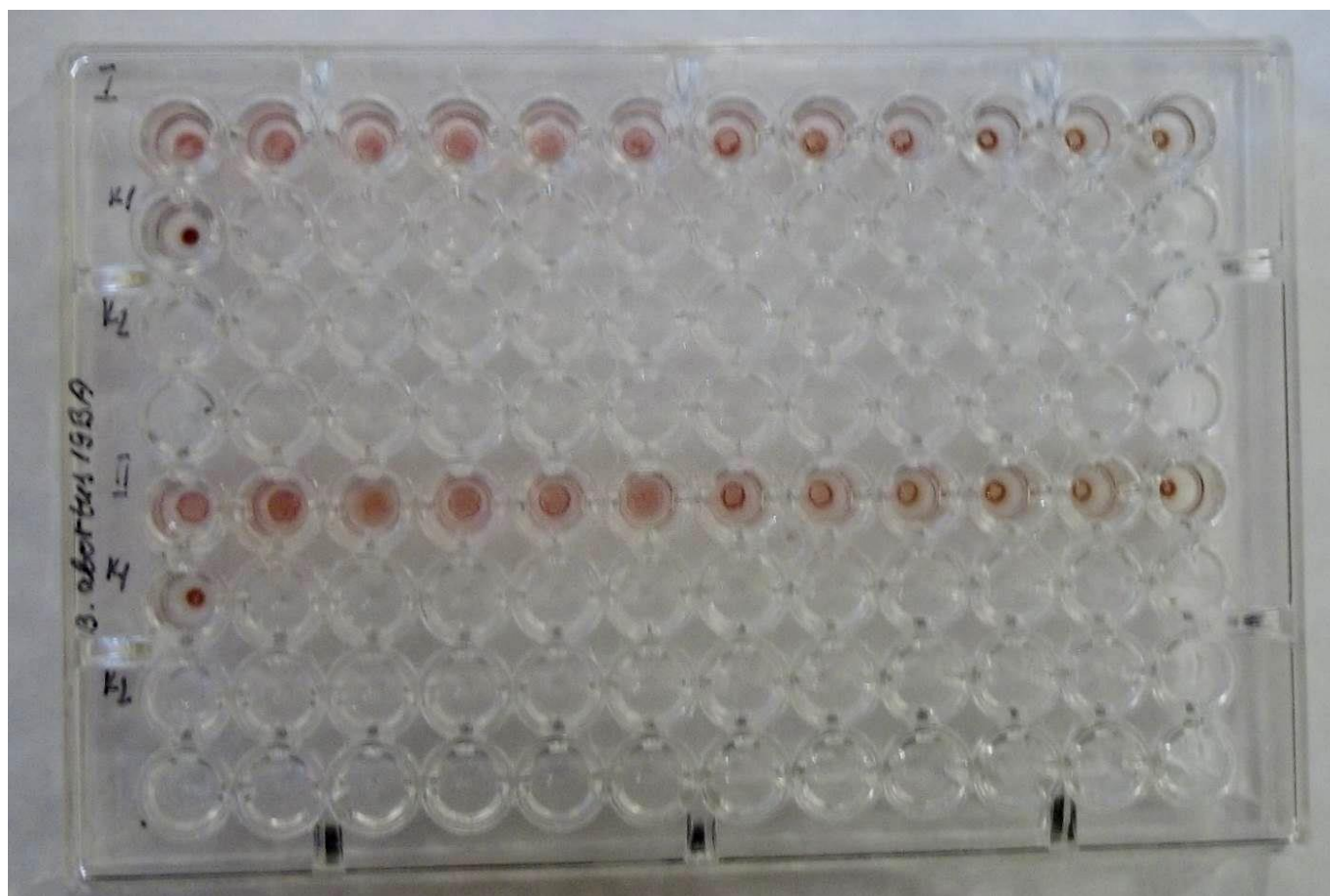


Рисунок 49 – Результаты РНГА с коммерческим иммуноглобулиновым бруцеллезным диагностикумом: I – интактная взвесь *B. abortus* 19 ВА; II – взвесь *B. abortus* 19 ВА после ФДВ в течение 3 ч.

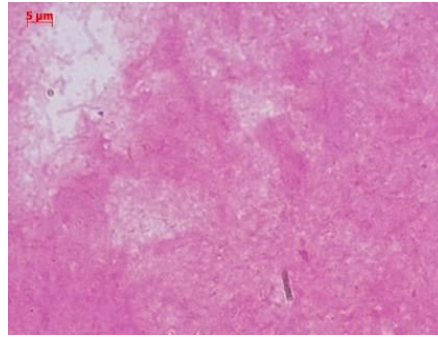
#### **4.2. Характеристика культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ после инактивации**

Первоначально было проведено изучение культурально-морфологических, тинкториальных и биохимических свойств бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Культивировали бактерии при температуре 37 °С на Ft – агаре и МПА. На Ft – агаре клетки указанного штамма формировали круглые, гладкие, блестящие, выпуклые колонии серовато-белого цвета, с ровными краями, размерами до 2 мм в

диаметре. На МПА рост отсутствовал, что является характерным признаком бактерий рода *Francisella*. При микроскопическом исследовании клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 были выявлены типичные очень мелкие неподвижные грамотрицательные бактерии кокковидной формы размерами 0,3 x 0,5 мкм без жгутиков (Рисунок 50). Исследуемые бактерии вакцинного штамма туляремии обладали характерной биохимической активностью: ферментировали глюкозу, мальтозу, маннозу, левулезу; образовывали сероводород; ферментировали пенициллин и не ферментировали фосфатазу, глицерин, цитруллин; не образовывали индол (Таблица 10).

Облучение взвеси клеток вакцинного штамма туляремии с МС в концентрациях 0,0005; 0,005 или 0,05 % проводили с использованием красных светодиодов ( $\lambda_0 = 650 \pm 10$  нм), мощность излучения которых была 0,2; 0,6; 1 мВт, плотность мощности –  $I = 1, 3, \text{ и } 5$  мВт/см<sup>2</sup> соответственно. Для проведения исследований приготавливали взвесь бактерий по отраслевому стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-85П) 10 МЕ соответствующего года выпуска (Методические указания ..., 2007), эквивалентных  $5 \cdot 10^9$  м.к./мл *F. tularensis* 15. Время ФДВ составляло от 5 до 60 мин. Как и в предыдущих экспериментах обязательно проводили опытные и контрольные исследования по независимому влиянию на клетки штамма *F. tularensis* 15 различных концентраций МС и СД излучения. На рисунках 51-53 представлены изменения числа КОЕ бактерий *F. tularensis* 15 после ФДВ.

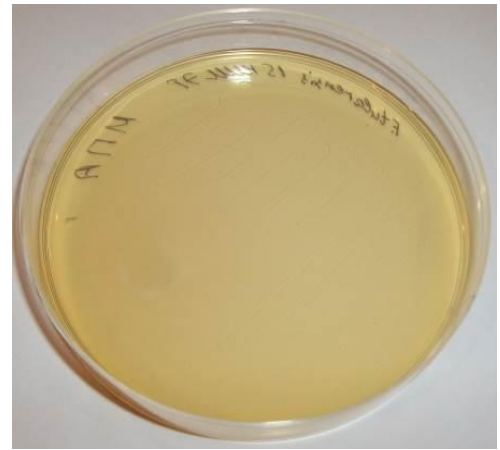
Анализ полученных результатов показал, что МС оказывал бактерицидное действие на культуру *F. tularensis* 15. Снижение количества КОЕ до  $9 \pm 0,1$  % отмечалось при длительности воздействия 60 мин и концентрации МС = 0,05 %. Красное СД излучение вызывало снижение числа КОЕ до  $65 \pm 3$  % ( $I = 5$  мВт/см<sup>2</sup>, воздействие в течение 60 мин) по сравнению с контрольными значениями. Было



а



б



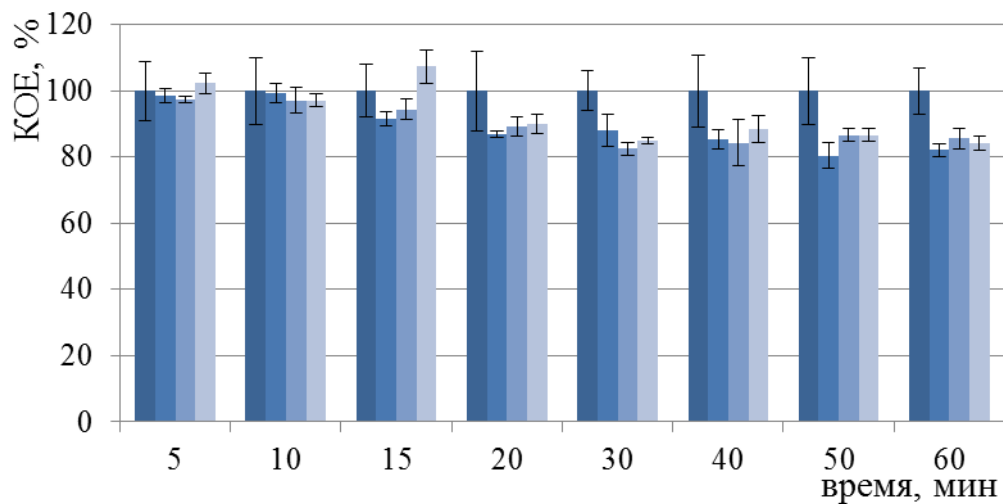
в

Рисунок 50 — Изучение типичных культурально-морфологических свойств штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ: а – морфология и размеры клеток, б – рост на Ft-агаре; в – отсутствие роста на МПА

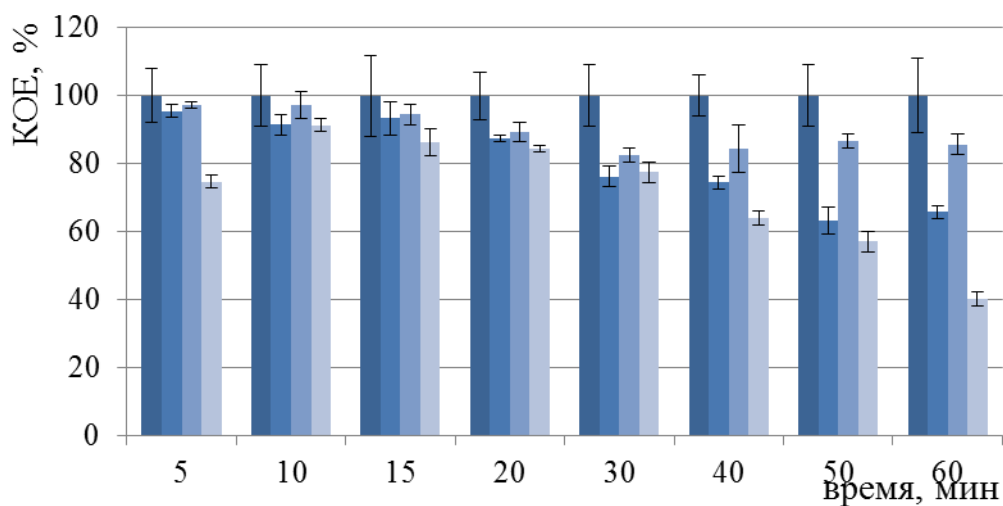


Таблица 10 – Изучение биохимических свойств бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ до ФДВ

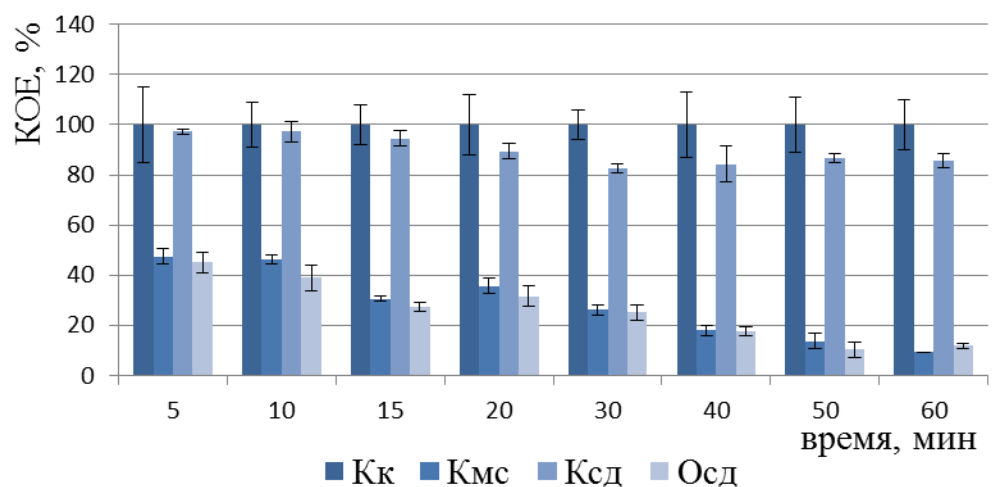
Штамм бактерий	глюкоза	мальтоза	манноза	левулеза	пенициллин	фосфатаза	H <sub>2</sub> S	глицерин	цитруллин	индол
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	+	+	+	+	К	–	+	–	–	–



а



б



в

Рисунок 51 – Изменение числа КОЕ бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ (Осд) после ФДВ (1 мВт/см<sup>2</sup>): экспозиции с МС в концентрациях 0,0005 % (а); 0,005 % (б); 0,05 % (в) в течение 5–60 мин; Кк – контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Ксд – контроль облучения световыми диодами

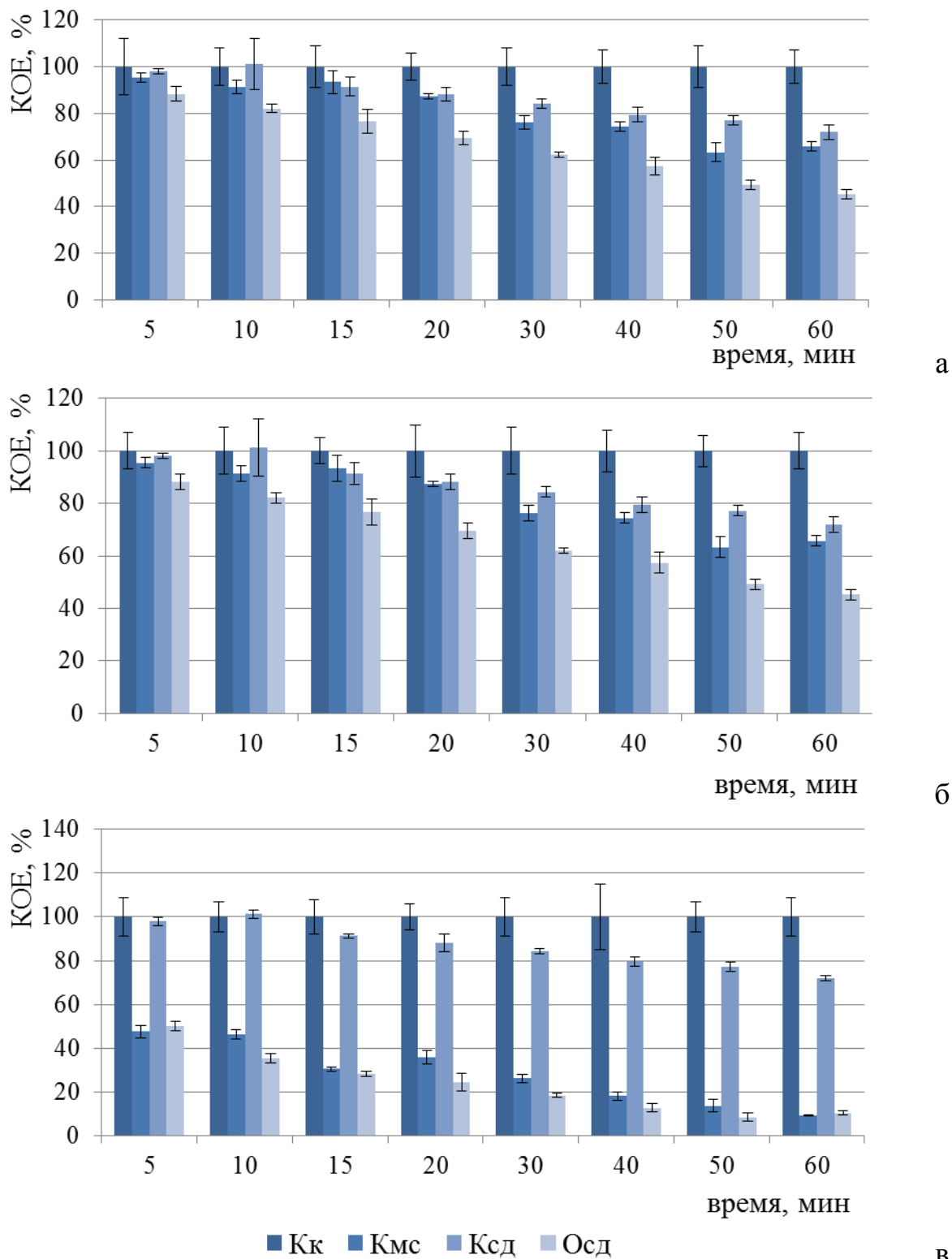


Рисунок 52 – Изменение числа КОЕ бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ (Осд) после ФДВ ( $3 \text{ мВт/см}^2$ ): экспозиции с МС в концентрациях 0,0005 % (а); 0,005 % (б); 0,05 % (в) в течение 5–60 мин; Кк – контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Ксд – контроль облучения световыми диодами

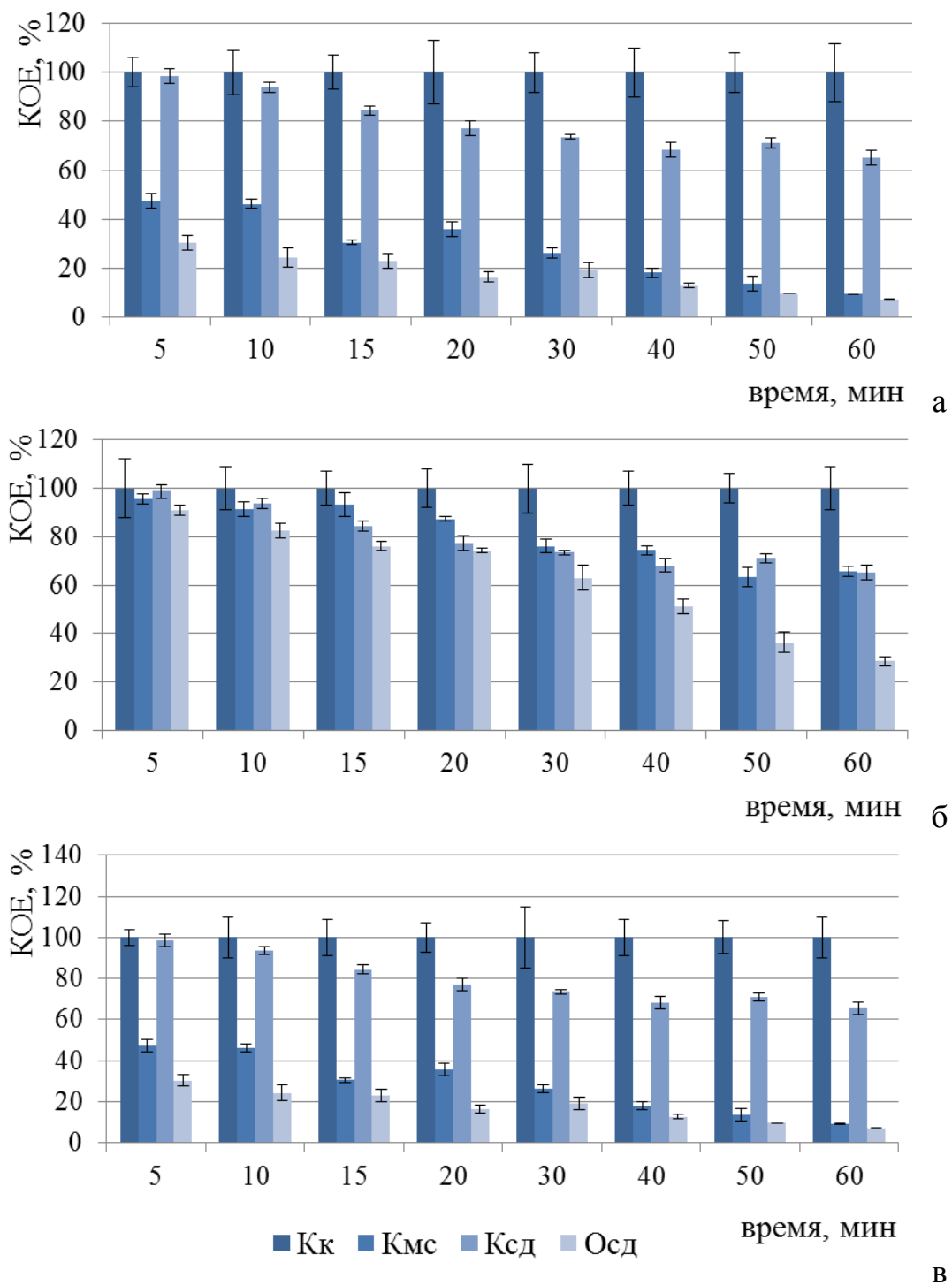


Рисунок 53 – Изменение числа КОЕ бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ (Осд) после ФДВ ( $5 \text{ мВт/см}^2$ ): экспозиции с МС в концентрациях 0,0005 % (а); 0,005 % (б); 0,05 % (в) в течение 5–60 мин; Кк – контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Ксд – контроль облучения световыми диодами

установлено, что ФДВ более выражено повлияло на колониеобразующую способность культуры *F. tularensis* 15.

Наиболее эффективным подавление роста бактерий было при ФДВ в течение 60 мин при  $I = 5 \text{ мВт/см}^2$ , число КОЕ было снижено до  $7 \pm 0,1 \%$ , по сравнению с контрольными значениями. Тем не менее, полной инактивации бактерий *F. tularensis* 15 зарегистрировано не было.

Используя математическую модель первого типа, которую построили для случая инактивации бактерий штамма *P. aeruginosa* 27853, не удалось провести идентификацию параметров взаимодействия клеток вакцинного штамма туляремии и светодиодного излучения. Необходимо было провести построение математической модели иного типа. Предполагалось, что попадание молекулы  $\text{O}_2^*$  в клеточную мембрану инициирует ее первичные изменения, которые описываются величиной  $m^*$ , характеризующей степень поражения клетки-мишени (в данном случае клетки *F. tularensis* 15). Состояние клетки выражается относительной величиной

$$M = \frac{m_0 - m^*}{m_0} \quad (M = 1, \text{ при отсутствии изменений в клетке, } M = 0 \text{ в случае полной}$$

утраты жизнеспособности клетки). В клетке, в процессе облучения, должны запускаться также восстановительные процессы, обусловленные действием АО системы. Эти процессы, как правило, компенсируют изменения, вызванные активацией ПОЛ в клетке, находящейся под ФДВ. Предполагается, что восстановительные способности клетки тем больше, чем меньше изменения в клеточной мембране в результате ПОЛ, инициированных действием свободного радикала  $\text{O}_2^*$ . Тогда, восстановительные процессы в клетке описываются соотношением:

$$dM = \alpha M dt, \quad (19)$$

где  $\alpha$  - скорость восстановления клетки;  $\alpha > 0$ .

Как известно, величина структурных изменений клетки пропорциональна количеству молекул  $O_2^*$ , попадающих в клеточную мембрану и тем больше, чем меньше степень ее поражения  $\mathbf{M}$ . В свою очередь, количество образующихся молекул  $O_2^*$  пропорционально концентрации ( $C$ ) МС и интенсивности света  $I(t)$ , облучающего раствор. Таким образом,

$$d\mathbf{M} = -\beta \cdot \mathbf{M} \cdot C \cdot P(t) dt, \quad (20)$$

где  $\beta$  (положительная константа) – скорость поражения клетки за счет фотодинамического воздействия;  $P(t) = S \cdot I(t)$  – мгновенная мощность излучения, равная произведению мгновенной интенсивности на площадь облучаемой взвеси.

Окончательное уравнение, описывающее динамические изменения в бактериальной клетке, имеет следующий вид:

$$\frac{d\mathbf{M}}{dt} + (\beta \cdot C \cdot P(t) - \alpha) \cdot \mathbf{M} = 0. \quad (21)$$

$P(t)$  является случайной величиной, которая для случая динамических лазерных спеклов подчиняется экспоненциальному статистическому распределению. Контраст спеклов равен 0.7, если для облучения используются деполаризованные спекл-поля, продуцируемые низкокогерентными источниками света (в настоящей работе – световыми диодами).

Была проведена идентификация параметров модели на основе данных экспериментальных исследований. В идеальном случае облучения бактериальной

взвеси светом с постоянной интенсивностью решение последнего уравнения имеет следующий вид:

$$\mathbf{M}(t) = \exp(-[\beta \cdot C \cdot P_o - \alpha]t). \quad (22)$$

С учетом того, что отклик клетки на мгновенное изменение интенсивности может быть существенно нелинейным, решение целесообразно искать в виде (модель второго типа):

$$\mathbf{M}(t) = \exp\left(-\left\{\sum_n \xi_n \cdot (C \cdot P(t))^n\right\} \cdot t\right) \quad (23)$$

С использованием предложенной модели второго типа было проведено компьютерное моделирование процессов облучения клеток *F. tularensis* 15 динамическими спекл-полями. Для характеристики степени поражения мембраны бактерий туляремии в результате ФДВ использовали характеристику  $\text{Lesion} \equiv 1 - \mathbf{M}$ .

Временная динамика этой величины продемонстрирована на рисунке 54. Точками представлены результаты моделирования с использованием соотношения (23). Сплошная кривая – решение, полученное в отсутствие динамических спекл-полей (случай освещения бактериальной взвеси светом с постоянной интенсивностью). Эта кривая описывается математическим выражением (22). Видно, что именно динамика спеклов, а не статическое поле, играет определяющую роль в инактивации клеток. С течением времени (в данном эксперименте после 10 с облучения) степень поражения клеток стремится к некоторому стационарному уровню ( $\text{Lesion} = 1$ ), соответствующему полной инактивации клеток (Рисунок 55), хотя при этом остаются значительные флуктуации этой величины за счет восстановительных процессов в клетке.

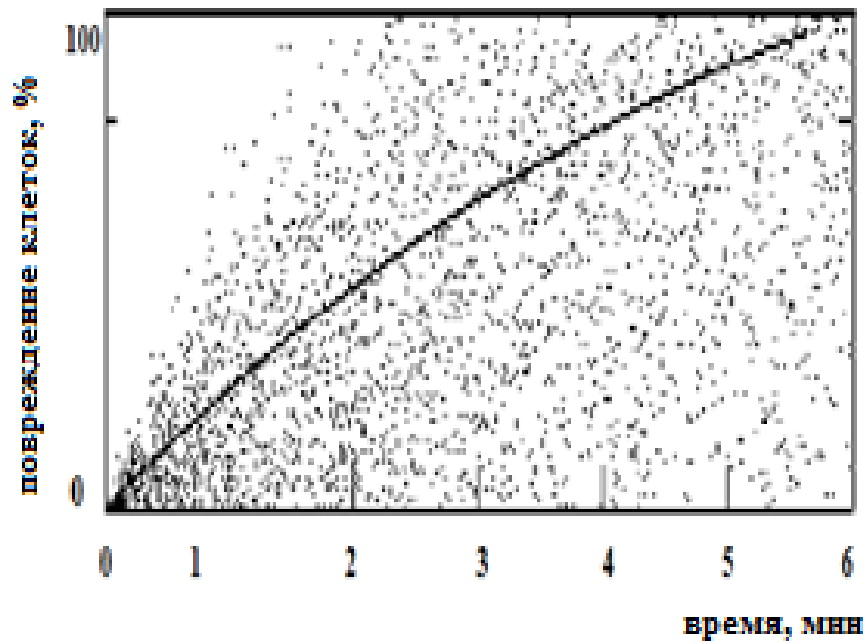


Рисунок 54 – Влияние условий ФДВ на жизнеспособность бактерий *F. tularensis* 15:

$$I = 1 \text{ мВт/см}^2, C = 0,005 \%, t = 3 \text{ с}$$

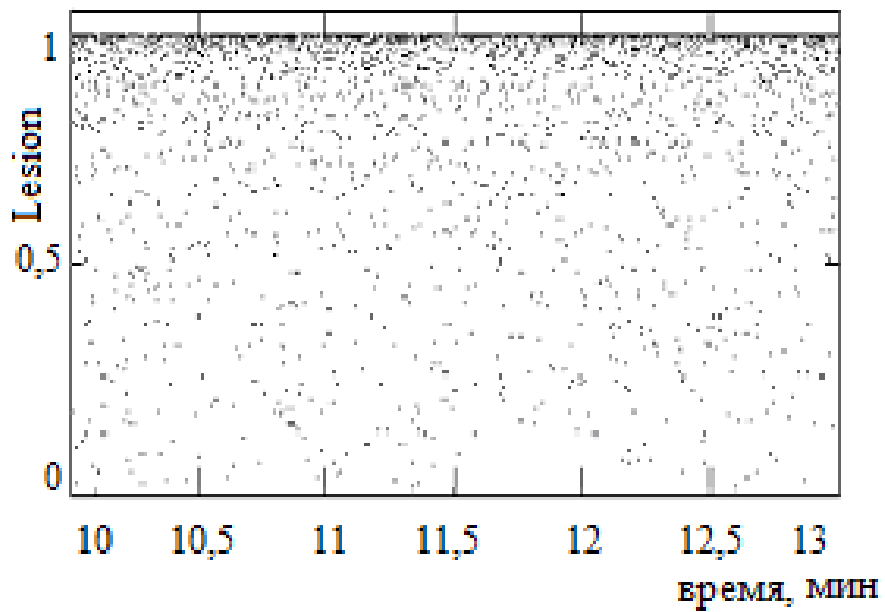


Рисунок 55 – Влияние условий ФДВ на жизнеспособность бактерий *F. tularensis* 15:

$$I = 1 \text{ мВт/см}^2, C = 0,005 \%, \text{ после } 10 \text{ с воздействия}$$



На рисунке 56 представлены плотности распределения вероятности степени инактивации. Видно, что при увеличении времени облучения максимум распределения смещается в окрестность значения  $Lesion = 1$ , что соответствует инактивации всех клеток данной взвеси (Рисунок 56 а–в). При выбранном режиме

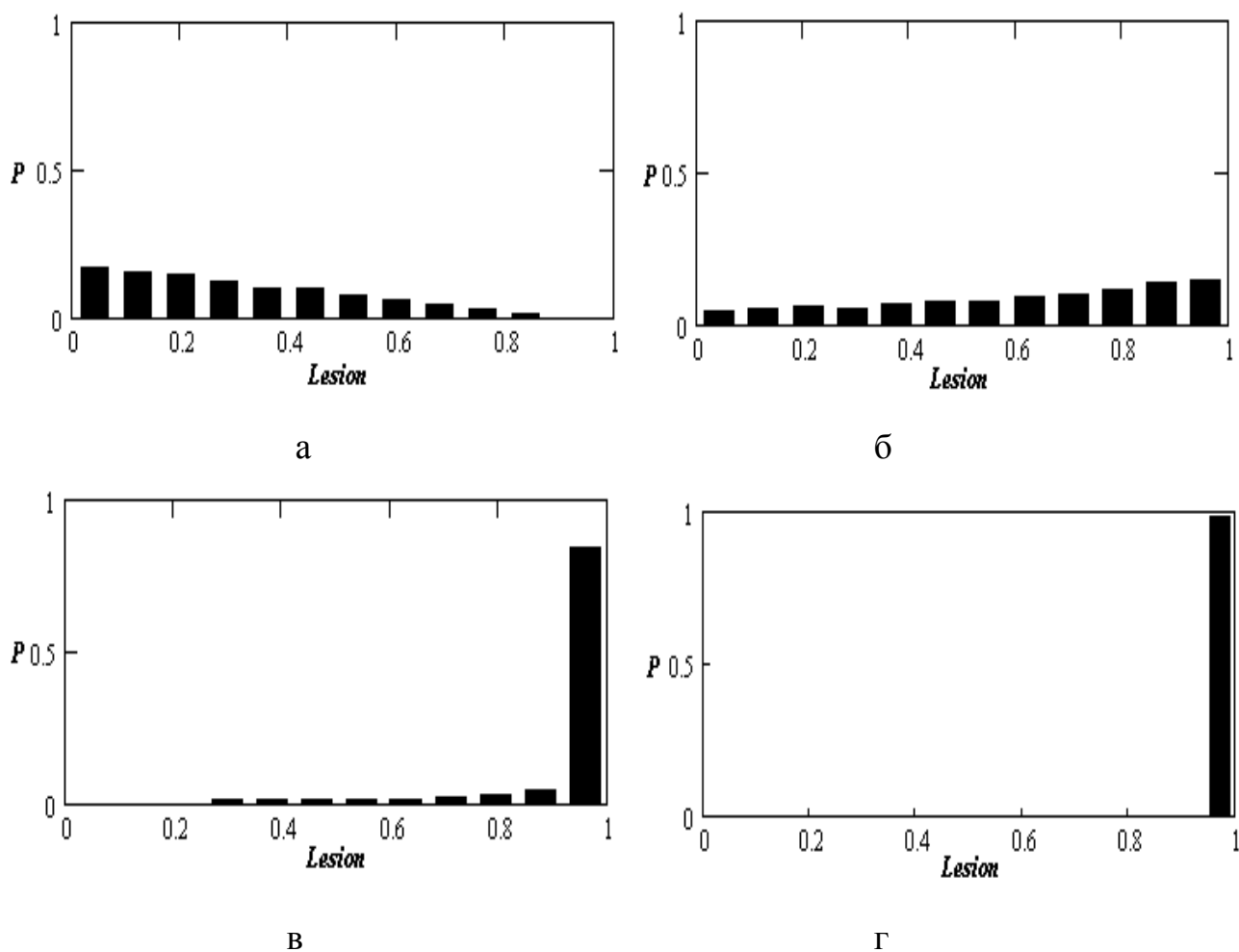
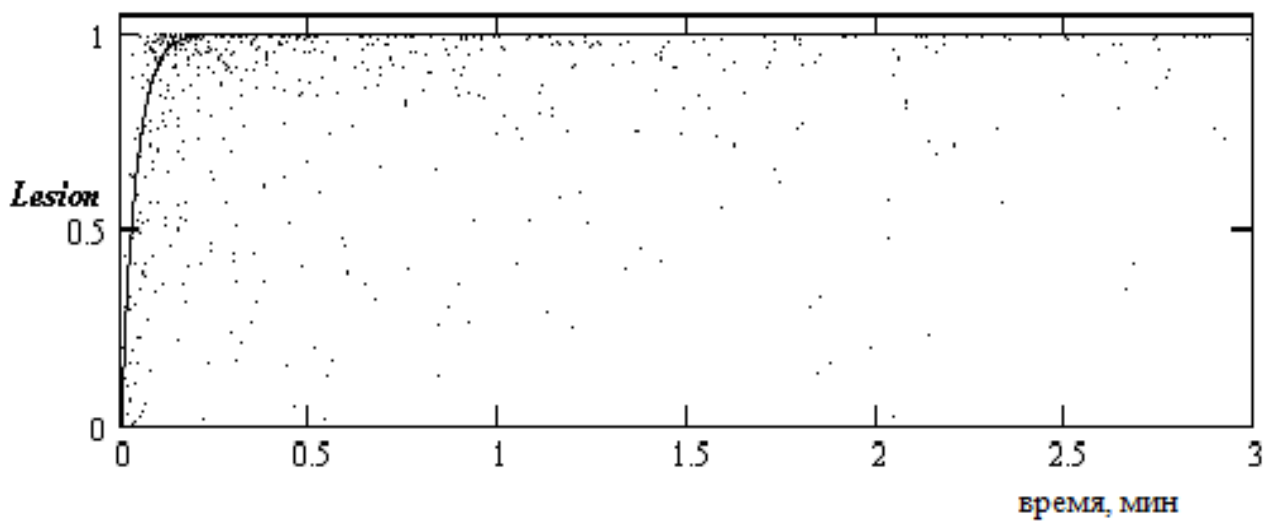


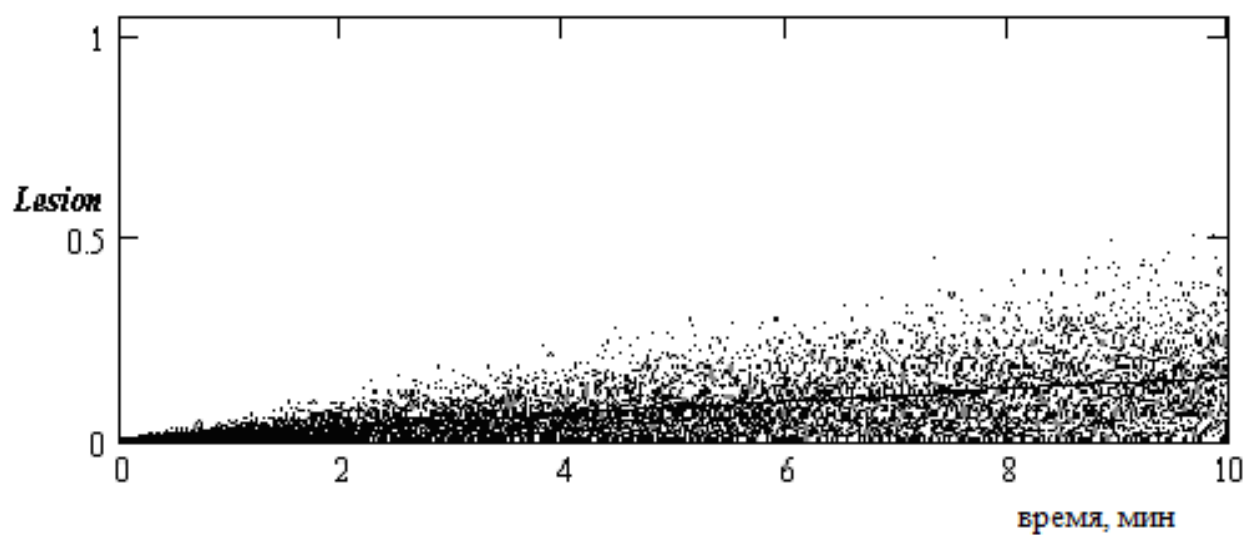
Рисунок 56 – Плотность распределения вероятности степени инактивации клеток *F. tularensis* 15 в процессе ФДВ: а – 0,3 с,  $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>,  $C = 0,005$  %; б – 3 с,  $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>,  $C = 0,005$  %; в – 30 с,  $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>,  $C = 0,005$  %; г – 300 с,  $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>,  $C = 0,005$  %

( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>,  $C = 0,005$  %) гарантированная инактивация 99 % бактерий *F. tularensis* 15 происходит на 6 мин облучения (Рисунок 56 г).

На рисунке 57 а, б представлена динамика процессов инактивации клеток при облучении флуктуирующим спекл-полем при различных значениях средней мощности и концентрации фотосенсибилизатора.



а



б

Рисунок 57 – Динамика инактивации клеток *F. tularensis* 15 в процессе ФДВ,  $C = 0,005\%$ : а –  $P = 1,5$  мВт; б –  $P = 0,01$  мВт

Очевидно, что чем выше значение параметра  $C \cdot P_o$ , тем выше концентрация  $O_2^*$  во взвеси и, как результат, тем быстрее происходит инактивация бактериальных клеток.

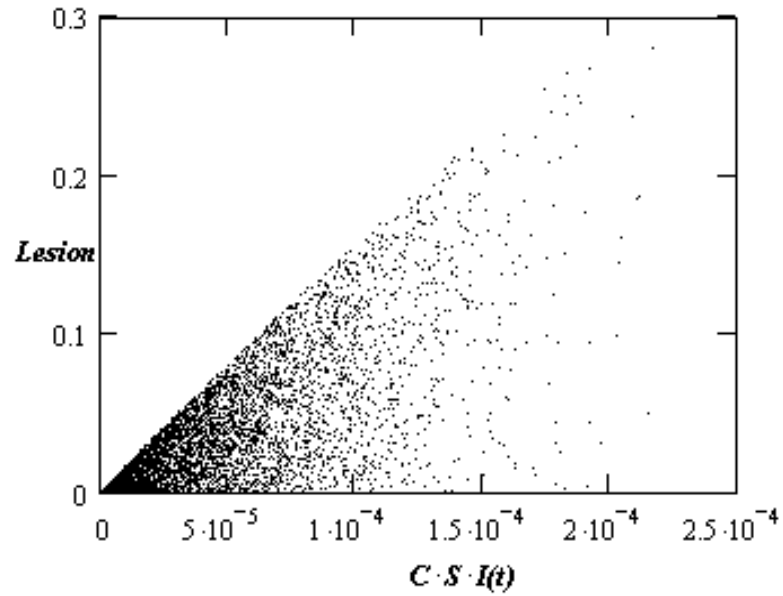
Интересно отметить, что в начальный период облучения степень инактивации клеток практически не коррелирует с флуктуациями интенсивности спекл-поля (Рисунок 58 а). По истечении некоторого времени, когда система переходит в квази-стационарный режим, наблюдается явно выраженная и детерминированная взаимосвязь между упомянутыми характеристиками (Рисунок 58 б).

Для идентификации параметров модели была проведена серия опытов *in vitro*. При облучении взвеси бактерий *F. tularensis* 15 каждый из параметров варьировали в широких пределах (а именно:  $P_o \in [0.2; 1]$  мВт,  $C \in [0.0005; 0.05]$  %, время облучения менялось от 3 до 210 мин). С использованием методов регрессионного анализа и методов нелинейной оптимизации были определены первые 5 коэффициентов  $\{\xi_n\}$  в представлении (22). Ошибка интерпретации данных при этом не превышала 20% (Таблица 11).

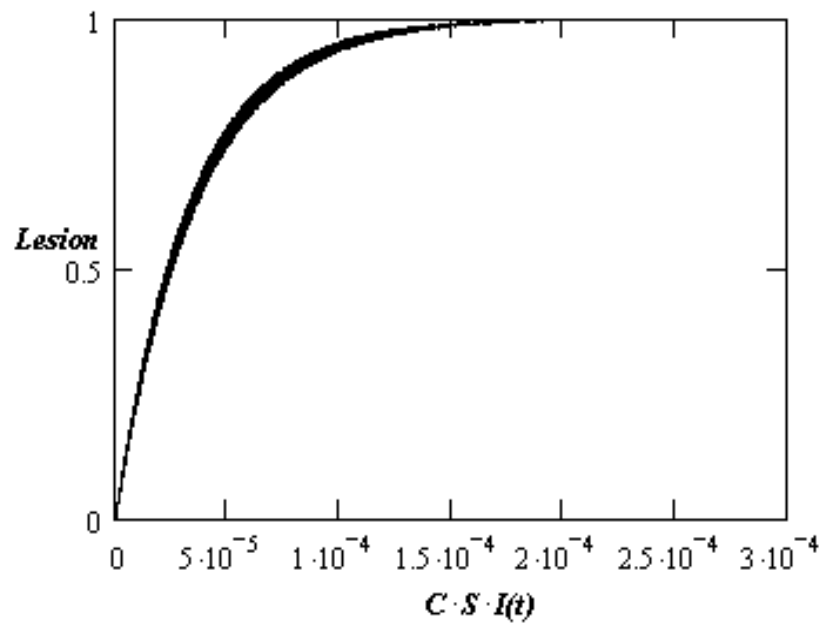
Как показали результаты компьютерного моделирования, инактивация практически всех клеток (более 99 %) *F. tularensis* 15 происходила после 5 мин облучения при  $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup> в присутствии МС малой концентрации,  $C = 0,005$  %.

Теоретические результаты хорошо соответствовали данным компьютерного эксперимента. Для подтверждения функциональности математической модели необходимо было проведение эксперимента *in vitro* с бактериями *F. tularensis* 15.

Действительно, анализ действия красного светодиодного излучения на взвесь клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 выявил снижение числа КОЕ под действием ФДВ ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>) с 0,005 % МС (Рисунок 59). Рост клеток подавляло облучение в течение 15 мин –  $86 \pm 4$  %; 40 мин –  $64 \pm 2$  %; 240 мин –  $8 \pm 0,1$  % и далее вплоть до полного отсутствия роста бактерий через 6 ч облучения (Рисунок 60).



а



б

Рисунок 58 – Динамика инактивации клеток *F. tularensis* 15 под ФДВ,  $P = 0,2$  мВт;  $C = 0,005$  %: а - в первые 5 с; б - после 80 с облучения ( $P(t) = S \cdot I(t)$  – мгновенная мощность излучения;  $S$  – площадь облучаемой взвеси)

Таблица 11 – Идентификация параметров взаимодействия бактерий *F. tularensis* 15 с красным светодиодным излучением (нелинейная модель)

Штамм бактерий	Тип облучения	Коэффициенты, определяющие нелинейную модель				
		$\xi_0 = 0$	$\xi_1 = 340$	$\xi_2 = 15$	$\xi_3 = -2.5$	$\xi_4 = 5$
<i>F. tularensis</i> 15	Световые диоды	$\xi_0 = 0$	$\xi_1 = 340$	$\xi_2 = 15$	$\xi_3 = -2.5$	$\xi_4 = 5$

Для определения жизнеспособности бактерий *F. tularensis* 15 после ФДВ, взвесь клеток высевали на плотную питательную среду FT-агара и культивировали в течение 10 суток при температуре 37 °С. Клетки вакцинного штамма *F. tularensis* 15, утратившие способность к размножению после 6 ч ФДВ, были несколько увеличены в размерах по сравнению с интактными бактериями (Таблица 12).

Отношение их к окраске по Граму не изменилось. Так же как и интактные бактерии, они плохо воспринимали краситель и были окрашены в бледно розовый цвет.

Для выявления специфического О-антигена у бактерий *F. tularensis* 15 до и после фотодинамического воздействия ставили РА с туляремийной агглютинирующей сывороткой согласно инструкции (Инструкция по применению ... Иркутск, 2006). В пробирках, содержащих интактную взвесь бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15, отмечали агглютинат, выстилающий дно пробирок в виде «зонтика», до разведения сыворотки 1:3200, надосадочная жидкость была прозрачной – реакция положительная на 4 +. В опытном ряду пробирок, содержащих взвесь после ФДВ регистрировали агглютинат до разведения сыворотки 1:1600 и опалесцирующую надосадочную жидкость – реакция положительная на 3 +. Таким образом РА в .

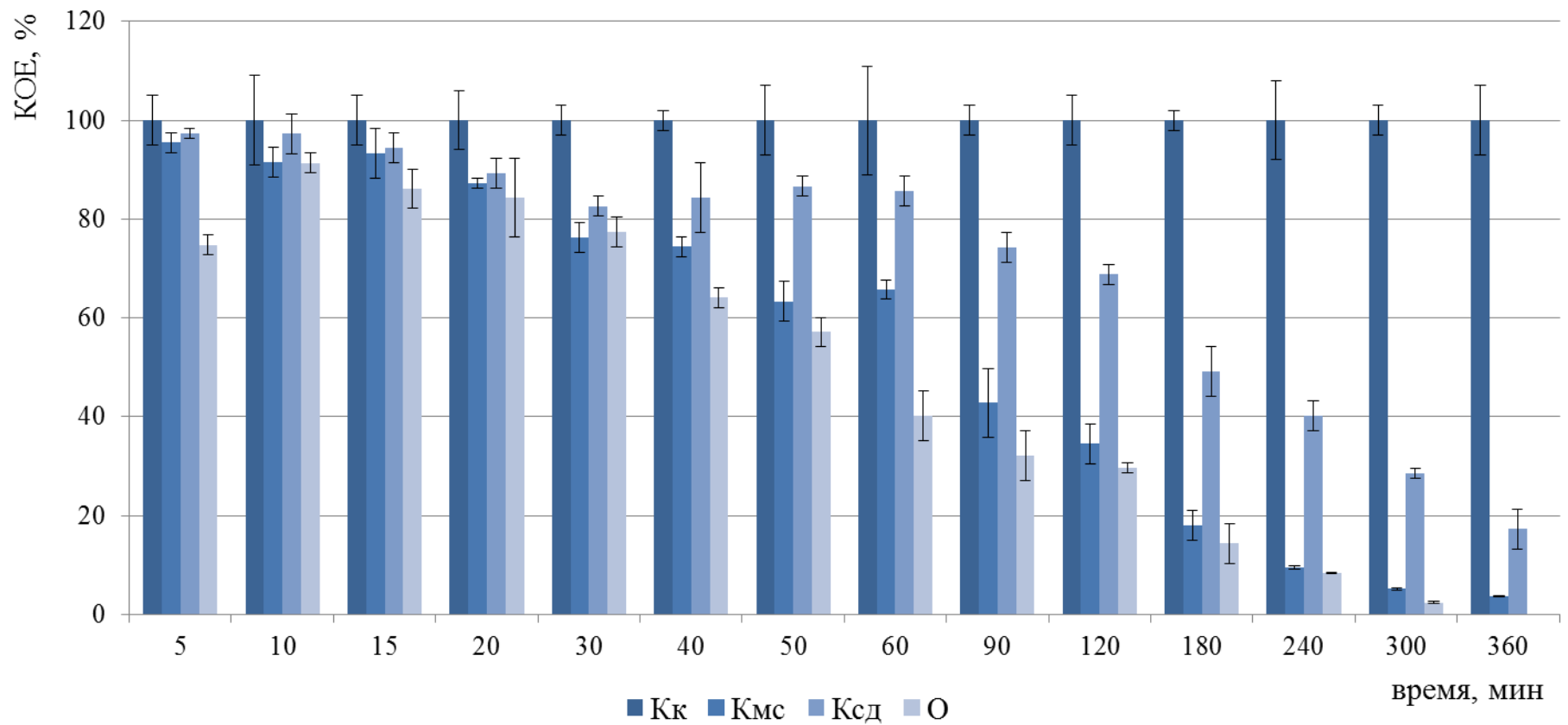


Рисунок 59 – Изменение числа КОЕ бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ после ФДВ ( $I = 1 \text{ мВт/см}^2$ ;  $MS = 0,005 \%$ ) в течение 5–360 мин; Кк – контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Ксд – контроль облучения световыми диодами

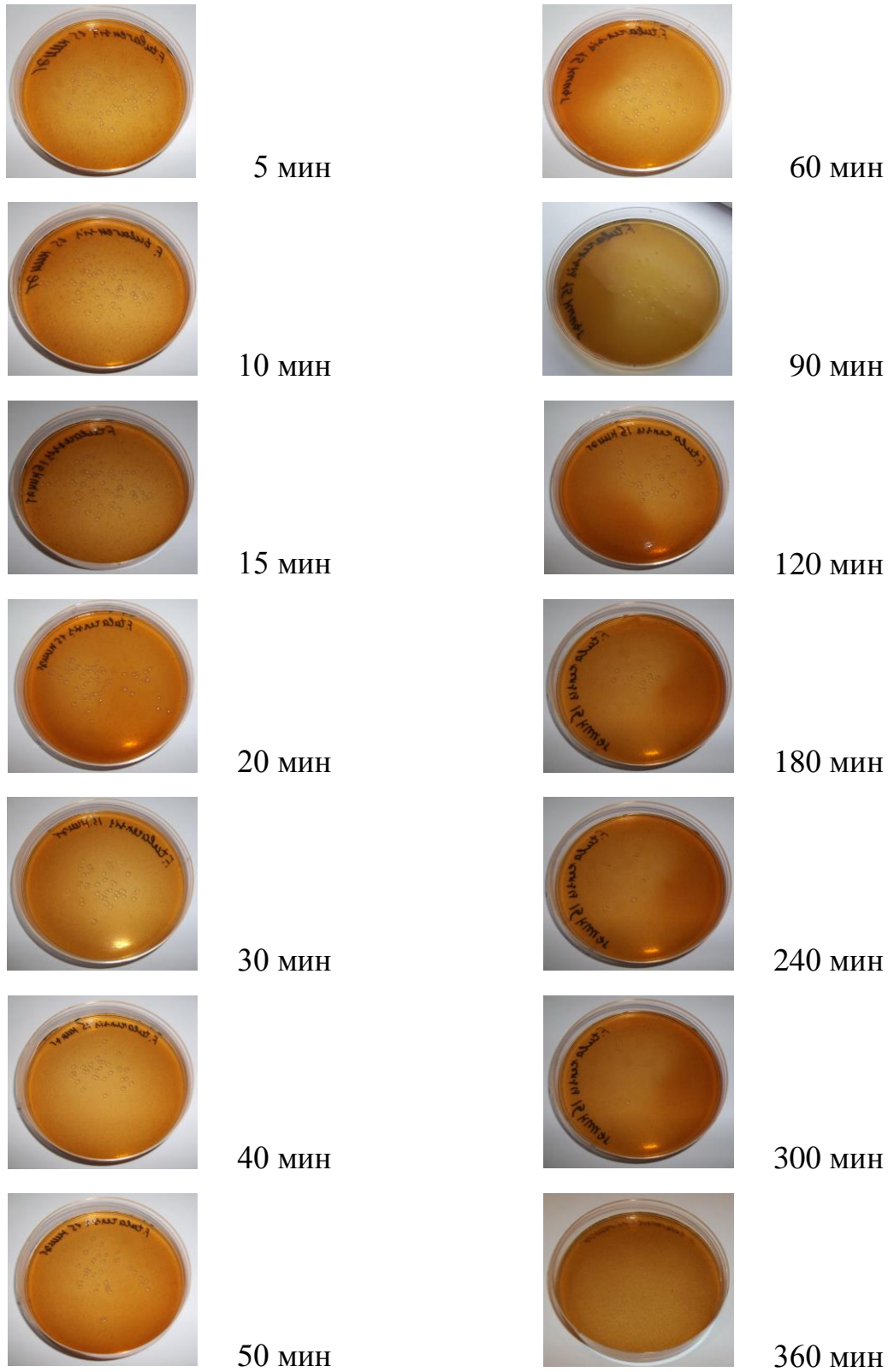


Рисунок 60 – Изменение числа КОЕ бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ после ФДВ:  $I=1\text{ мВт/см}^2$ ,  $MC=0,005\%$

Таблица 12 - Размеры клеток штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после ФДВ

Штамм бактерий	Размеры бактериальных клеток, мкм			
	до ФДВ		после ФДВ	
	длина	ширина	длина	ширина
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	0,61±0,06	0,51±0,01	0,75±0,02	0,68±0,01



контрольном и опытном рядах пробирок проходила до титра сыворотки, что свидетельствовало о сохранении О-антигена бактерий *F. tularensis* 15.

Для подтверждения сохранения активности диагностически значимых антигенов бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ также проводили постановку РНГА с указанной культурой, интактной и после инактивации, методом ФДВ в течение 6 ч. При учете результатов РНГА в лунках, содержащих как интактные, так и фотоинактивированные бактерии, отмечали положительную реакцию на  $4 + (7,5 \cdot 10^6 \text{ м.к./мл})$  (Рисунок 61). Изменений антигенной активности в реакции с контрольными и облученными бактериями не зафиксировано.

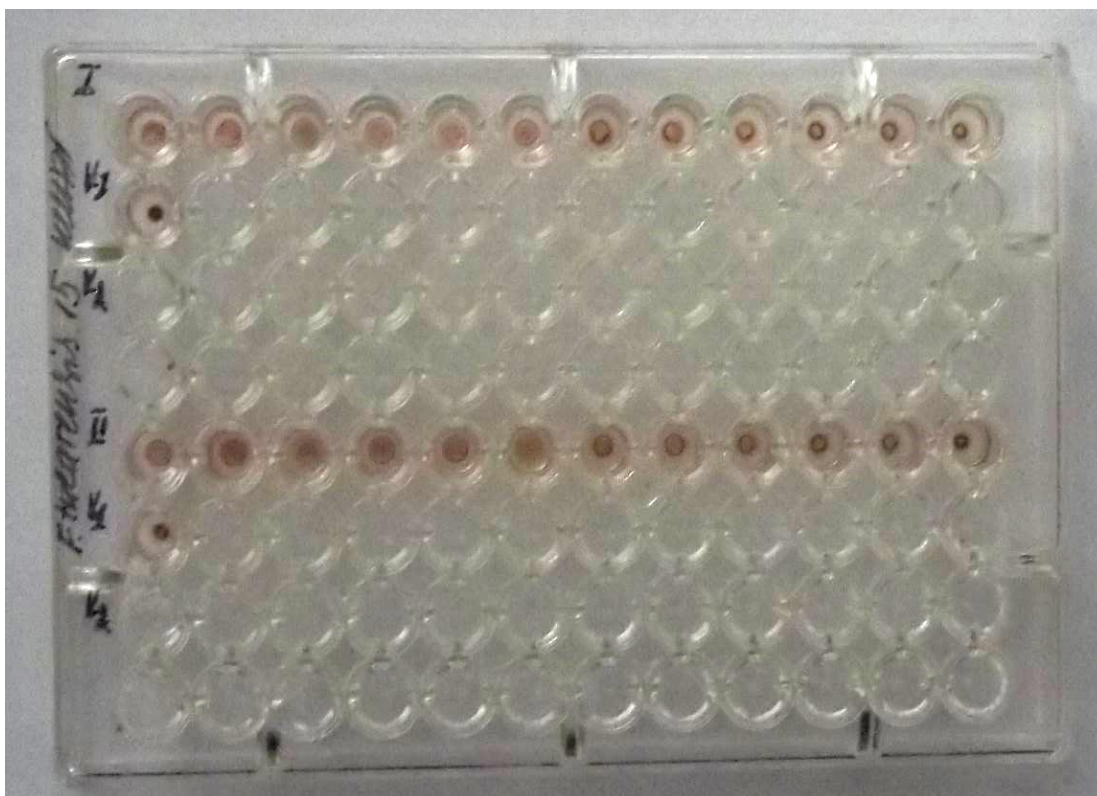


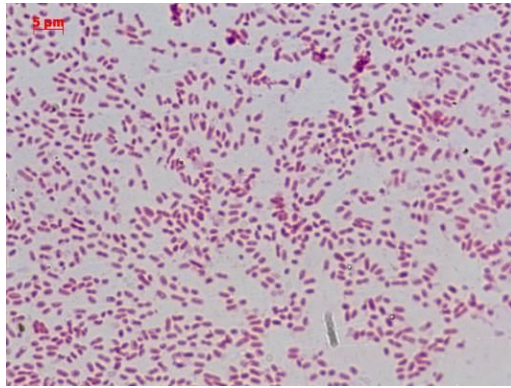
Рисунок 61 – Результаты РНГА с коммерческим иммуноглобулиновым туляреминым диагностикумом: I – интактная взвесь *F. tularensis* 15 НИИЭГ, II – взвесь *F. tularensis* 15 НИИЭГ после ФДВ в течение 6 ч

Полученный положительный результат РНГА с культурой бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15, обработанной методом ФДВ в течение 6 ч, свидетельствует о сохранении антигенной структуры.

Таким образом, культура вакцинного штамма *F. tularensis* 15 после инактивации методом ФДВ ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 0,005 %) в течение 6 ч полностью утрачивает колониобразующую способность, сохраняя при этом комплекс специфических антигенов, определяемых коммерческими тест-системами.

#### **4.3. Характеристика культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств бактерий вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ после инактивации методом ФДВ**

Дальнейшие исследования по инактивации бактерий методом ФДВ проводили, используя клетки вакцинного штамма чумного микроба *Y. pestis* EV НИИЭГ. Эти бактерии представляли собой мелкие, прямые, с закругленными концами, неподвижные, грамотрицательные, биполярные палочки размерами 0,5x3 мкм (Рисунок 62 а). На НІВ агаре они формировали характерные колонии R-типа диаметром до 3 мм серовато-белого цвета, прозрачные с выпуклым центром (Рисунок 62 в). При микроскопии был виден мелкозернистый центр, плоские и волнистые края. Старые колонии становились грубыми, темными, менее прозрачными, с более плотным и бугристым центром, диаметр которого увеличивался, а периферическая кружевная зона уменьшалась. При температуре 37 °С вырастали маслянистые колонии, которые легко суспендировались. В бульоне бактерии *Y. pestis* EV образовывали осадок в виде комочка ваты, на поверхности - нежную пленку, столбик жидкости оставался прозрачным (Рисунок 62 б). Изучение биохимической активности показало, что используемый в экспериментах штамм обладал типичными свойствами: микробы штамма EV ферментировали с образованием кислоты без газа глюкозу, галактозу, арабинозу, ксилозу, маннит,



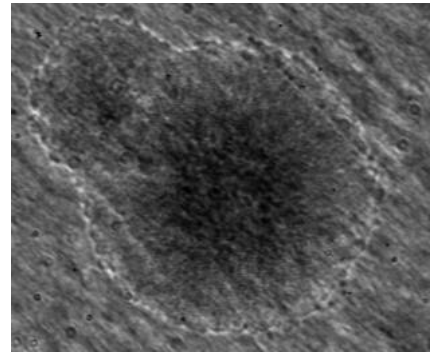
а



б



в



г

Рисунок 62 – Изучение типичных культурально-морфологических свойств штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ: а – морфология и размеры клеток (отрезок соответствует 5 нм), б – рост культуры в НІВ бульоне, в – рост культуры на НІВ агаре, г-микроскопия колоний

мальтозу и рамнозу; не ферментировали мочевины, сахарозу, лактозу. Эти бактерии обладали положительной пестин-фибринолизин-плазмокоагулазной активностью. Культура лизировалась чумным диагностическим фагом Л-413 С (Таблица 13).

В экспериментах по инаktivации клеток вакцинного штамма чумного микроба *Y. pestis* EV использовали бактериальные взвеси концентрацией  $10^9$  м.к./мл приготовленные по отраслевому стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-85П) 10 МЕ соответствующего года выпуска. На бактерии воздействовали красным светодиодным излучением ( $\lambda_0 = 650$  нм,  $\lambda_{\Delta} = 10$  нм), плотность мощности составляла 1, 3 и 5 мВт/см<sup>2</sup>. При проведении ФДВ в бактериальную взвесь добавляли МС в концентрациях 0,0005; 0,005 и 0,05 %. Инаktivацию взвесей проводили в течение 5 - 360 мин. Параллельно с опытными исследованиями проводили контроль культуры и независимое воздействие на бактерии фотосенсибилизатора и светодиодного излучения. Полученные результаты экспериментов представлены на рисунках 63-65.

Анализ проведенных исследований показал, что число КОЕ *Y. pestis* EV после ФДВ менялось (как и в предыдущих экспериментах с бактериями вакцинных штаммов *B. abortus* 19 и *F. tularensis* 15) в зависимости от плотности мощности излучения, количества фотосенсибилизатора и времени воздействия светодиодного излучения. Снижение количества КОЕ *Y. pestis* EV до  $62 \pm 6$  % отмечали после ФДВ с плотностью мощности излучения  $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup> и содержании МС = 0,0005 %. Однако эти значения превышали число КОЕ в контроле, когда на культуру влиял только фотосенсибилизатор (КОЕ =  $29 \pm 2$  %). При увеличении концентрации МС до 0,005 %, регистрировали достоверное снижение количества КОЕ до  $14 \pm 2$  % после 40 мин ФДВ и до  $9 \pm 0,4$  % после 50 мин ФДВ. Дальнейшее повышение концентрации МС = 0,05 % оказывало стимуляцию роста культуры *Y. pestis* EV (КОЕ =  $29 \pm 6$  %) после 30 мин ФДВ.

Таблица 13 – Изучение биохимических свойств бактерий вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ до ФДВ

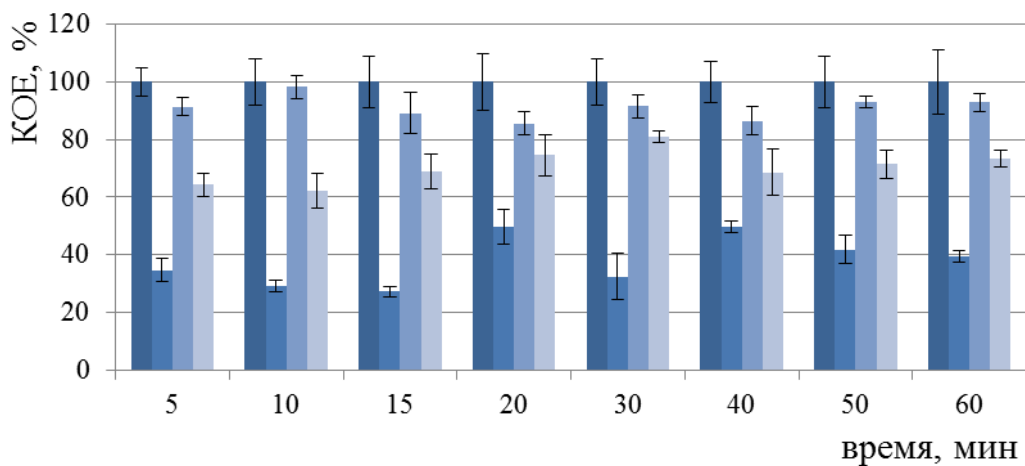
Штамм бактерий	глюкоза	мальтоза	галактоза	арабиноза	рамноза	мочевина	ксилоза	маннит	сахароза	лактоза	Фибринолитическая активность	плазмокоагулазная активность	Чувствительность к фагу Л-413 с
<i>Y. pestis</i> EV	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+

В случае проведения ФДВ с плотностью мощности 3 мВт/см<sup>2</sup> и концентрациями фотосенсибилизатора 0,0005; 0,005 или 0,05 % было зарегистрировано достоверное снижение числа КОЕ *Y. pestis* EV после 40 мин облучения до  $37 \pm 4$  %;  $16 \pm 0,4$  %;  $34 \pm 3,2$  %, соответственно содержанию МС.

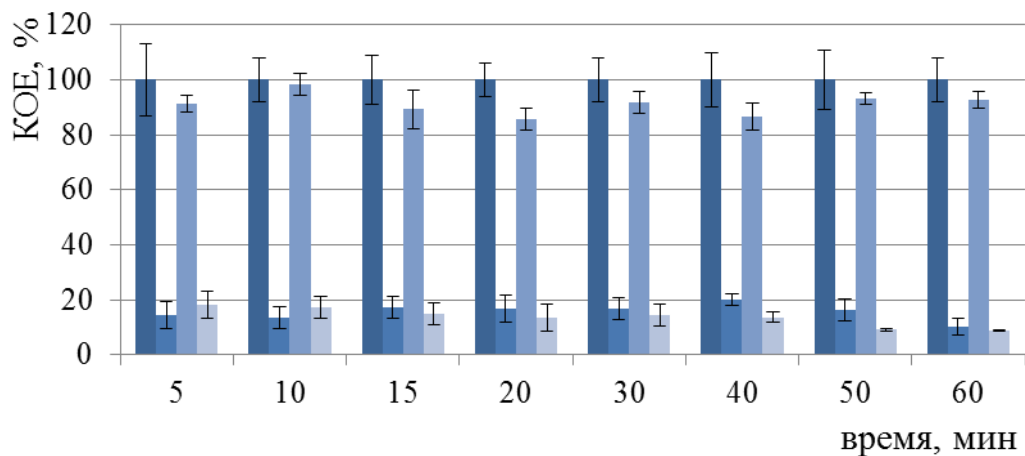
Следующую серию экспериментов проводили, воздействуя на бактерии указанного вакцинного штамма излучением, плотность мощности которого составляла 5 мВт/см<sup>2</sup>. После 40 мин ФДВ число КОЕ снижалось до  $39 \pm 2$  % (МС = 0,0005 %) и до  $17 \pm 0,7$  % (МС = 0,005 %). При добавлении к взвеси *Y. pestis* EV фотосенсибилизатора в концентрации 0,05 % после 20 мин воздействия отмечали увеличение КОЕ =  $125 \pm 16$  %, а после 60 мин – снижение КОЕ =  $11 \pm 0,3$  %.

Результаты проведенных экспериментов *in vitro* по изучению ФДВ на клетки вакцинного штамма *Y. pestis* EV были использованы для проведения математического моделирования с целью выявления оптимальной комбинации параметров облучения и получения полностью инактивированных бактерий. В процессе моделирования было оценено влияние длительности облучения на КОЕ бактерий в зависимости от его мощности; концентрации фотосенсибилизатора и дозы воздействия, а также светоиндуцированных эффектов (образование спеклов и их взаимодействие с бактериальной клеткой) от концентрации фотосенсибилизатора метиленового синего.

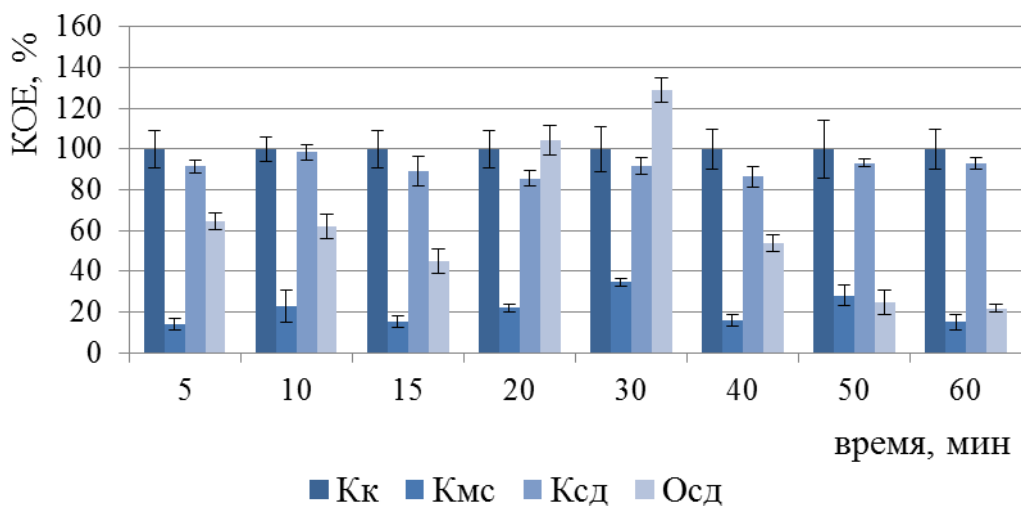
Вариация количества КОЕ (grow), зависящая от длительности облучения наблюдалась в опытных и контрольных исследованиях. Как видно из рисунка 6б, зависимость параметра grow от длительности облучения носит немонотонный характер для всех значений концентрации фотосенсибилизатора и для всех значений мощности излучения P, которые использовались в экспериментах.



а

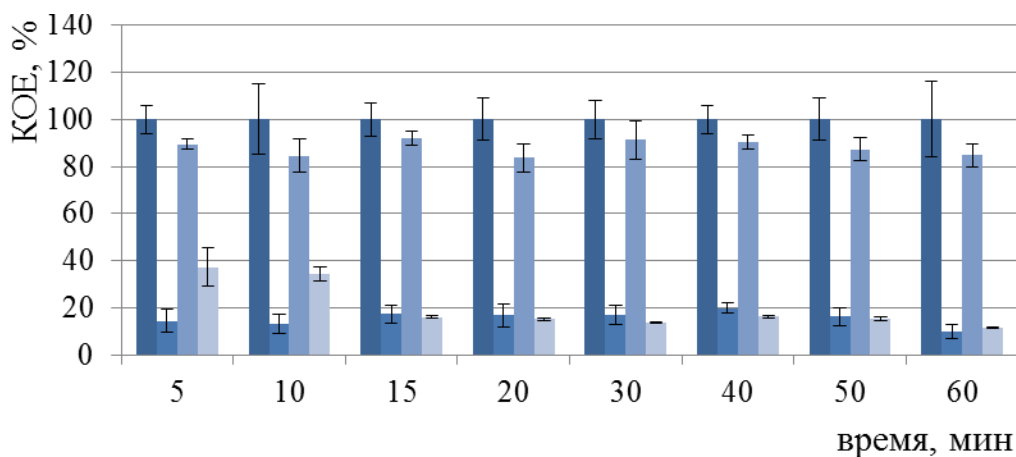


б

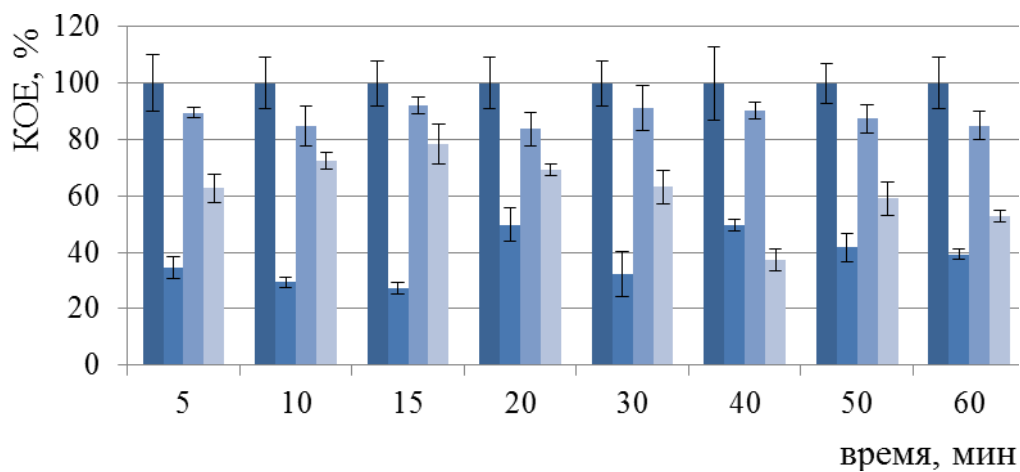


в

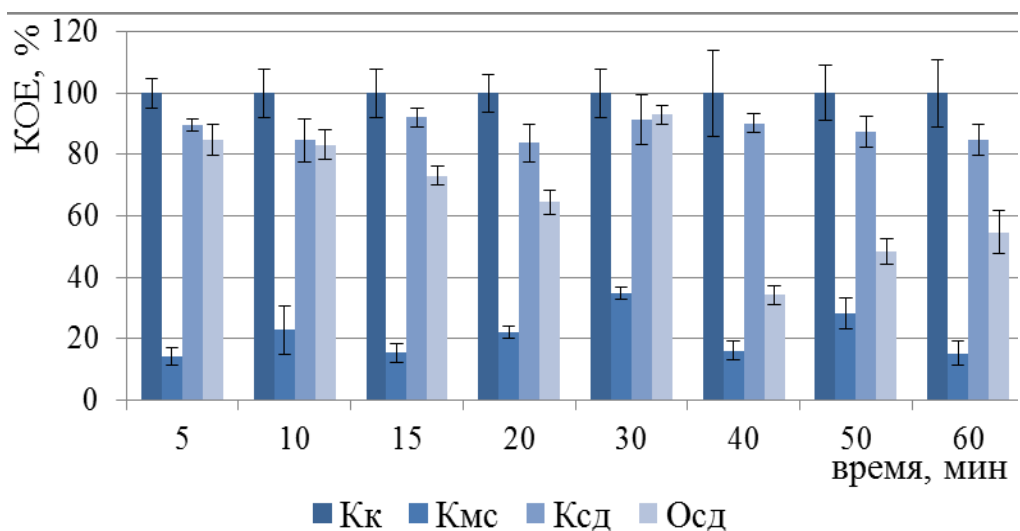
Рисунок 63 – Изменение числа КОЕ бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ (Осд) после ФДВ (1 мВт/см<sup>2</sup>): экспозиции с МС в концентрациях 0,0005 % (а); 0,005 % (б); 0,05 % (в) в течение 5–60 мин; Кк – контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Ксд – контроль облучения световыми диодами



а



б



в

Рисунок 64 – Изменение числа КОЕ бактерий *Y. pestis* EV 15 НИИЭГ (Осд) после ФДВ (3 мВт/см<sup>2</sup>): экспозиции с МС в концентрациях 0,0005 % (а); 0,005 % (б); 0,05 % (в) в течение 5–60 мин: Кк – контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Ксд – контроль облучения световыми диодами



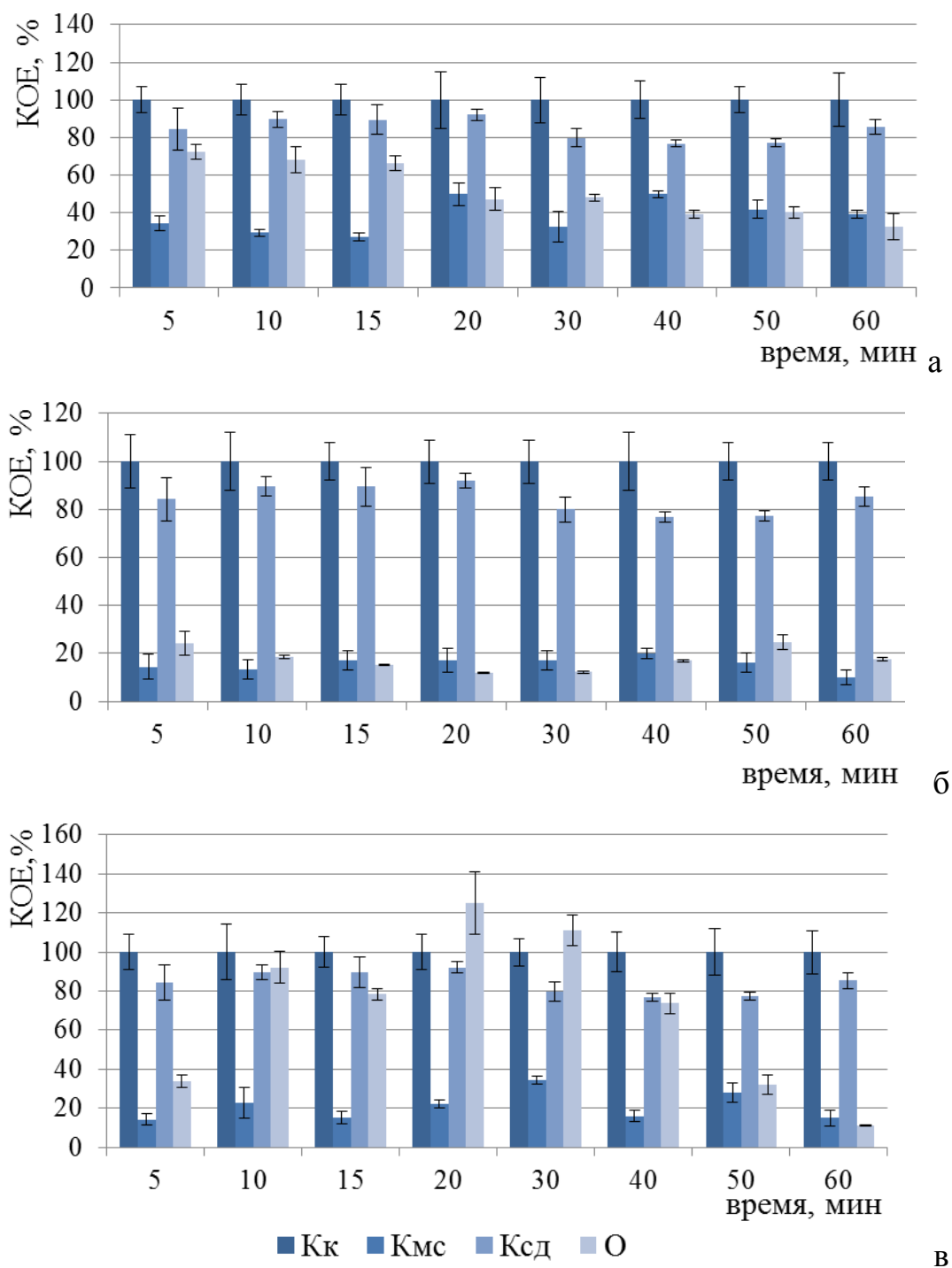


Рисунок 65 – Изменение числа КОЕ бактерий *Y. pestis* EV 15 НИИЭГ (Осд) после ФДВ ( $5 \text{ мВт/см}^2$ ): экспозиции с МС в концентрациях 0,0005 % (а); 0,005 % (б); 0,05 % (в) в течение 5–60 мин; Кк – контроль культуры; Кмс – контроль культуры с МС; Ксд – контроль облучения световыми диодами

Эффекты, вызываемые ФДВ в бактериальных взвесах *Y. pestis* EV при различных дозах облучения ( $J$ ) и концентрациях метиленового синего представлены на рисунке 67. Доза облучения  $J$  вычислялась в соответствии со следующей формулой:

$$J = P \cdot t, \quad (24)$$

где  $P$ , – мощность излучения,  $t$  – длительность облучения.

Чрезвычайно важно отметить, что как активация, так и ингибирование роста клеток зависит не только от дозы облучения, но и от режима облучения.

При определении зависимости величины свето-индуцированных эффектов в бактериальных взвесах от концентрации фотосенсибилизатора было совершенно очевидно, что концентрация синглетного кислорода, образующегося в бактериальной взвеси и взаимодействующего с клетками, зависит не только от интенсивности света, но и от концентрации фотосенсибилизатора.

Таким образом, произведение дозы и концентрации является важным параметром, определяющим процессы взаимодействия оптических спеклов с бактериальными взвесями. Зависимость роста клеток *Y. pestis* EV от произведения дозы облучения на концентрацию МС во время ФДВ характеризуется существенным разбросом полученных данных (Рисунок 68).

Как показали результаты экспериментальных исследований и компьютерного моделирования, для описания процессов ФДВ на бактерии вакцинного штамма *Y. pestis* EV предпочтительной является модель первого типа, которая была разработана ранее для случаев ФДВ на *E. coli* spp., *P. aeruginosa* spp. и *B.abortus* 19. Идентификацию параметров математической модели также проводили на основе

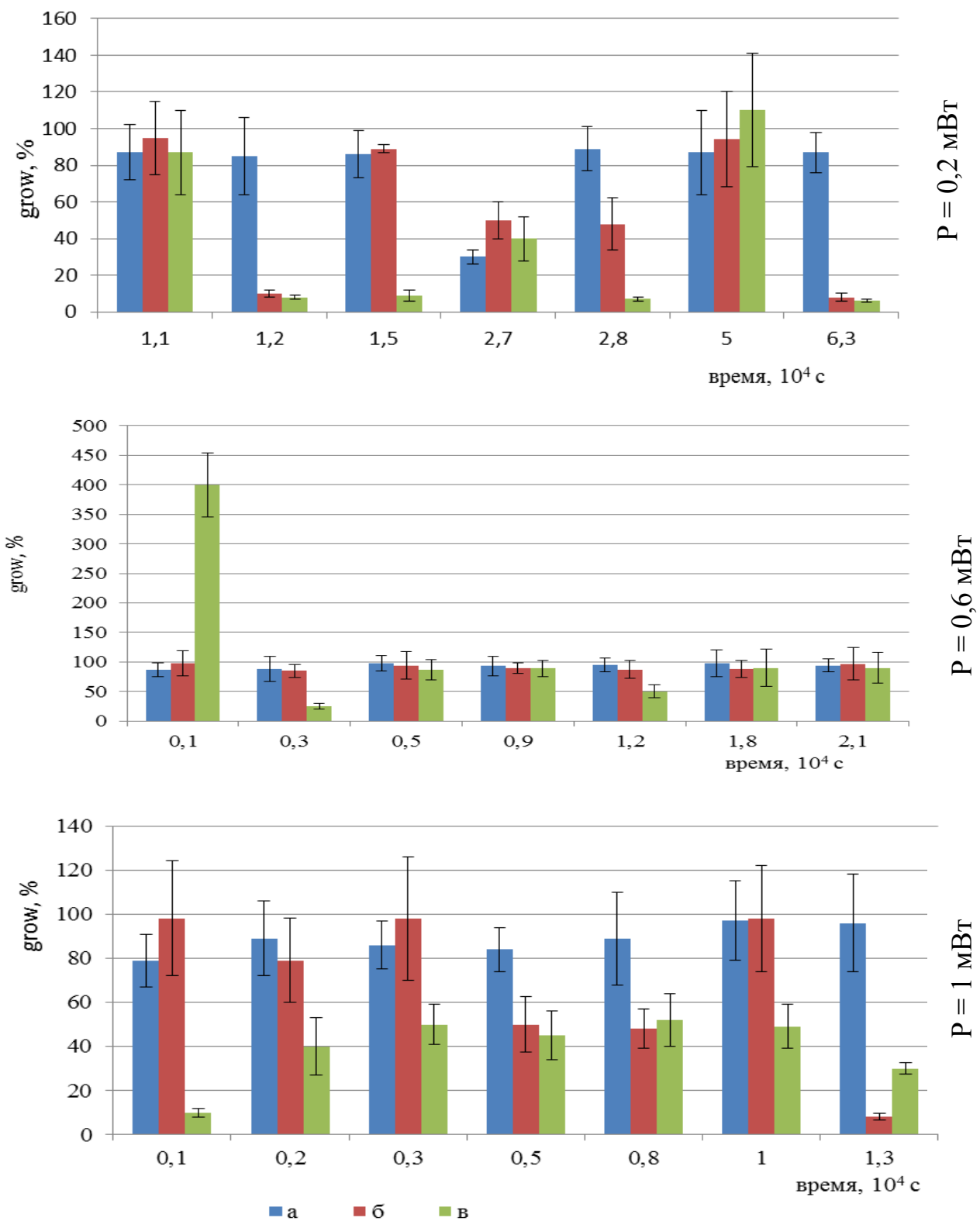


Рисунок 66 – Зависимость роста клеток *Y. pestis* EV (*grow*) от времени (*t*) облучения бактерий и концентрации МС = 0,05 % (а); 0,005 % (б); 0,0005 % (в);  $P = 0,2$  мВт

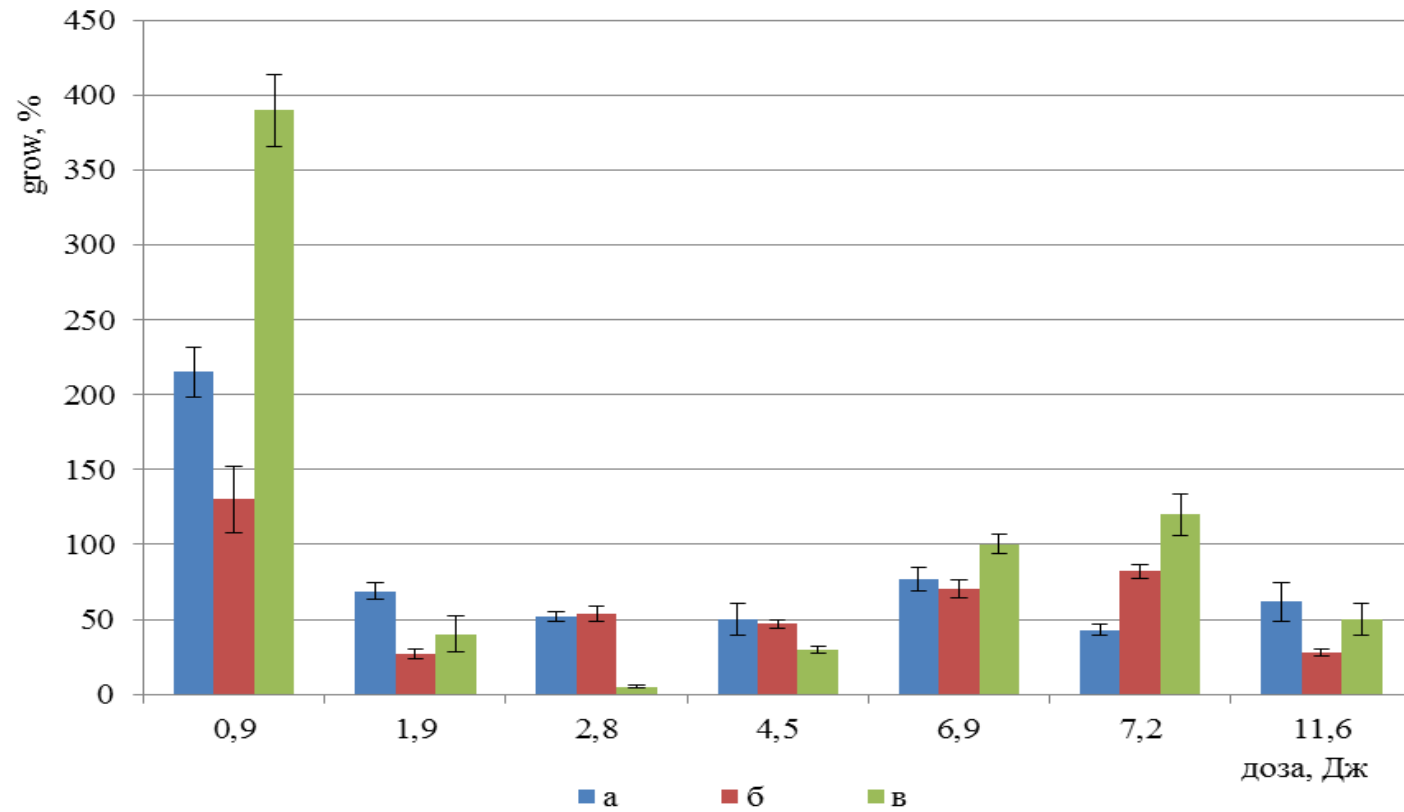


Рисунок 67 – Зависимость роста клеток *Y. pestis* EV (*grow*) от дозы облучения (*J*) бактерий и концентрации МС = 0,05 % (а); 0,005 % (б); 0,0005 % (в)

экспериментальных результатов *in vitro*. При проведении ФДВ на взвеси бактерий вакцинного штамма *Y. pestis* EV параметры варьировали в широких пределах ( $I_0 \in [1;5]$  мВт/см<sup>2</sup>,  $C \in [0,0005;0,05]$ %, время облучения меняли от 5 до 360 мин.

В таблице 14 представлены полученные коэффициенты, определяющие нелинейную модель взаимодействия клеток *Y. pestis* EV и светодиодного излучения. Согласно результатам компьютерного моделирования ФДВ на взвесь бактерий вакцинного штамма *Y. pestis* EV, инактивация более 99 % клеток происходит после 11 мин облучения ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>) в комбинации с 0,005 % МС.

После компьютерного моделирования была проведена *in vitro* экспериментальная верификация полученной модели. Проводили ФДВ на бактерии *Y. pestis* EV в условиях  $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>; МС = 0,005 % (Рисунки 69, 70).

Снижение количества КОЕ *Y. pestis* EV при ФДВ регистрировалось уже через 5 мин облучения ( $18 \pm 5$  %). Однако эти значения соответствовали числу КОЕ =  $14 \pm 5$  % *Y. pestis* EV, регистрируемых при действии на бактерии фотосенсибилизатора (контроль с МС). Достоверное снижение числа КОЕ клеток вакцинного штамма чумного микроба EV было отмечено с 50 по 360 мин ФДВ. Количество жизнеспособных клеток указанного штамма после ФДВ уменьшилось с КОЕ =  $9 \pm 0,6$  % (через 50 мин) до КОЕ =  $7 \pm 0,2$  % (через 360 мин).

Как показали результаты проведенных исследований, биохимическая активность бактерий вакцинного штамма EV после ФДВ ( $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>, МС = 0,005 %;  $t = 360$  мин) сохранялась. Каких-либо отличий по сравнению с интактной культурой не наблюдалось.

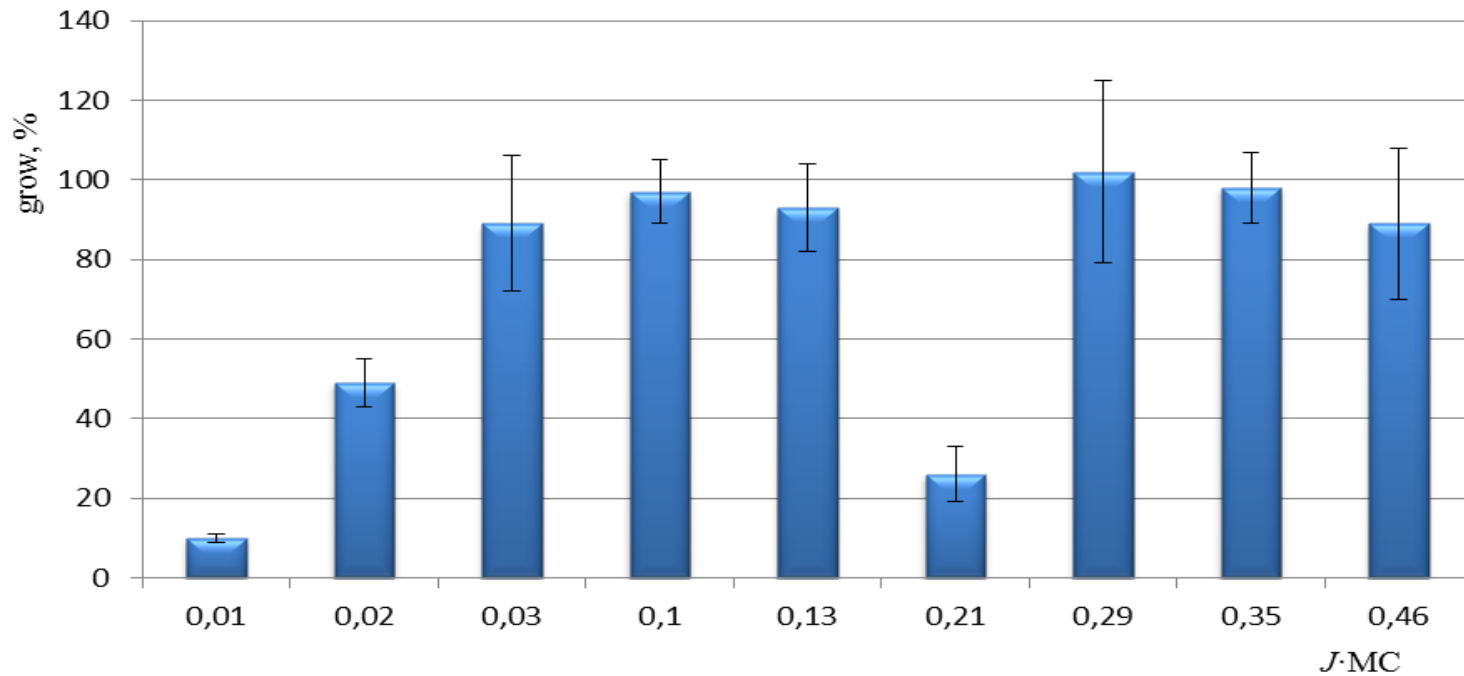


Рисунок 68 – Зависимость роста клеток *Y. pestis* EV (*grow*) от произведения дозы облучения (*J*) бактерий и концентрации MC = 0,05 %

Таблица 14 - Идентификация параметров математической модели взаимодействия клеток *Y. pestis* EV и светодиодного излучения

Штамм бактерий	Тип облучения	Коэффициенты, определяющие нелинейную модель				
		$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\alpha_4$	$\alpha_5$
<i>Y. pestis</i> EV ИИЭГ	Световыми диодами	$\alpha_1 = 0.17$	$\alpha_2 = 0.213$	$\alpha_3 = 169.4$	$\alpha_4 = 37.3$	$\alpha_5 = 0.72$

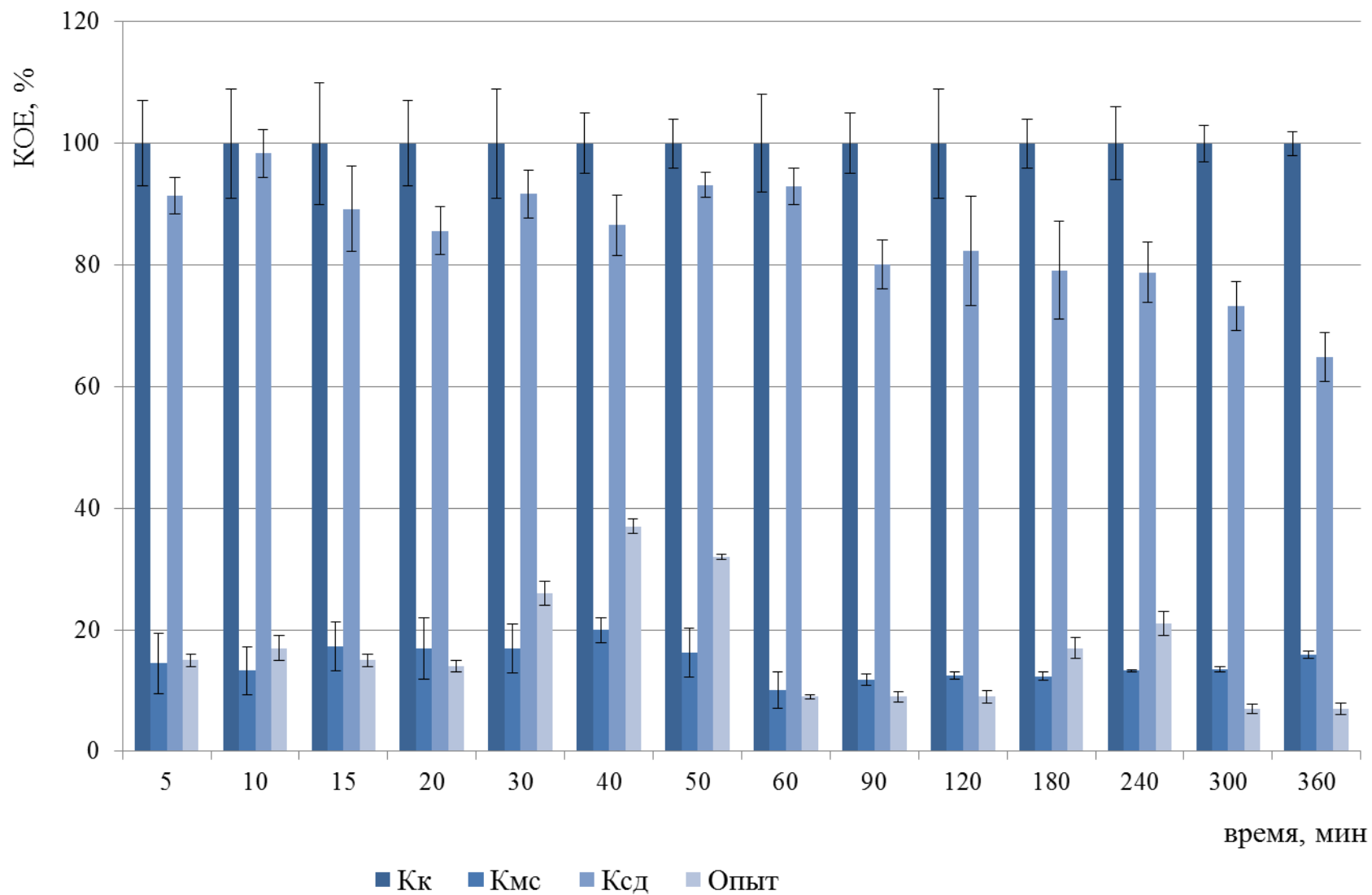


Рисунок 69 – Изменение числа КОЕ *Y. pestis* EV НИИЭГ после ФДВ:  $I = 1 \text{ мВт/см}^2$ ;  $MS = 0,005 \%$

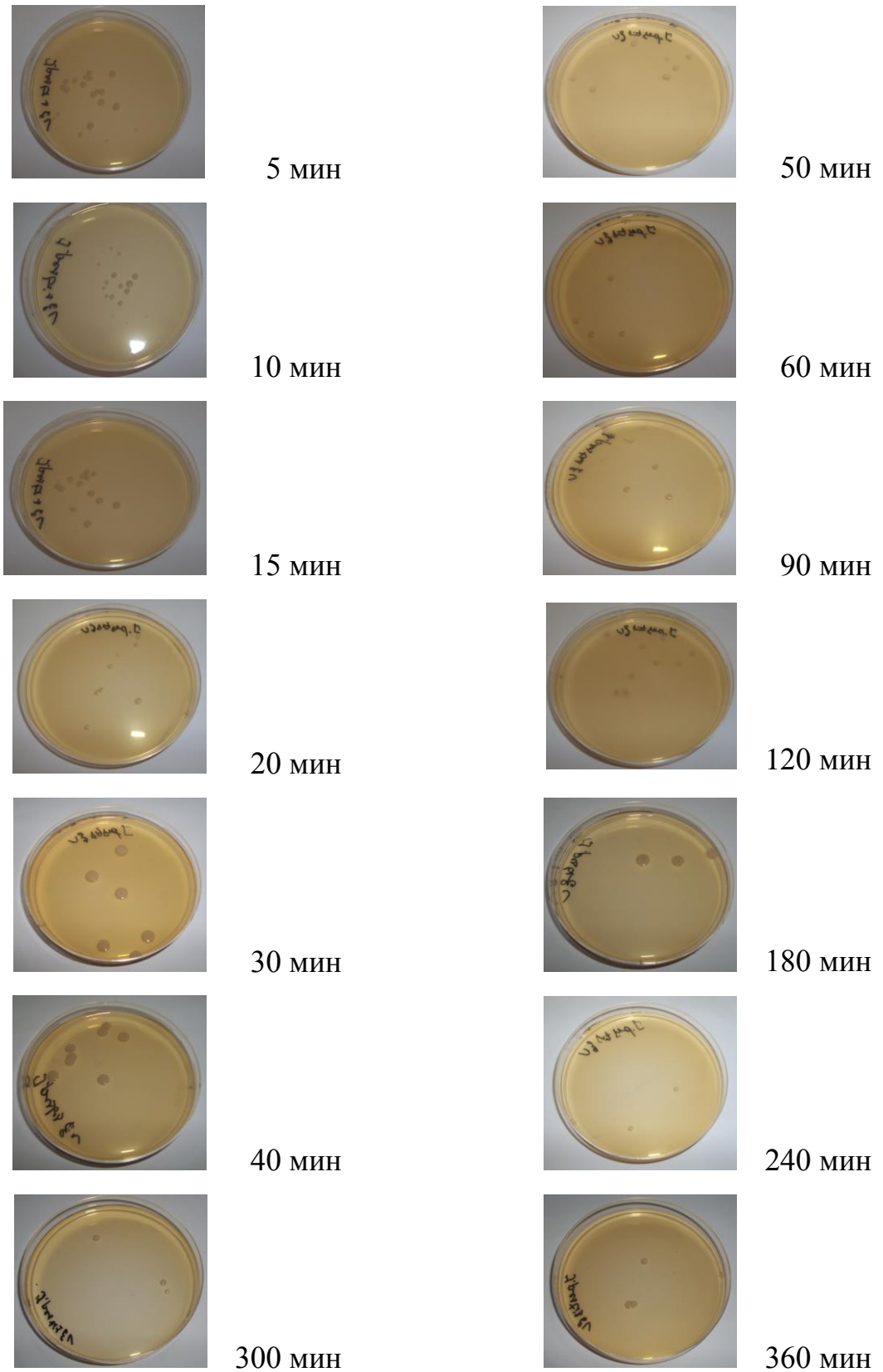


Рисунок 70 – Изменение числа КОЕ бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ после ФДВ:  
 $I = 1 \text{ мВт/см}^2$ ,  $MC = 0,005 \%$



Как известно, основным фактором патогенности и иммуногенности чумного микроба является компонент поверхностной структуры, а именно, капсульный антиген чумного микроба (фракция I или F1), который впервые был охарактеризован Baker и сотр. в 1953 г. Этот антиген образует на внешней мембране бактерий гранулярный слой, который постепенно диффундирует в окружающую среду. Обнаружить F1 – этот видоспецифический антиген, продукция которого происходит только при температуре 37 °С, можно в двухкомпонентной реакции не прямой гемагглютинации (РНГА) с иммуноглобулиновым эритроцитарным диагностикумом. Для этого при постановке РНГА к последовательным десятикратным разведениям взвеси бактерий штамма EV до и после ФДВ прибавляли иммуноглобулиновый диагностикум, пластины встряхивали и оставляли при комнатной температуре на 24 ч. Титром считали последнее разведение материала, в котором наблюдали образование «зонтика» (4 +) (Руководство по профилактике чумы, 1992; Наумов, Ледванов, Дроздов, 1992; Домарадский, 1993; Книрель, Федерова, Анисимов, 2011; MacIntyre et al., 2004; Feodorova, Motin, 2011).

Положительная реакция в гемагглютинационном тесте по определению F1 в бактериальных взвесях вакцинного штамма *Y. pestis* EV до и после обработки методом ФДВ свидетельствовала о сохранении этого антигена в ходе фотоинактивации.

Таким образом, в данной главе проведена сравнительная характеристика вакцинных штаммов *B. abortus* 19 VA, *F. tularensis* 15 и *Y. pestis* EV до и после инактивации методом ФДВ. Показано щадящее ФДВ на бактерии указанных вакцинных штаммов, не нарушающее антигенную активность микроорганизмов полностью утративших колониобразующую способность. С помощью полученных экспериментальных данных *in vitro* и математического моделирования была проведена оптимизация основных параметров ФДВ на бактерии штаммов *B. abortus* 19 VA, *F. tularensis* 15 и *Y. pestis* EV, найдены коэффициенты, определяющие нелинейную модель первого и второго типов взаимодействия СД излучения с

бактериальными клетками. Это позволило найти режимы ФДВ, при которых были полностью инактивированы клетки вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА (после 3 ч воздействия) и *F. tularensis* 15 (после 6 ч воздействия).

## **ГЛАВА 5. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ *BRUCELLA ABORTUS* 19 ВА И *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ ДО И ПОСЛЕ ИНАКТИВАЦИИ МЕТОДОМ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА МОРСКИХ СВИНКАХ**

На следующем этапе исследований изучали безопасность вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полностью инаktivированных методом ФДВ. Проводили сравнительный анализ безопасности указанных штаммов бактерий до и после фотоинаktivации на морских свинках по показателям безвредности, остаточной вирулентности, реактогенности как регламентированными, так и когерентно-оптическими методами.

### **5.1. Определение безвредности, остаточной вирулентности и реактогенности вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА до и после инаktivации методом фотодинамического воздействия в экспериментах на морских свинках**

Для сравнительной оценки *безвредности* вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА контрольной группе морских свинок вводили интактную культуру. Опытной группе животных инокулировали бактерии указанного штамма после инаktivации методом ФДВ в течение 3 ч. К концу срока наблюдения (25 дней), как в опытной, так и в контрольной группах не зарегистрировано погибших животных.

Морских свинок после эвтаназии вскрывали общепринятым методом и проводили визуальную оценку состояния подкожножировой клетчатки и внутренних органов. У животных опытной и контрольной групп не наблюдали морфологических признаков местной воспалительной реакции: отсутствовали спайки передней брюшной стенки с кожей, кровоизлияния в подкожножировой клетчатке, гиперемия сосудов; паховые лимфатические узлы были обычных размеров, и не спаяны с

окружающей тканью; печень, селезенка не увеличены, умеренного кровенаполнения; легочная ткань упругая, розового цвета.

*Остаточную вирулентность* вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА до и после фотоинактивации определяли также на морских свинках контрольной и опытной групп. Животным обеих групп вводили культуру в дозах  $1 \cdot 10^3$ ;  $1 \cdot 10^4$  или  $2 \cdot 10^9$  м.к./мл: контрольной группе – интактную двухсуточную агаровую культуру *B. abortus* 19, а опытной – взвесь клеток после 3 ч инактивации методом ФДВ. В контрольной и опытной группах все морские свинки выжили, срок наблюдения 35 суток. По истечении этого срока проводили эвтаназию, вскрытие животных и оценку распространенности, приживаемости интактной и фотоинактивированной культур *B. abortus* 19 путем посева на эритрит агар лимфатических узлов (паховых, подчелюстных, заглочных, парааортальных), печени, селезенки и костного мозга. Посевы инкубировали в термостате при  $37^\circ\text{C}$  в течение 25 сут., просматривая их каждые 3-4 дня. Рост колоний отмечали в чашках с посевами паховых лимфатических узлов животных контрольной группы, которым вводили  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл культуры. В посевах органов и тканей морских свинок, которым инокулировали  $1 \cdot 10^4$  или  $2 \cdot 10^9$  м.к./мл интактной культуры, рост бактерий *B. abortus* 19 обнаруживался из всех лимфатических узлов и внутренних органов (Рисунок 71 а, б). В посевах из органов и тканей опытной группы животных рост культуры *B. abortus* 19 ВА на эритрит агаре отсутствовал (Рисунок 72 а, б).

*Реактогенность* вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА до и после ФДВ определяли на морских свинках из предыдущих опытов по оценке безвредности и остаточной вирулентности. Наблюдали реакцию животных на введение фотоинактивированной (опыт) или интактной (контроль) взвесей клеток *B. abortus* 19 ВА. Общая воспалительная реакция у особей обеих групп отсутствовала: сохранялись нормальная температура тела  $38 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ; аппетит и масса. Оценка местной воспалительной реакции осуществляли как при жизни животных, так и в

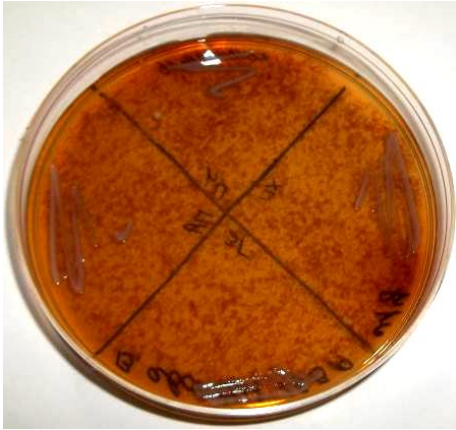


Рисунок 71 – Рост культуры *B. abortus* 19 ВА на эритрит агаре в посевах лимфатических узлов (а) и внутренних органов (б) контрольной группы морских свинок после введения  $2 \cdot 10^9$  м.к./мл интактных бактерий

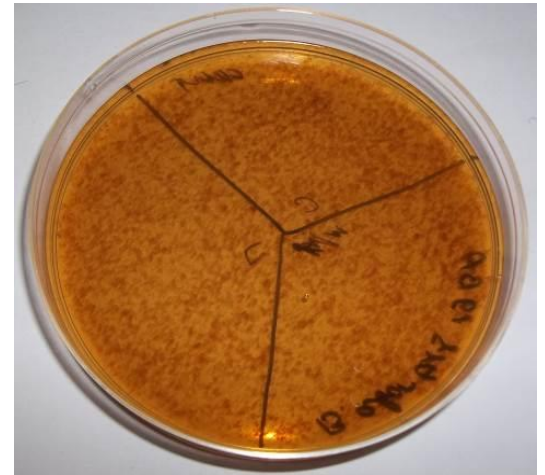
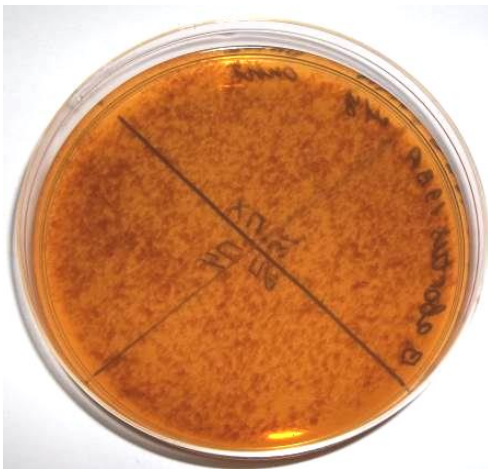


Рисунок 72 – Отсутствие роста культуры *B. abortus* 19 ВА на эритрит агаре в посевах лимфатических узлов (а) и внутренних органов (б) опытной группы морских свинок после введения  $2 \cdot 10^9$  м.к./мл фотоинактивированных в течение 3 ч бактерий

постмортальный период. При пальпации места введения не обнаружено отека, уплотнений лимфатических узлов и мягких тканей. При вскрытии морских свинок наблюдали паховые лимфатические узлы обычных размеров не спаянные с окружающей тканью.

Поскольку после введения морским свинкам клеток вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА, инаktivированных методом ФДВ в течение 3 ч у животных отсутствовали специфические поражения, характерные для бруцеллезной инфекции, можно сделать вывод о том, что упомянутая культура оказалась безопасной для лабораторных животных.

## **5.2. Определение безвредности, остаточной вирулентности и реактогенности вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после инаktivации методом фотодинамического воздействия в экспериментах на морских свинках**

Оценку *безвредности* вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проводили также в экспериментах на морских свинках. Контрольной группе животных вводили  $5 \cdot 10^9$  м.к./мл интактных бактерий, а опытной – микроорганизмы после инаktivации методом ФДВ в течение 6 ч. За период наблюдения (30 сут) не зарегистрировано погибших животных в контрольной и опытной группах; температура и масса тела морских свинок сохранялись на первоначальном уровне.

Сравнительное изучение морфологических показателей лабораторных животных обеих групп проводили в постмортальный период. Для этого, проведя эвтаназию, морских свинок вскрывали на 7, 21 и 30 сутки после введения бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15.

При вскрытии на 7 сутки у отдельных животных контрольной группы были зарегистрированы значительные морфологические изменения, вызванные введением интактной культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15. Наблюдали: образование инфильтратов до 1,0 см; гнойных очагов около 0,4 см в диаметре и кровоизлияний;

умеренное (в 1,5 раза) увеличение паховых лимфатических узлов, отек мягких тканей бедра и паховой области в месте инокуляции. Отмечали увеличение селезенки, ее умеренное полнокровие, а также образование единичных очень мелких очагов серовато-белого цвета. Печень у морских свинок в контрольной группе была увеличена незначительно, имела сероватый оттенок, выявлялось венозное полнокровие. На фоне серовато-синюшной ткани легких наблюдали миллиарные очаги уплотнения серовато-розового цвета.

У животных контрольной группы, которых вскрывали на 21 сутки, морфологические изменения были менее выраженными. В паховых и отдаленных лимфатических узлах наблюдали незначительные воспалительные изменения, которые проявлялись в виде отека мягких тканей и небольших инфильтратов. Селезенка и печень были без изменений.

На 30 день исследований у некоторых морских свинок контрольной группы на вскрытии были отмечены лишь небольшие рубцовые изменения мягких тканей.

В опытной группе морских свинок не зарегистрировано морфологических изменений подкожно жировой клетчатки, лимфатических узлов и внутренних органов, характерных для туляремийной инфекции после введения фотоинактивированной культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15.

Оценку *остаточной вирулентности* вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проводили по учету распространенности и приживаемости интактной и инактивированной культур на морских свинках из опыта по исследованию безвредности. Для этого постмортально исследовали по 3 морские свинки из опытной и контрольных групп на 7, 21 и 30 сутки. После вскрытия и визуальной оценки макроскопических морфологических изменений, проводили высевы регионарных, контрлатеральных, отдаленных лимфатических узлов, печени, селезенки, легких, сердца и костного мозга на Ft-агар. Чашки инкубировали при 37 °С в течение 7 суток, просматривая ежедневно.

Рост бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 наблюдали в отпечатках печени и селезенки морских свинок контрольной группы, вскрытых на 14 сутки после инокуляции (Рисунок 73 а). У этих же животных в отпечатках легких, крови и костного мозга роста туляремийных микробов не обнаружено (Рисунок 73 а). Как видно на рисунке 73 б рост культуры был зафиксирован в отпечатках паховых и регионарных лимфатических узлов от животных вскрытых даже на 30 сутки.

На чашках с аналогичными посевами органов и тканей животных опытной группы, которым вводили культуру вакцинного штамма *F. tularensis* 15 инактивированную методом ФДВ в течение 6 ч, рост отсутствовал (Рисунок 74 а, б).

*Реактогенность* культур вакцинного штамма *F. tularensis* 15 изучали на морских свинках из опытов по определению безвредности, проводя прижизненные наблюдения.

В контрольной группе животных у 7-ми из 30 особей зарегистрировали повышение температуры тела до 40,1 °С в течение первых семи суток наблюдения; у остальных 23 особей сохранялась нормальная температура, в среднем 38,3 °С. При пальпации места введения определяли уплотнение и увеличение лимфатических узлов, их спаянность с отечными мягкими тканями. Снижения массы тела морских свинок не зарегистрировано.

В опытной группе лабораторных животных средняя температура тела особей не превышала 38,5 °С, что соответствовало температуре тела здоровых животных. Масса морских свинок не изменялась, при пальпации мягких тканей не обнаружено очагов уплотнения. На основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что инактивированная культура *F. tularensis* 15 не вызывала местной и общей воспалительных реакций в организме морских свинок.



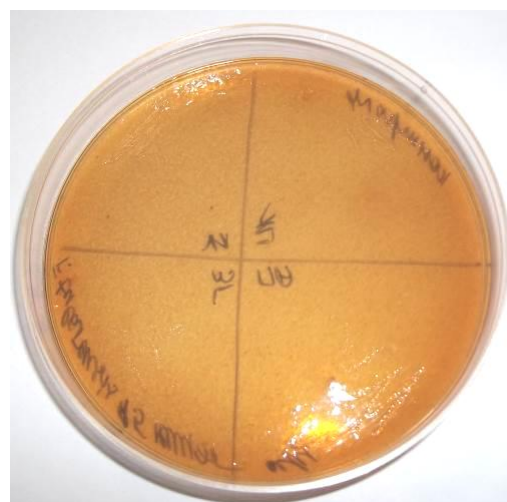


Рисунок 73 - Рост культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ на Ft-агаре в посевах внутренних органов (а) и лимфатических узлов (б) контрольной группы морских свинок после введения  $5 \cdot 10^9$  м.к./мл интактных бактерий



Рисунок 74 – Отсутствие роста культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ на Ft-агаре в посевах внутренних органов (а) и лимфатических узлов (б) опытной группы морских свинок после введения  $5 \cdot 10^9$  м.к./мл фотоинактивированных в течение 6 ч бактерий

Таким образом, клетки вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, инактивированные методом ФДВ в течение 6 ч, по отсутствию признаков остаточной вирулентности, реактогенности и безвредности могут считаться безопасными для морских свинок.

### **5.3. Определение реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 когерентно-оптическими методами в экспериментах на морских свинках**

Далее были проведены инструментальные исследования реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, до и после инактивации методом ФДВ. В *in vivo* экспериментах на морских свинках определяли реактогенность упомянутых штаммов на организменном и тканевом уровнях когерентно-оптическими методами. Для этого проводили оценку микроциркуляции крови церебральных (методом спекл-имиджинга) и брыжеечных (методом спекл-микроскопии) сосудов. Важно подчеркнуть, что в установках для проведения спекл-имиджинга и спекл-микроскопии использовали лазер в качестве источника освещения, а не белый свет. Поэтому, так как в данной диссертационной работе источники когерентного излучения были использованы для инактивации бактерий, мы сочли необходимым проведение исследований по выявлению условий, при которых методы спекл-имиджинга (*LASCA*) и спекл-микроскопии являлись бы полностью неинвазивными.

#### **5.3.1. Разработка научно-методических основ применения биосистем тканевого и организменного уровней для оценки реактогенности**

В данной диссертационной работе предложен компьютеризированный диагностический комплекс, в который входили двухуровневая биосистема и физический датчик. Биосистема состояла из бактериальных клеток,

воздействовавших на лабораторное животное и собственно лабораторного животного (морская свинка), выступавшего в качестве сенсорного звена. В качестве физического датчика выступали лазерные измерительные системы, которые объективно регистрировали количественные изменения, происходящие в биосенсорном звене. Создание данного комплекса было предназначено для оценки реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ на тканевом и организменном уровнях.

Общеизвестно (Владимиров, 1999), что лазерное излучение может само оказывать влияние на живые организмы, поэтому лазерный датчик, предназначенный только для регистрации изменений в биосенсорном звене, сам может оказывать возмущающее воздействие на это звено (морскую свинку). В связи с этим, при разработке научно-методических основ лазерных диагностических биосистем, особо актуальным и чрезвычайно важным являлось определение условий минимально неинвазивного уровня воздействия лазерного излучения на биосенсорное звено.

*Определение минимально неинвазивного уровня воздействия лазерного излучения на лабораторных животных.* Прежде, чем исследовать влияние бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ на микроциркуляцию крови морских свинок, проводили чрескожное облучение сосудов интактных животных для определения воздействия на них лазерного излучения. Перед экспериментом с поверхности кожи животных удаляли волосяной покров. Для облучения использовали He-Ne лазер ЛГН-207 ( $\lambda=633$  нм,  $P=3$  мВт); одномодовые VCSEL лазеры ( $\lambda=850$  нм, с регулируемой мощностью до 1,5 мВт) и полупроводниковые лазеры КЛМ-650, КЛМ-980 ( $\lambda=650$  нм,  $\lambda=980$  нм,  $P=5$  мВт). Мощность излучения в установке по облучению животных регулировали дискретно и определяли числом лазеров, включенных для облучения.

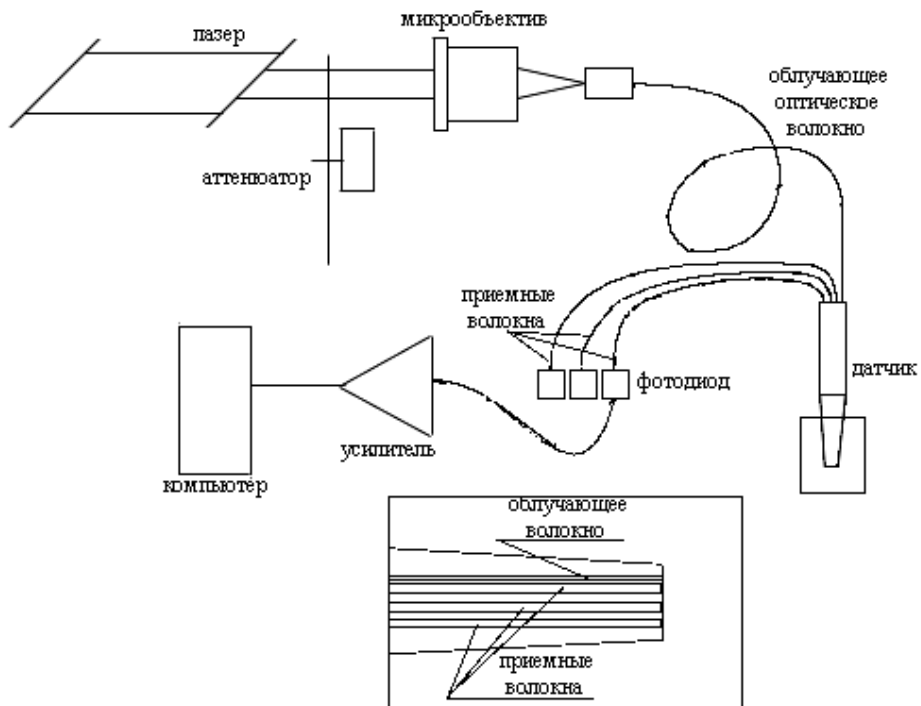
Для изучения параметров микроциркуляции крови в тканях кожи лабораторных животных *in vivo* использовали оригинальную установку, в состав которой входили

лазер, оптические детекторы, фотоприемник и компьютерный анализатор спектра (Рисунок 75 а, б).

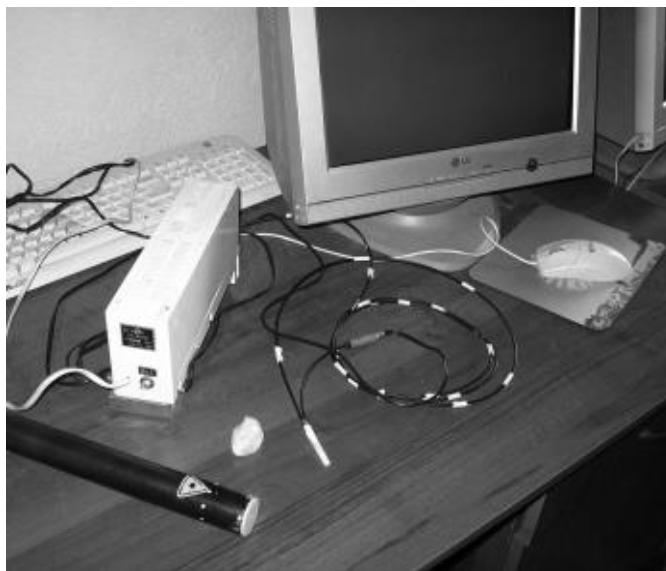
В качестве источника излучения использовали полупроводниковый лазер мощностью излучения 6 мВт, длина волны излучения 850 нм. Для облучения применяли оптическое волокно диаметром 100 мкм, а в качестве приемных – 3 оптических волокна диаметром 400 мкм каждое. Как видно из рисунка 75, датчик представляет собой четыре скомпонованных между собой волокна, одно из которых (крайнее справа) облучающее, а три остальные, расположенные на расстоянии 1,5 мм друг от друга, — приемные. Такое расположение волокон позволяет зондировать ткань на разных глубинах. Мощность лазерного излучения на выходе облучающего волокна составляла в среднем 3,5 мВт. Изменение мощности объясняется различными условиями фокусировки лазерного пучка на входной торце облучающего волокна.

Для регистрации рассеянного излучения использовали фотоприемник ФД 263 (диапазон спектральной чувствительности 0,4–1,1 мкм); линейный усилитель электрического сигнала на частотах от 10 до 10000 Гц; аналого-цифровой преобразователь (АЦП) в виде звуковой платы персонального компьютера. Программа для получения спектрального момента доплеровского спектра была разработана совместно с сотрудниками кафедры биомедицинской физики физического факультета ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» для пакета MathCad 14.0.

В качестве характеристики степени изменения кровотока под действием лазерного излучения учитывали ширину спектра выходного сигнала установки. Поскольку охватить всю область возможных параметров облучения невозможно, то при проведении исследований использовали стохастические методы планирования эксперимента. Это означает, что мощность облучения выбирали случайным образом в диапазоне от 3 до 30 мВт, а длительность облучения — в диапазоне от 1 до 30 мин. Естественно предположить, что уровень микроциркуляции крови различается у



а



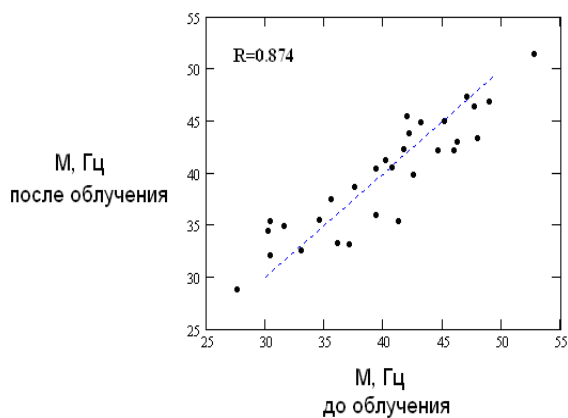
б

Рисунок 75 – Разработанная экспериментальная установка для *in vivo* исследований микроциркуляции крови морских свинок при чрезкожном облучении сосудов: схема (а); общий вид (б)

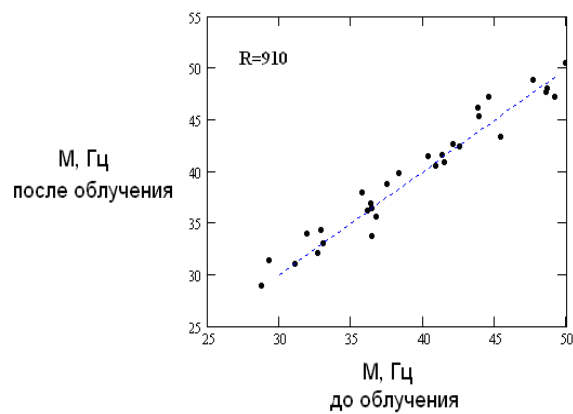
разных особей животных, являясь индивидуальным признаком, что и было подтверждено в последующих экспериментах. Но если лазерное излучение оказывает действие на состояние микроциркуляции крови, то это должно проявиться в изменениях ширины спектра выходного сигнала установки измеренного до и после облучения. Для выявления взаимосвязи между упомянутыми показателями проводили линейный корреляционный анализ. В каждом эксперименте использовали группы из 30 животных. Если облучение проводили в видимом диапазоне света в течение менее 10 мин, то животное не фиксировали в установке, чтобы избежать иммобилизационного стресса. При облучении в инфракрасном диапазоне, либо при экспозициях 10 мин и более животных фиксировали. При облучении в течение часа и более с помощью матрицы, набранной из VCSEL лазеров, иммобилизацию животных не проводили, а облучающую систему фиксировали на спине животного. Изучали изменения интенсивности микроциркуляции крови в коже лабораторных животных до и после лазерного облучения.

Были проведены исследования взаимосвязи ширины спектра выходного сигнала измерительной установки до и после чрезкожного лазерного облучения морских свинок. Наиболее характерные результаты исследований He-Ne лазером ( $\lambda=633$  нм,  $P=3$  мВт) представлены на рисунке 76. Всего было проведено 30 опытов. Среднее значение коэффициента линейной регрессии между сопоставляемыми значениями интенсивности микроциркуляции составило 0.995. Относительный размах вариации для этой величины составил 14,9 %. Стандартное отклонение, нормированное на среднее значение, равнялось 4,6 %. Близость к 1 значений коэффициента линейной регрессии между шириной спектра измеряемого сигнала до и после облучения дают возможность заключить, что, лазерное излучение непосредственно не оказывает никакого действия на состояние микроциркуляции крови.

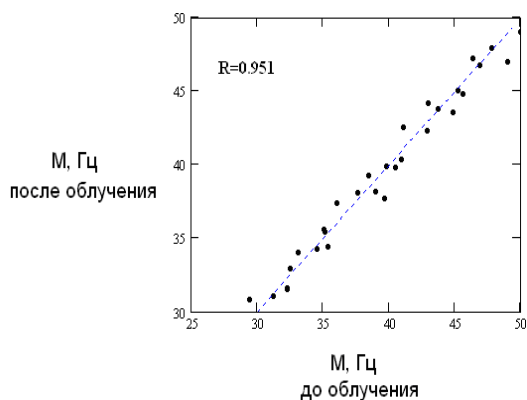
Проводя облучение одномодовыми VCSEL лазерами ( $\lambda=850$  нм, Рисунок 77) в течение от 10 до 30 мин, животных фиксировали. Мощность облучения варьировалась от 1.5 до 15 мВт с дискретностью 1.5 мВт (для облучения включали



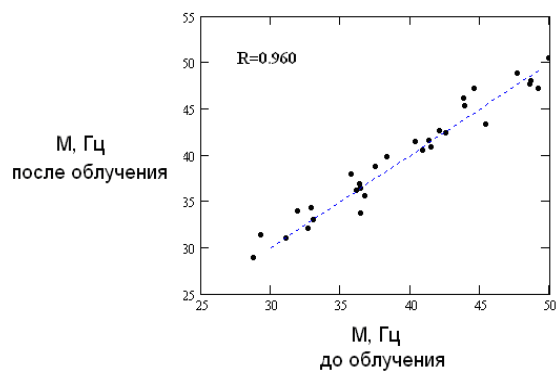
а



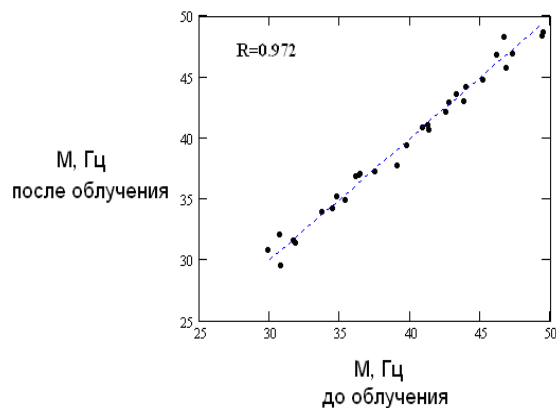
б



в



г



д

Рисунок 76 – Зависимость ширины спектра выходного сигнала установки до и после чрескожного облучения морских свинок светом He-Ne лазера ( $\lambda=633$  нм,  $P=3$  мВт), длительность облучения 1 мин (а), 2 мин (б), 3 мин (в), 4 мин (г), 5 мин (д)



Рисунок 77 - Одномодовый VCSEL лазер,  $\lambda=850$  нм

разное число лазеров). Характерная взаимная зависимость ширины спектра выходного сигнала до и после облучения представлена на рисунке 78.

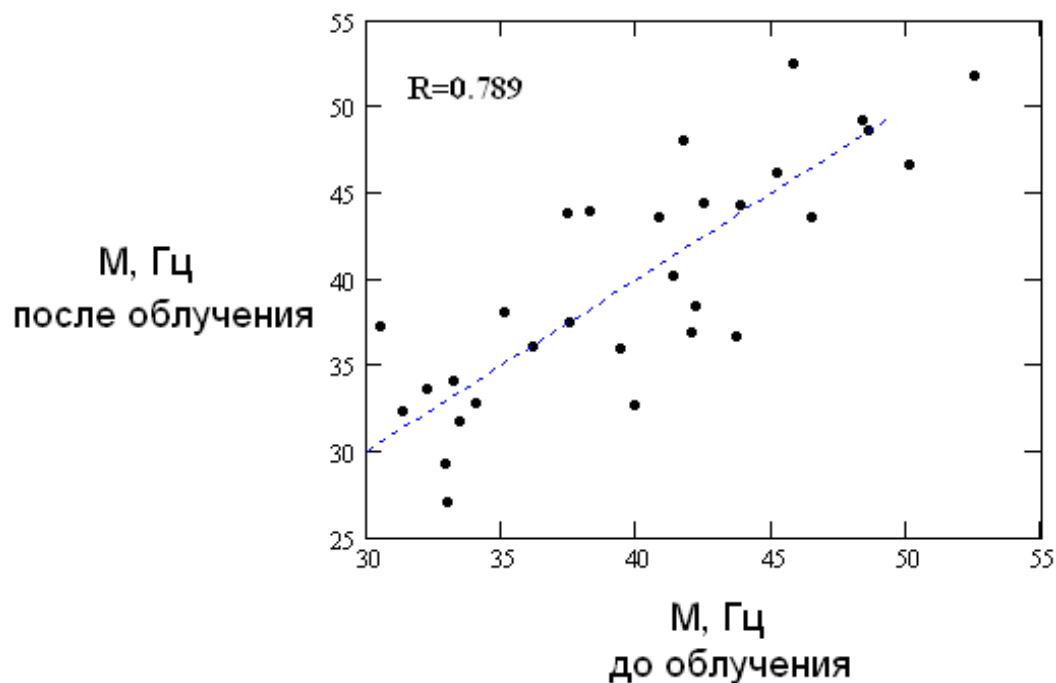


Рисунок 78 - Зависимость ширины спектра выходного сигнала установки до и после чрескожного облучения морских свинок светом VCSEL лазера ( $\lambda=850$  нм,  $P=10$  мВт; длительность облучения 29 мин)



Видно, что разброс данных существенно выше, чем в случае облучения светом He-Ne лазера. По-видимому, это могло быть связано с иммобилизационным стрессом, что выражалось в индивидуальных реакциях через изменение исходной интенсивности микроциркуляции. Всего было проведено 34 опыта.

Среднее значение 0.789. Стандартное отклонение, нормированное на среднее значение, равнялось 26,9 %. По-прежнему, среднее значение коэффициента линейной регрессии между шириной спектра выходного сигнала установки до и после облучения близко к 1. Возможно лазерное излучение вызывает некоторое снижение кровотока, но ни в коей мере не вызывает его стимуляцию, как это принято считать в настоящее время (Владимиров, 1999).

Для исследования эффектов длительного облучения на длине волны 850 нм использовали матрицу из VCSEL лазеров (Рисунок 79). Матрицу фиксировали на спине животного. Полная мощность облучения составила 45 мВт, длительность облучения – 24 ч. В экспериментах была использована группа из 7 животных. Результаты проведенных исследований отражены на рисунке 80. Видно, что результаты характеризовались большим разбросом данных и позволяли лишь грубо оценить значение коэффициента линейной корреляции. Он составил величину, равную 0.857, что также свидетельствовало об отсутствии непосредственного действия лазерного излучения на систему микроциркуляции крови.

Провести облучение морских свинок светом инфракрасного диапазона без их иммобилизации крайне сложно, поскольку излучение невидимо глазом и может быть визуализировано только с помощью специальных видеокамер, работающих в ИК-диапазоне, либо с помощью флуоресцентных пленок. Использование, как камер, так и флуоресцентных пленок, затруднительно в *in vivo* экспериментах. Иммобилизация животных вызывает стресс, что в свою очередь приводит к большому разбросу измеряемых характеристик, снижая точность диагностики.

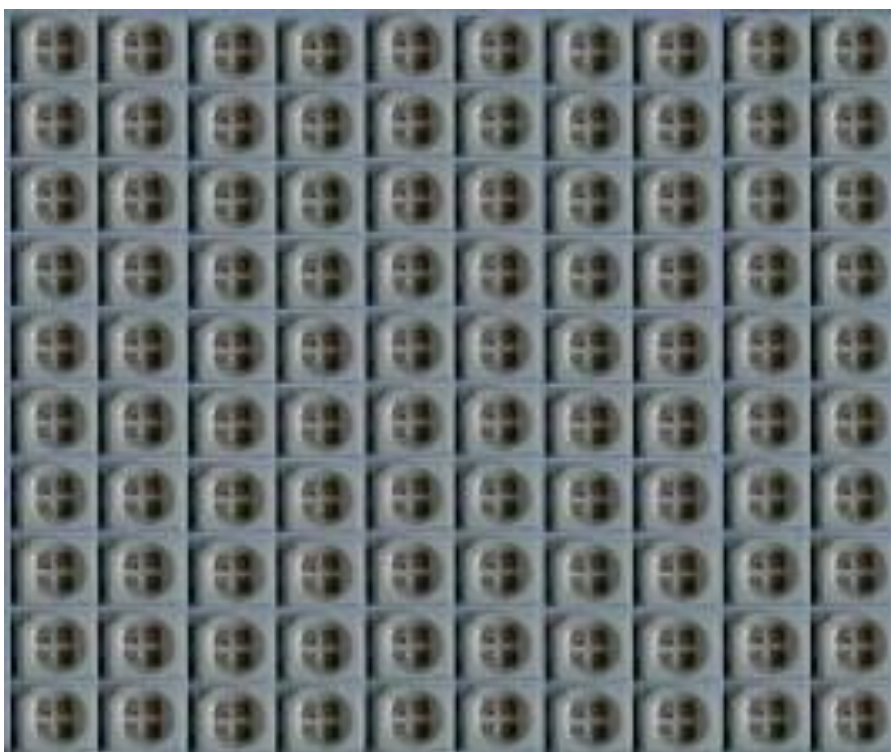


Рисунок 79 - Система для чрескожного облучения морских свинок, собранная на основе матрицы VCSEL лазеров ( $\lambda=850$  нм, размер матрицы 3x3 см)

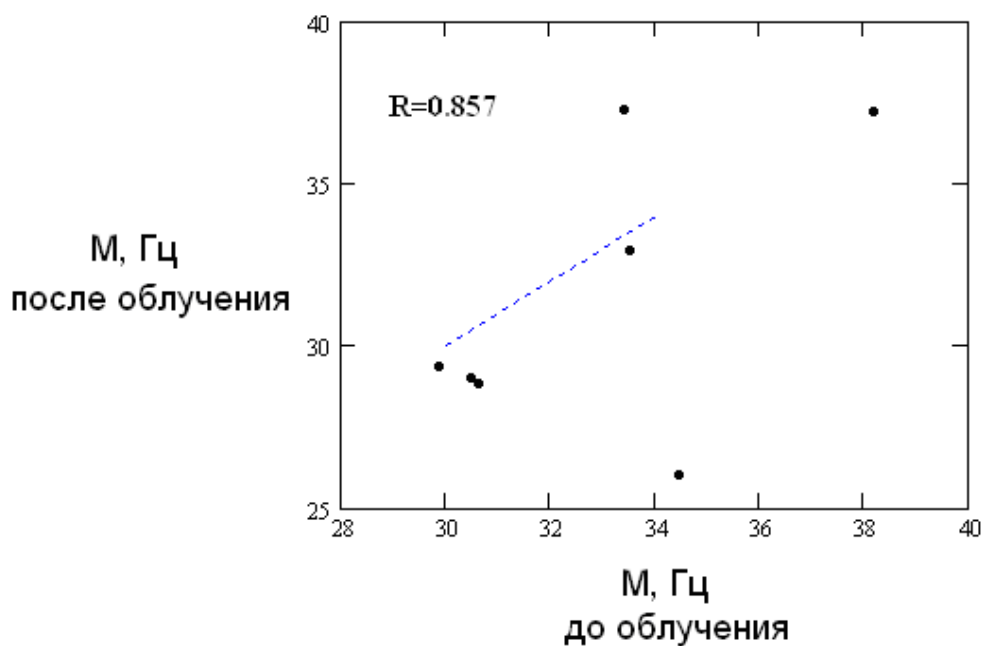


Рисунок 80 - Зависимость ширины спектра выходного сигнала установки до и после чрескожного облучения морских свинок светом VCSEL лазера ( $\lambda=850$  нм,  $P=15$  мВт; длительность облучения 24 ч) с использованием матрицы

Поэтому, ввиду чрезвычайной сложности проводимых экспериментов был поставлен только один опыт с использованием 20 животных без их иммобилизации при облучении лазером мощностью 5 мВт на длине волны 980 нм при длительности экспозиции 10 мин. Результаты исследований представлены на рисунке 81.

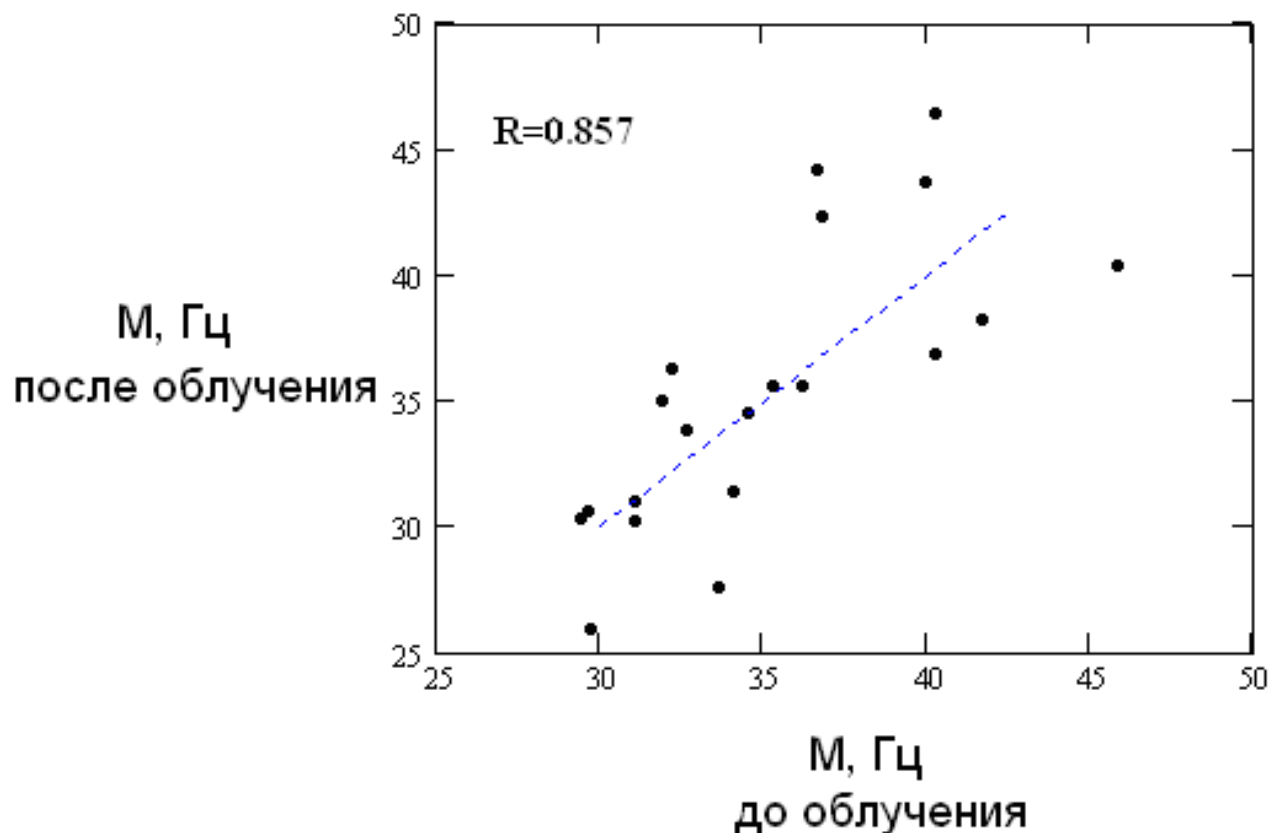


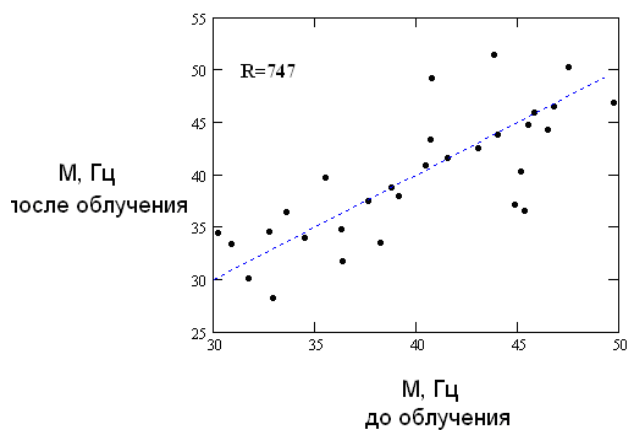
Рисунок 81 - Зависимость ширины спектра выходного сигнала установки до и после чрезкожного облучения морских свинок светом КЛМ-980 лазером ( $\lambda=980$  нм,  $P=5$  мВт; длительность облучения 10 мин)

Как показали оценки, коэффициент линейной регрессии составил 0.857. Это свидетельствовало о том, что низкоинтенсивное лазерное излучение на длине волны 980 нм также не вызывает изменений состояния микроциркуляции крови лабораторных животных при чрезкожном облучении.

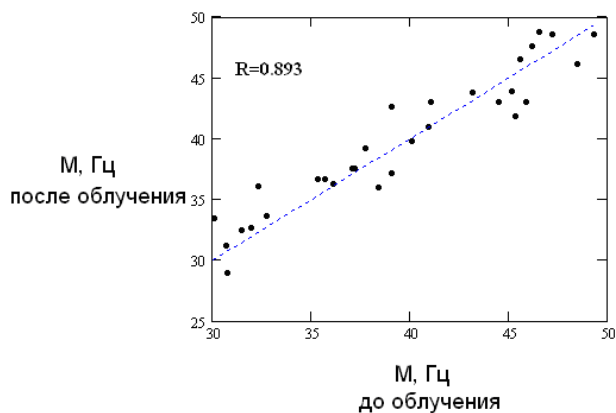
Помимо пространственной когерентности свет обладает еще одним важнейшим свойством – временной когерентностью, то есть монохроматичностью. Временная когерентность нарушается, если свет проходит через среды показатель преломления, которых случайным образом флуктуирует во времени. Например, это происходит, когда на кожу попадают спеклы, рассеянные от движущихся поверхностей.

До настоящего времени частичное изменение временной когерентности полностью игнорировалось в работах по изучению действия лазерного излучения на организм. Хотя результаты предыдущего раздела вообще ставят под сомнение все эффекты лазерного излучения на организм теплокровных, выявление роли монохроматичности света при его взаимодействии с тканями лабораторных животных представляет собой отдельную и на текущий момент времени нерешенную проблему.

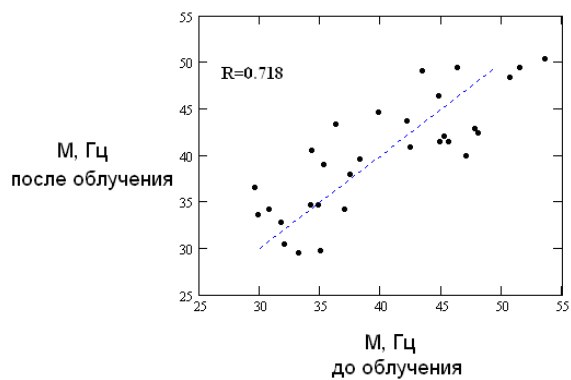
В данном разделе использовали чрезкожное облучение морских свинок светом He-Ne лазера ( $\lambda=633$  нм,  $P=5$  мВт, в течение 10 мин) в режимах, используемых в клинической практике. Для выполнения исследований по данной диссертационной работе была разработана установка с контролируемой временной когерентностью. Для уменьшения времени когерентности монохроматическое излучение лазера на длине волны 633 нм пропускали через стеклянную кювету шириной 1 мм, содержащую разведенное молоко. В молочной взвеси большое количество движущихся рассеивателей, вызывающих интенсивную динамику спеклов. Падение степени временной когерентности будет тем больше, чем выше концентрация рассеивателей. В экспериментах использовали молоко (с начальной жирностью 3,5 %) разведенное дистиллированной водой в концентрациях 18, 12 и 6 % соответственно. Чрезкожному облучению подвергли группу из 30 животных. Результаты исследований представлены на рисунке 82.



а



б



в

Рисунок 82 - Зависимость ширины спектра выходного сигнала установки до и после чрескожного облучения морских свинок динамическими спеклами светом He-Ne лазера ( $\lambda=633$  нм,  $P=5$  мВт, в течение 10 мин ); концентрация рассеивающей взвеси 18% (а), 12% (б), 6% (в)

Проведенные исследования показали, что степень монохроматичности излучения не влияет на состояние микроциркуляции крови. Как и в случае полностью монохроматического излучения, лазерный свет не оказывал достоверного влияния на микроциркуляцию крови животного при чрескожном облучении и этот лазер может быть использован в диагностических целях.

Для анализа характеристик биоспеклов (а именно, размера и контраста спеклов), рассеянных в коже животных на различной глубине, использовали когерентный микроскоп (Рисунок 83) и сканирующий спекл-микроскоп (Рисунок 84), выполненный на основе двухкоординатного сканирующего устройства (Newport). В качестве модели использовали кожу молочных поросят.

В когерентном микроскопе источник белого света заменен на лазер. Как правило, в традиционных измерениях когерентные микроскопы не используются, поскольку образующиеся спеклы существенно снижают качество формирующихся изображений. На рисунке 84 представлен общий вид когерентного микроскопа, использование которого позволило непосредственно измерить средний размер спеклов их контраст и тем самым выявить степень изменения когерентных свойств света при его взаимодействии с рассеивающим биологическим объектом (кожей молочных поросят или бактериальными клетками).

На рисунках представлены изображения образца кожи молочного поросенка при освещении белым (Рисунок 85) и когерентным (Рисунок 86 а-г) светом. Видно, что изображения образца в когерентном свете (Рисунок 86 а-г) существенно отличается при любом увеличении микрообъектива. Спеклы пространственно разрешались оптической системой микроскопа.

При изучении статистических свойств биоспеклов анализировали центральную линию спекл-структуры (Рисунок 87). Пример распределения интенсивности (после удаления тренда и устранения медленноменяющейся пространственной модуляции) в спекл-структуре, формирующейся в верхних слоях кожи, представлен на рисунке 88.

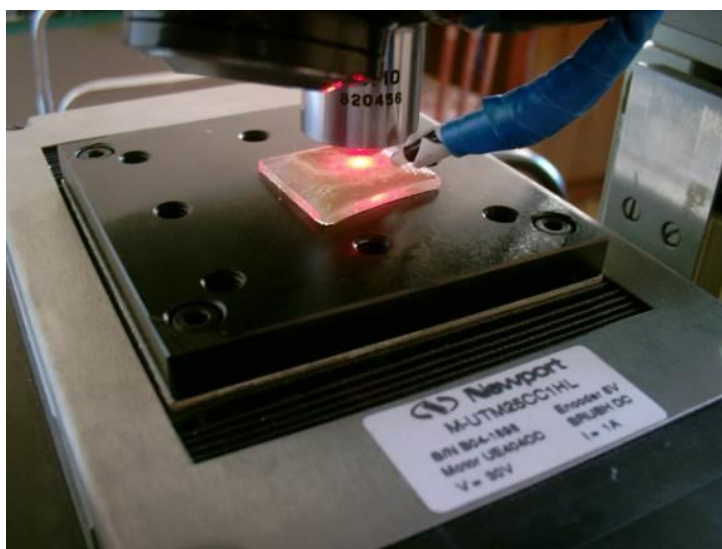


Рисунок 83 - Сканирующий спекл-микроскоп для *in vitro* исследований рассеивающих свойств образцов кожи молочных поросят



Рисунок 84 - Общий вид когерентного микроскопа для измерения размеров спеклов, формирующихся в бактериальной взвеси: 1 – освещающий лазерный пучок (мощность 3 мВт, длина волны 633 нм); 2 – конденсор; 3 – столик микроскопа; 4 – образец кожи; 5 –  $\times 95$  микрообъектив с апертурой 1.25. Система формирования изображения, сопряжена с CMOS камерой Phoenix PC 1280 USB Digital Camera (MuTech, США)

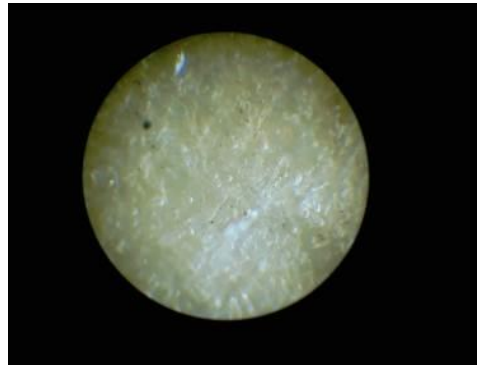


Рисунок 85 - Изображение среза кожи молочного поросенка под микроскопом при освещении белым светом



а



б



в



г

Рисунок 86 - Изображение среза кожи молочного поросенка под микроскопом при освещении когерентным светом, формирование спекл-структур: увеличение  $\times 8$  (а),  $\times 20$  (б),  $\times 40$  (в),  $\times 95$  (г)



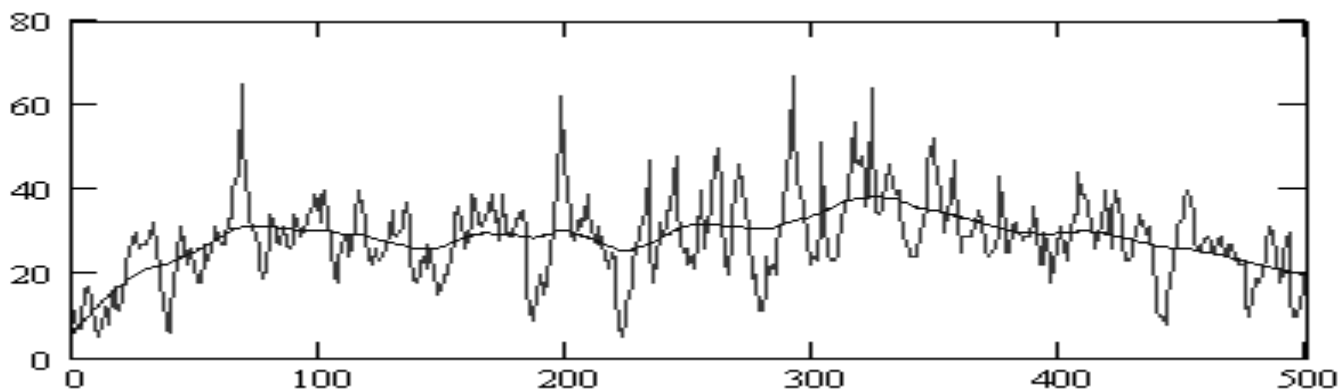


Рисунок 87 - Распределение интенсивности спекл-структуры в одной (центральной) линии видео камеры. Сплошная сглаженная линия – тренд, вызванный модуляцией интенсивности освещающего пучка

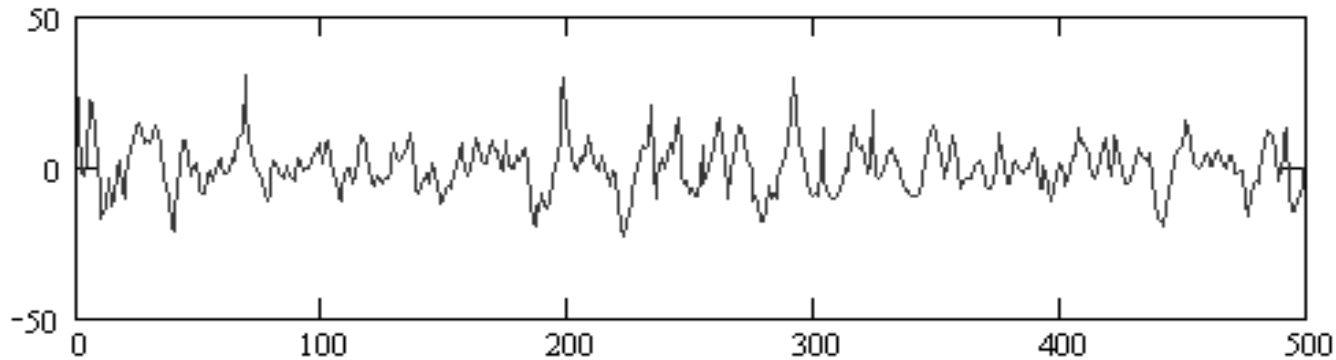


Рисунок 88 - Распределение интенсивности спеклов после удаления тренда

Корреляционная функция флуктуаций интенсивности спеклов, вычисленная по такой реализации, позволила определить средний размер биоспеклов и их контраст при увеличении  $\times 8$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$  и  $\times 95$  (Рисунок 89 а-г).

Как следует из рисунка 89 длина корреляции спекл-поля больше размера отдельного пикселя CCD камеры, т.е. спеклы пространственно разрешаются оптической системой микроскопа.

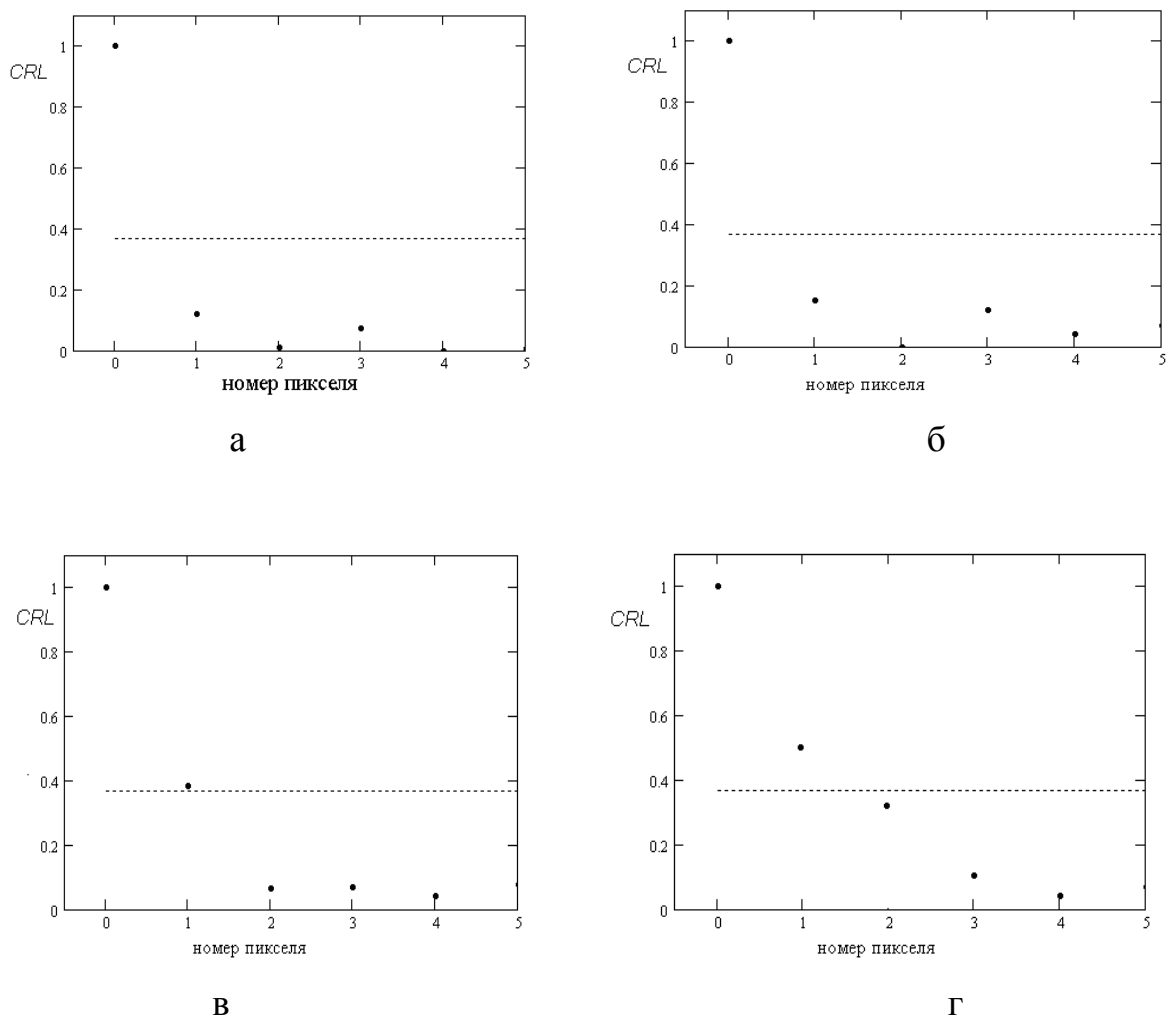


Рисунок 89 - Корреляционная функция спекл-структуры, зарегистрированной при  $\times 8$  увеличении (а);  $\times 20$  увеличении (б);  $\times 40$  увеличении (в);  $\times 90$  увеличении (г)

Дальнейшие исследования были направлены на изучение процессов трансформации когерентного излучения в некогерентный свет в тканях кожи животных. В случае если свет перестает быть когерентным, исчезают его основные отличия от естественного света. Выявление условий, при которых лазерное

излучение воспринимается живыми организмами как естественный свет, чрезвычайно важно, если когерентный свет используется с диагностической целью. Наблюдения биоспектров, образующихся при рассеянии когерентного света в срезах кожи молочного поросенка, проводили в свободном пространстве с помощью когерентного микроскопа, описанного ранее.

Слои кожи молочного поросенка были срезаны горизонтально с помощью замораживающего микротомы. Каждый срезанный образец кожи был помещен между двумя покровными стеклами. Края полученных «сэндвич-образцов» были герметично закрыты парафином. Между экспериментами приготовленные образцы хранили в морозильной камере при температуре - 18 °С. Некоторые примеры готовых образцов представлены на рисунке 90 а, б.



а



б

Рисунок 90 – Образцы горизонтальных срезов кожи молочного поросенка

Следует отметить, что образцы могут быть чрезвычайно неоднородны, что отражает сложную структуру кожи; иногда они могут содержать фрагмент капиллярной сети (например, образец № 31, Рисунок 90 б); образец № 37 (Рисунок 90 б) – вертикальный срез кожи.

Образцы кожи молочного поросенка были приготовлены разной толщины и с разной глубины (Таблица 15).

Таблица 15 – Образцы срезов кожи молочного поросенка

толщина среза, мкм	глубина среза, мкм
20	20, 170, 270, 520, 1370
30	40, 190, 270, 540, 1390
50	70, 220, 570, 1420
100	620, 1470
150	720, 1570
200	320, 870
300	1070, 1920
400	400, 800

Результатами проведенных исследований явилось следующее:

- спеклы, формирующиеся в тканях кожи, имеют очень малые размеры. В верхних слоях эпидермиса размеры спеклов лежат в диапазоне  $1.5\lambda-3\lambda$ . При толщине образца кожи порядка 300 мкм размеры спеклов стремятся к длине волны используемого излучения, то есть свет становится пространственно некогерентным;

- контраст спеклов, измеренных CCD камерой, относительно низок; он равен приблизительно 0.7. Это значение типичное для полностью развитых многократно рассеянных и деполяризованных спеклов.

На основании проведенных исследований можно сделать следующее заключение свет, проходя в кожных покровах животных расстояние порядка 200-300 мкм, полностью утрачивает свою пространственную когерентность. Следует подчеркнуть, что кровосодержащие слои, на которые воздействуют лазерным излучением, лежат на глубине более 200 мкм. Таким образом, пространственная когерентность света не

может оказывать влияния на кровеносные сосуды, залегающие на глубине более 200 мкм от поверхности кожи, при ее облучении.

### 5.3.2. Разработка и создание экспериментальной диагностической биосистемы для определения реактогенности вакцинных штаммов на организменном уровне, основанной на спекл-имиджинге

Общепринятыми биомоделями для оценки реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ являются морские свинки (Лабораторная диагностика ..., 2009). В связи с этим необходимо было адаптировать методику спекл-имиджинга, отработанную на белых крысах (Dann, 2001; Li, 2006), для данного вида лабораторных животных. Принцип обработки спекл-полей при использовании динамического метода *LASCA* состоит в следующем. В каждой точке динамической спекл-структуры вычисляли контраст динамических спеклов по формуле:

$$V = \frac{\sqrt{\langle (I - \langle I \rangle)^2 \rangle}}{\langle I \rangle} = \frac{\sigma_I}{\langle I \rangle}, \quad (25)$$

где  $I$  – мгновенная интенсивность динамических биоспеклов;  $\sigma_I$  - стандартное отклонение флуктуаций интенсивности; угловые скобки означают усреднение по времени.

Очевидно, чем ниже контраст спеклов, тем выше локальная скорость кровотока. Для наблюдения спекл-полей была проведена оптимизация оптической схемы. В частности было показано, что оптимальными являются условия, при которых средний размер спеклов равен размеру одного пикселя CCD/CMOS камеры. Увеличение оптической системы при этом должно быть существенно меньше 1 (оптимальное значение увеличения лежит в диапазоне 0.2-0.3).

Главным недостатком предложенной методики визуализации микрососудов являлась ее чувствительность к движению лабораторных животных, например, обусловленных дыханием. Смещение объекта на величину  $\Delta L$  вызывало смещение спеклов в плоскости наблюдения на величину  $\Gamma \Delta L$ , где  $\Gamma$  – увеличение системы.

В предложенной оптической системе увеличение оказалось существенно повышенным и составило 1.5. Размер спеклов в плоскости CMOS камеры регулировали с помощью пространственного фильтра с переменной апертурой (ирисовая диафрагма, расположенная непосредственно за объективом). Размер спеклов в плоскости наблюдения в данной установке, составлял 25 мкм, что в 5 раз больше размера пикселей камеры. Большие размеры спеклов позволяли проводить вычисления двумерных кросс-корреляционных функций и находить положения их максимумов с высокой точностью. На рисунке 91, а представлена установка для изучения микрососудов головного мозга морской свинки методом спекл-имиджинга. Нетрудно заметить, что никаких признаков микрососудов в отдельно зарегистрированном изображении перед обработкой спекл-полей не наблюдалось (Рисунок 91 б).

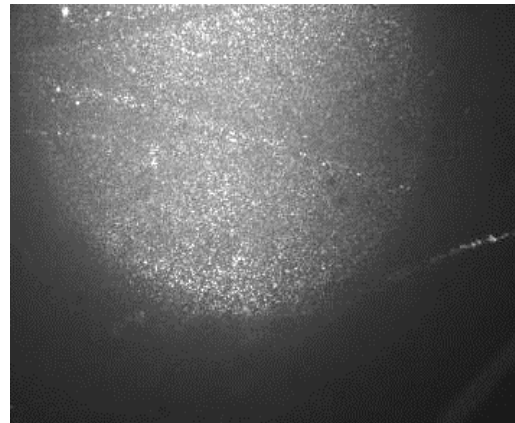


Рисунок 91 – Установка для исследования церебрального кровотока морской свинки методом спекл-имиджинга (а); изображение (отдельный фрейм) головного мозга морской свинки в системе спекл-имиджинга

Полученные данные позволили предложить следующий алгоритм обработки динамических изображений. Между каждыми двумя последовательно зарегистрированными изображениями вычисляли двумерную кросс-корреляционную функцию (Рисунок 92). Положение максимума позволяло с высокой точностью определять взаимное смещение изображений. На следующем этапе была проведена корректировка смещений изображений спекл-полей, вызванных дыханием лабораторного животного (Рисунок 93). Коэффициент корреляции между последовательно зарегистрированными изображениями высоки, и составлял порядка 0,9 (Рисунок 92). Это дало возможность найти значение смещения головы морской свинки с высокой точностью.

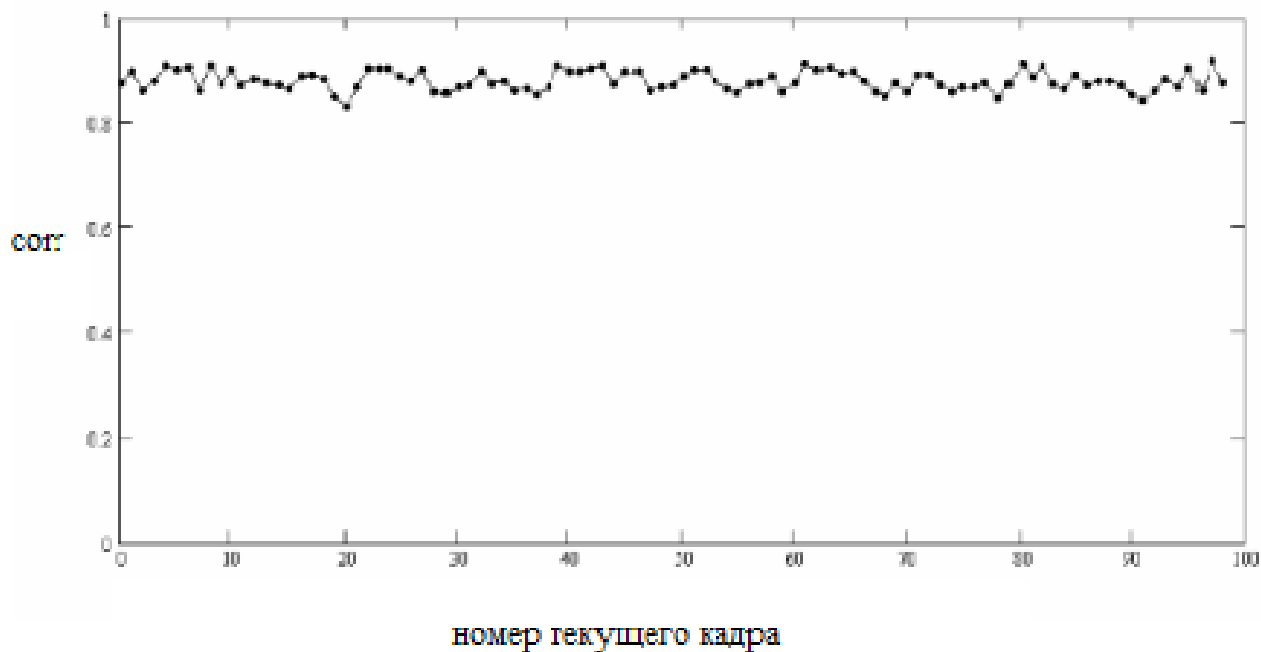


Рисунок 92 – Коэффициент корреляции между последовательно зарегистрированными изображениями; corr – коэффициент корреляции

Иллюстрация траектории движения головы морской свинки, рассчитанная с использованием кросс-корреляционной функции, представлена на рисунке 93. На

этом графике видно, что смещение головы морской свинки при дыхании происходило с относительно большой амплитудой, около 600 нм.

Затем в каждой точке зарегистрированных двумерных изображений проводили вычисление контраста динамических спеклов (на этот раз динамика спеклов была вызвана уже движением крови в микрососудах, а не дыханием животного) и строили двумерное распределение контраста (Рисунок 94). Картина контраста отражала структуру микроциркуляторной сети. В областях, где наблюдалось движение эритроцитов, контраст спеклов был снижен.

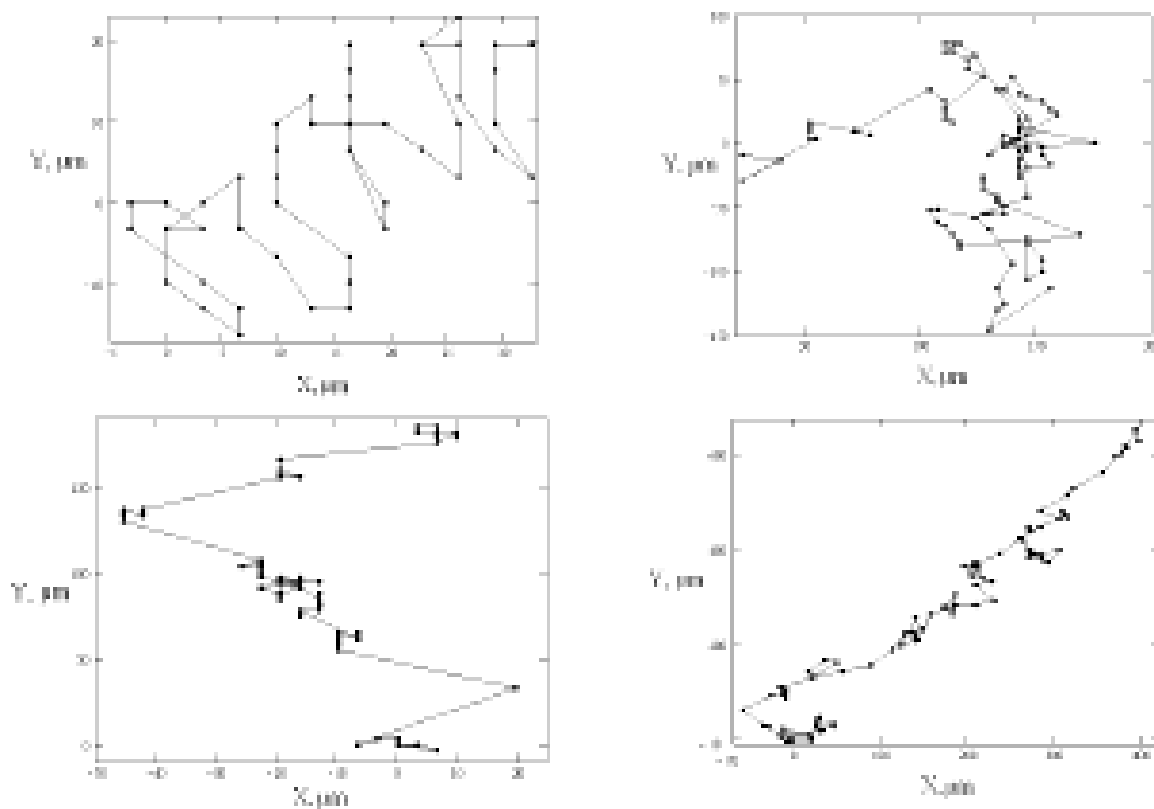


Рисунок 93 – Траектория движения головы интактной морской свинки



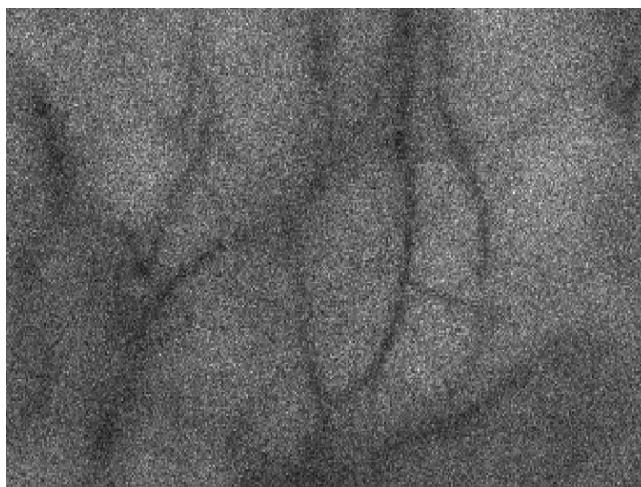
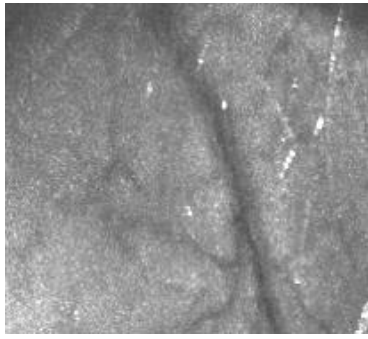


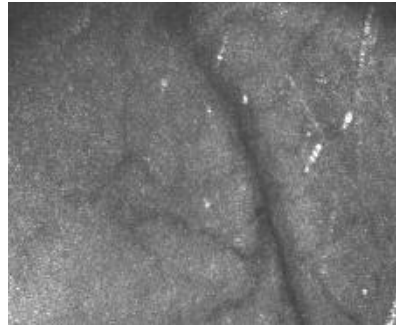
Рисунок 94 – Изображение сосудов головного мозга (фрагмент) интактной морской свинки, полученное методом анализа контраста лазерных спеклов (*LASCA*)

Данная усовершенствованная методика позволила проводить прижизненную визуализацию микрососудов (размерами порядка 3 мкм) головного мозга интактных морских свинок. Для проведения исследований влияния бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ на церебральные микрососуды морской свинки необходимо было провести настройку контрастного изображения сосудов в микроскопе. Установка позволяла проводить послойную визуализацию сосудов головного мозга на различной глубине, при этом проводили вычисления временного контраста (Рисунок 95). Аналогичные исследования были проведены с помощью измерений пространственного контраста при размере подобластей 5x5 пикселей при последующем усреднении по 100 фреймам (Рисунок 96).

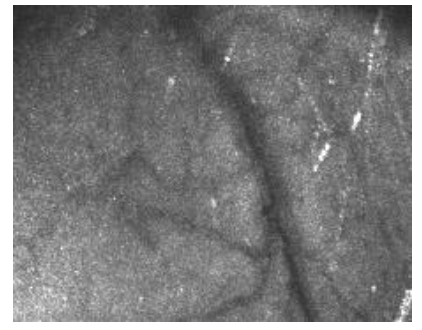
На представленных рисунках видно, что наиболее четкие изображения сосудов были видны на глубине 300 мкм (Рисунки 95 г; 96 г). На этой глубине изображения и проводили визуализацию сосудов головного мозга морских свинок до, и после облучения головы животных лазером ( $\lambda=633$  нм). Максимальная мощность излучения составила  $P=30$  мВт, для уменьшения мощности использовали аттенюатор (вращающийся нейтральный фильтр, с переменной оптической плотностью, который позволял изменять мощность облучения от 30 до 1 мВт).



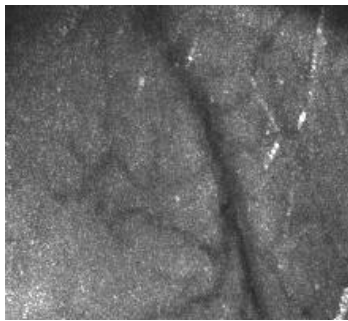
а



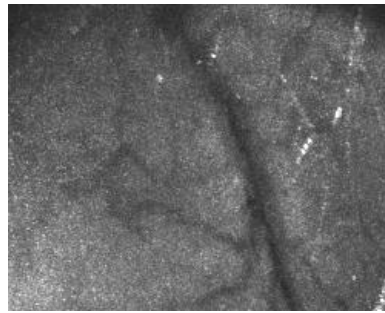
б



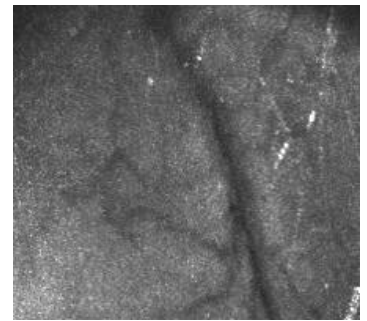
в



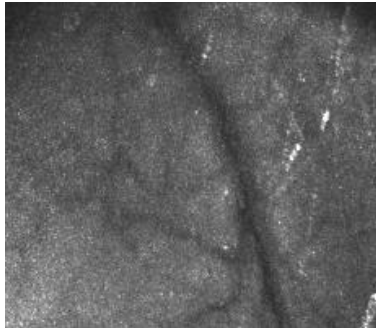
г



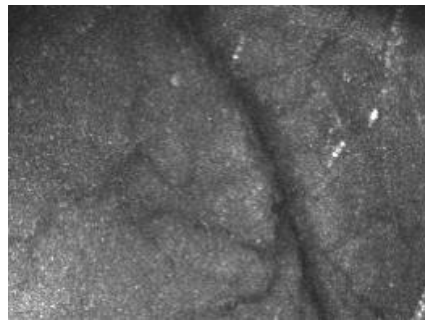
д



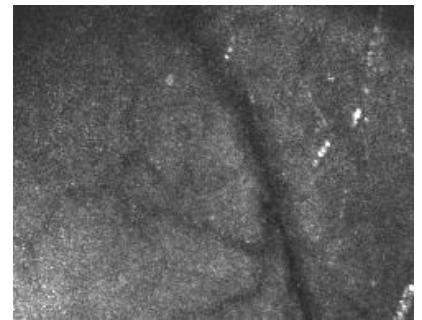
е



ж



з



и

Рисунок 95 – Временной контраст спеклов: визуализация микрососудов на глубине сосудистой оболочки головного мозга 50 (а), 100 (б), 200 (в), 300 (г), 400 (д), 500 (е), 600 (ж), 700 (з), 750 мкм (и)

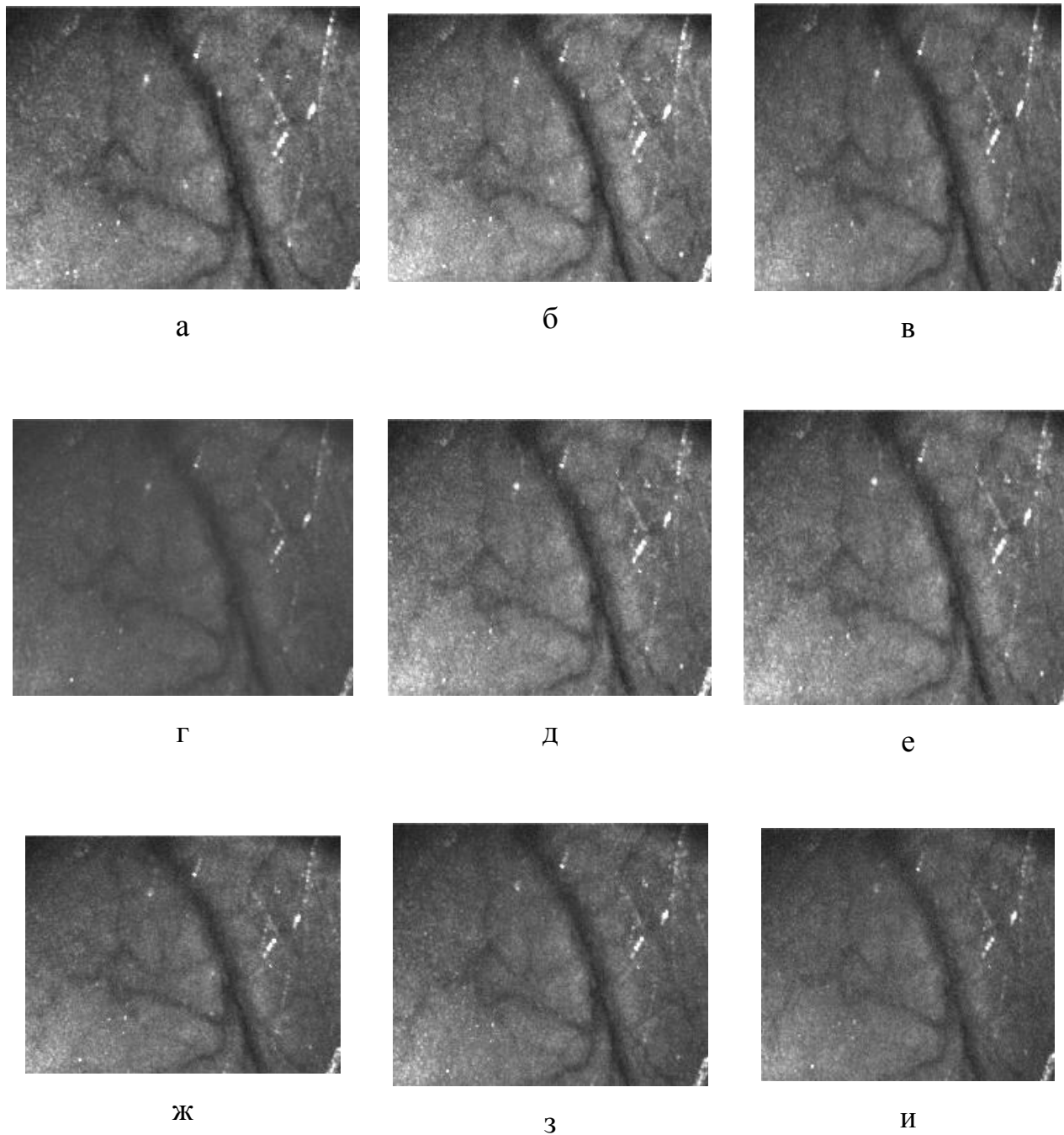


Рисунок 96 – Пространственный контраст спеклов: визуализация микрососудов на глубине сосудистой оболочки головного мозга 50 (а), 100 (б), 200 (в), 300 (г), 400 (д), 500 (е), 600 (ж), 700 (з), 750 мкм (и)

Поскольку для проведения измерений необходимо облучение длительностью 5 с при мощности 1 мВт, то в эксперименте время облучения варьировали в интервале от 5 с до 40 мин, с вычислением временного и пространственного контрастов (Рисунок 97). Размер области облучения был 6х6 мм, что в точности соответствовало условиям освещения используемого при *LASKA* диагностике. Всего было проведено 100 экспериментов.

Как показано в эксперименте никаких видимых изменений в топологии церебральных микрососудов морской свинки до и после облучения лазером методом спекл-имиджинга с использованием измерений временного и пространственного контраста обнаружено не было. То есть данный метод можно использовать в качестве полностью неинвазивного оценочного теста состояния церебральных сосудов.

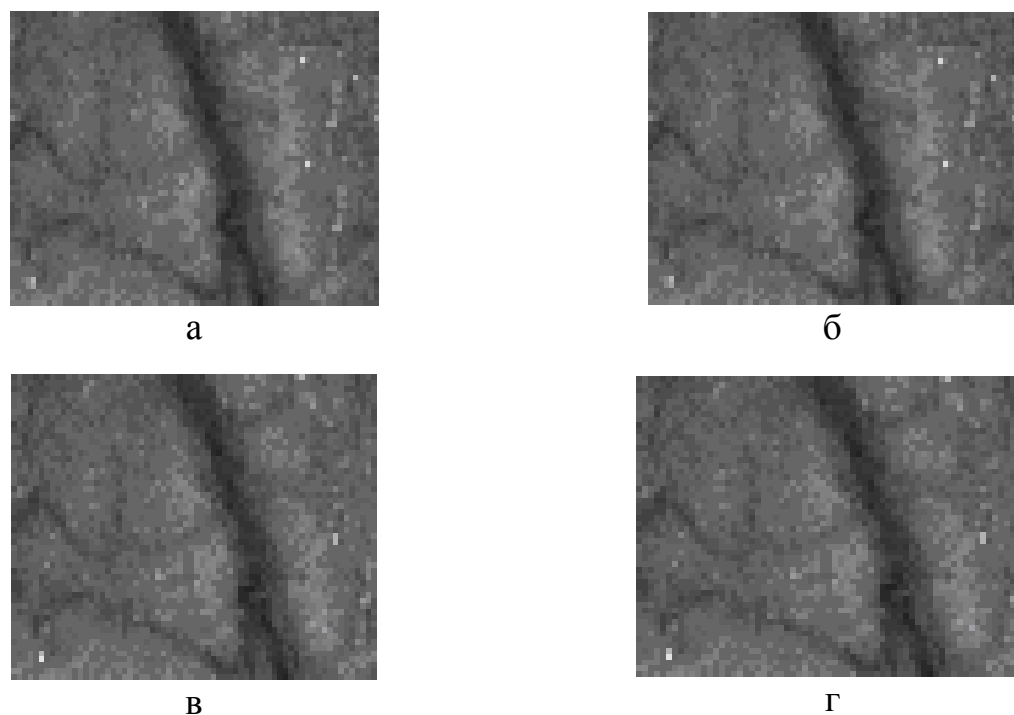


Рисунок 97 – Временной (а, б) и пространственный (в, г) контраст спеклов до (а, в) и после (б, г) облучения головы морских свинок лазером (40 мин;  $P = 30$  мВт) визуализация микрососудов на глубине сосудистой оболочки головного мозга 300 мкм

Таким образом, проведенная оптимизация метода спекл-имиджинга позволила перейти к решению основной задачи настоящего этапа диссертационной работы по сравнительному изучению на морских свинках реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 и *F. tularensis* 15 до и после ФДВ.

Для регистрации изменений церебрального кровотока морских свинок предварительно наркотизировали нембуталом по стандартной схеме. Для исключения влияния кожного кровотока, с поверхности головы удаляли фрагмент кожи (Рисунок 98). Были проведены две серии экспериментов. В каждой серии использовали по три группы животных. Первая группа – интактные животные. Вторая группа – животные, которым внутримышечно вводили 0,5 мл взвеси клеток вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ( $2 \cdot 10^9$  м.к./мл) или *F. tularensis* 15 ( $5 \cdot 10^9$  м.к./мл). Третья группа – морские свинки, которым проводили аналогичные инъекции бактерий *B. abortus* 19 после 3 ч ФДВ или бактерий *F. tularensis* 15 после 6 ч ФДВ.

Поле зрения системы формирования изображения в установке для спекл-имиджинга составляло 6x6 мм, увеличение оптической системы равнялось 1.6, пространственное разрешение – 5.8 мкм. Наблюдение за животными проводили в течение 1 ч после инъекции. Результаты эксперимента представлены на рисунках 99-104. На рисунках 99 и 102 представлены усредненные по времени изображения спекл-полей (среднее по времени значение флуктуаций интенсивности динамических спекл-структур), среднеквадратичного отклонения временных флуктуаций интенсивности и контраста спеклов до введения бактериальных взвесей морским свинкам. Пространственное распределение контраста спеклов в плоскости изображения отражает пространственное расположение глубокозалегающих сосудов головного мозга. Изображения усредненных спеклов и пространственное распределение среднеквадратичного отклонения временных флуктуаций интенсивности биоспеклов являются менее информативными и отражают в первую очередь не расположение микрососудов в капиллярной сети головного мозга, а поверхностные неровности костной ткани головы исследуемых животных (Рисунки

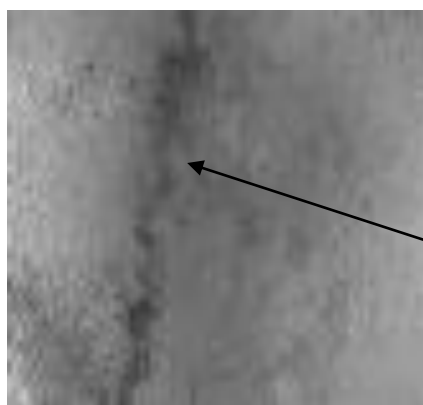
99-104 а, б). Сравнивая рисунки можно заметить, что наблюдаемые изображения несколько смещены относительно друг друга. Этот эффект обусловлен смещением животных в процессе дыхания. Как уже отмечалось, устранить этот эффект в эксперименте крайне сложно.



а



б



сосуд

в

Рисунок 99 – Визуализация сосудов головного мозга морской свинки до введения бактерий вакцинного штамма *B. abortus* 19 : усредненные по времени динамические спеклы (а); STD (б); контраст динамических спеклов в плоскости изображения (в)

На рисунке 99 показаны усредненные по времени изображения спекл-полей, пространственное распределение среднеквадратичного отклонения временных флуктуаций интенсивности (STD) и контраста спеклов интактных животных.

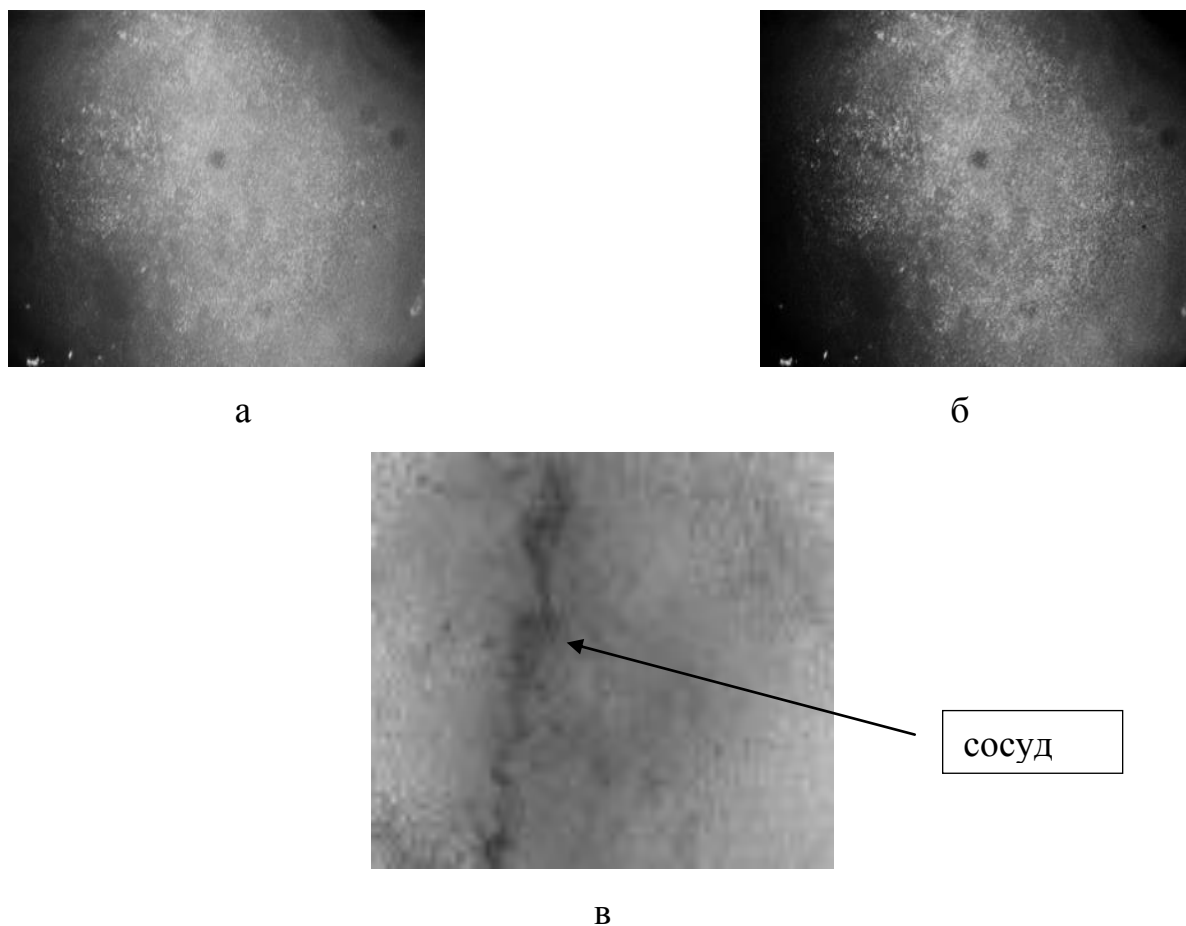


Рисунок 100 – Визуализация сосудов головного мозга морской свинки после введения клеток вакцинного штамма *B. abortus* 19: усредненные по времени динамические спеклы (а); STD (б); контраст динамических спеклов в плоскости изображения (в)

На следующих рисунках представлены изображения, зарегистрированные после введения морским свинкам клеток вакцинного штамма *B. abortus* 19 до (Рисунок 100) и после 3 ч ФДВ (Рисунок 101). Каких-либо заметных изменений в топологии кровеносной сети обнаружено не было.

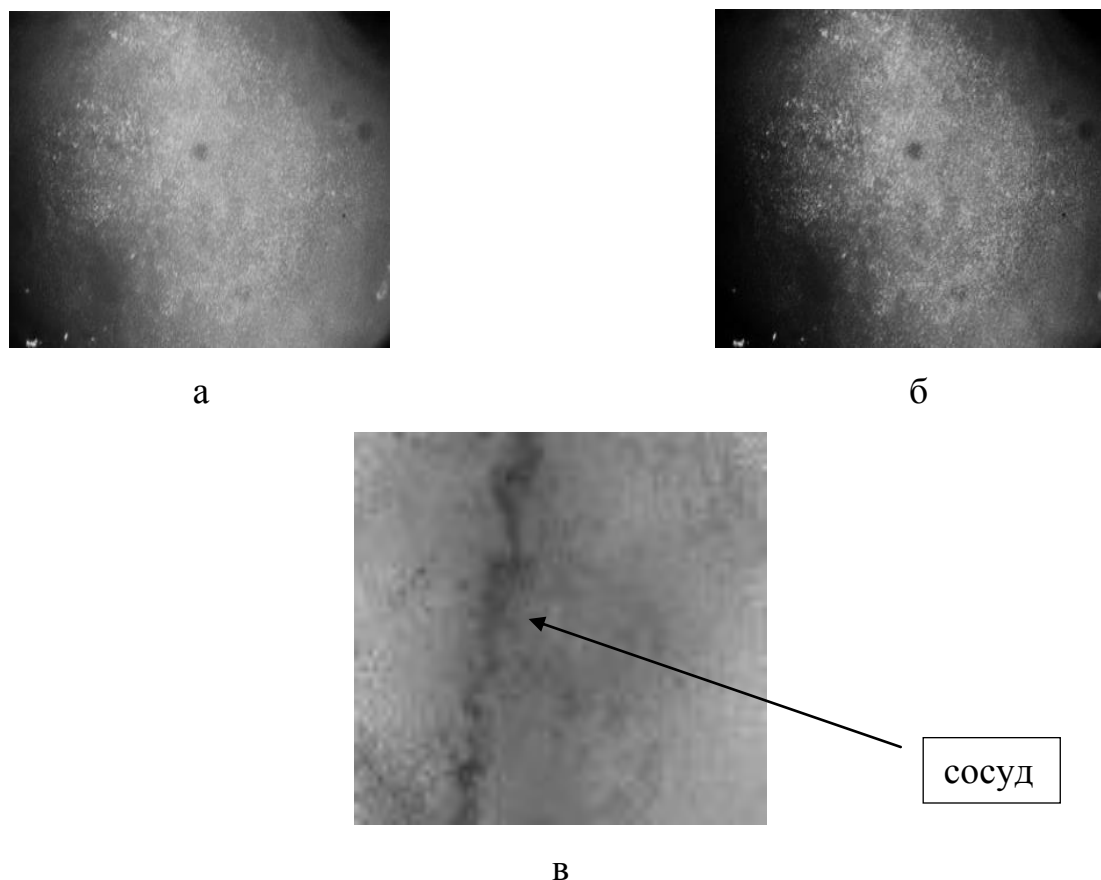


Рисунок 101 – Визуализация сосудов головного мозга морской свинки после введения фотоинактивированных в течение 3 ч клеток *B. abortus* 19: усредненные по времени динамические спеклы (а); STD (б); контраст динамических спеклов в плоскости изображения (в)

Аналогичные результаты были получены при исследовании церебральных сосудов морской свинки после внутримышечного введения клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. На рисунке 102 дано изображение церебральных сосудов интактной морской свинки. На рисунках 103 и 104 показаны те же сосуды после внутримышечного введения животному бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 до (Рисунок 103) и после (Рисунок 104) 6 ч ФДВ.



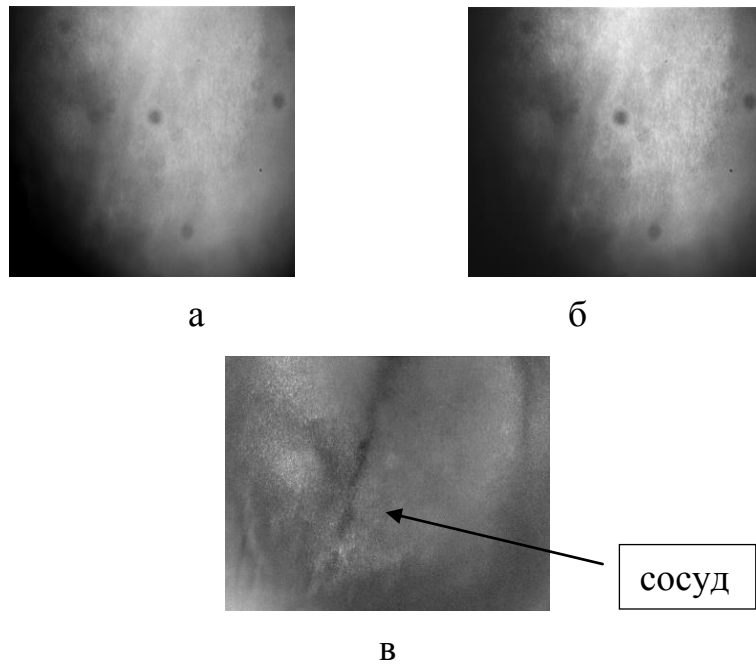


Рисунок 102 – Визуализация сосудов головного мозга морской свинки до введения бактерий *F. tularensis* 15: усредненные по времени динамические спеклы (а); STD (б); контраст динамических спеклов в плоскости изображения (в)

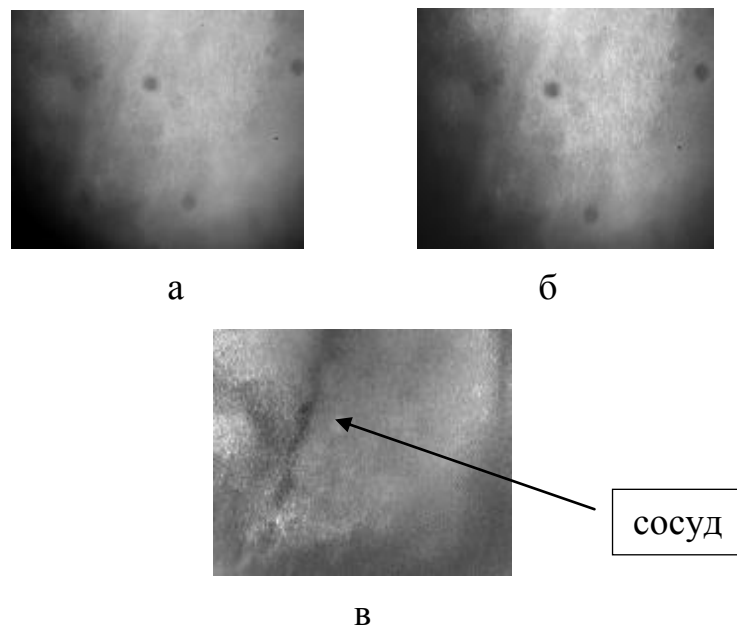


Рисунок 103 – Визуализация сосудов головного мозга морской свинки после введения клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15: усредненные по времени динамические спеклы (а); STD (б); контраст динамических спеклов в плоскости изображения (в)

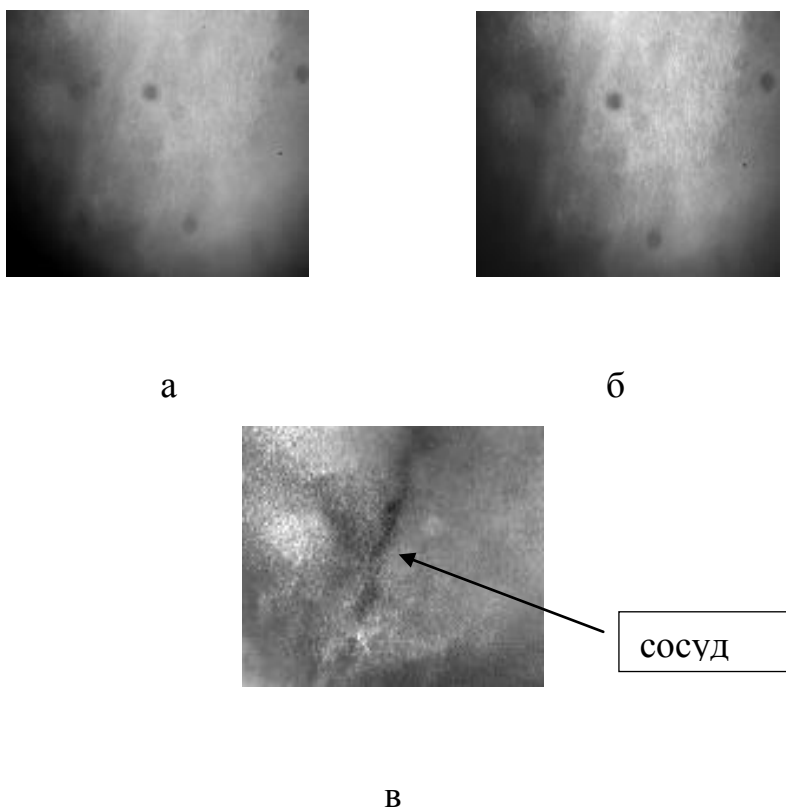


Рисунок 104 – Визуализация сосудов головного мозга морской свинки после введения фотоинактивированных в течение 6 ч клеток *F. tularensis* 15: усредненные по времени динамические спеклы (а); STD (б); контраст динамических спеклов в плоскости изображения (в)

Определение изменений кровотока в микрососудах головного мозга морских свинок до и после введения взвеси интактных и фотоинактивированных клеток вакцинных штаммов *B. abortus* 19 и *F. tularensis* 15 показало, что топология капиллярной сети оставалась практически идентичной. Изменений количества микрососудов с нарушенным кровотоком после внутримышечного введения бактериальных взвесей не наблюдалось. Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что бактерии вакцинных штаммов *B. abortus* 19 и *F. tularensis* 15 (как интактные так и инактивированные методом ФДВ) не являются реактогенными для морских свинок в течение первого часа после их введения.

*5.3.3. Разработка и создание экспериментальной диагностической биосистемы для определения реактогенности вакцинных штаммов на тканевом уровне, основанной на спекл-микроскопии*

Исследование микрососудов размерами сопоставимыми или даже меньшими, чем эритроцит, требует фокусировки лазерного пучка в пятно диаметром, соизмеримым с длиной волны света. Столь острая фокусировка пучка может быть достигнута при использовании 95-кратного микрообъектива с числовой апертурой 1.25.

В данной диссертационной работе была проведена модификация спекл-микроскопа для достижения предельно возможного пространственного разрешения и предложена теория, описывающая механизм формирования выходного сигнала спекл-микроскопа сверхвысокого пространственного разрешения. Разработка теории была проведена совместно с сотрудниками кафедры биомедицинской физики физического факультета ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

При рассеянии сфокусированного лазерного пучка на микрососуде брыжейки морской свинки появляются флуктуации интенсивности спеклов в плоскости их наблюдения. Соответствующее выражение для флуктуаций интенсивности было получено Galanzha et al. (2002):

$$U^s\left(\frac{v \cdot t}{\lambda}\right) \propto \int_{-\infty}^{\infty} U_v\left(\frac{v \cdot t}{\lambda} - \alpha\right) \cdot G(\alpha) d\alpha, \quad (26)$$

где

$$G(\alpha) = \exp\left[-\frac{2\pi \cdot i \cdot X^0}{Z_0} \cdot \alpha\right] \cdot \exp\left[-\frac{\alpha^2}{W_0^2}\right], \quad (27)$$

где  $t$  – время;  $v$  – скорость потока крови в микрососуде;  $X^0$  – координата точки наблюдения флуктуаций поля;  $Z_0$  – расстояние между сосудом и плоскостью

наблюдения;  $W_0$  – радиус перетяжки лазерного пучка;  $U_v\left(\frac{v \cdot t}{\lambda}\right)$  – поле в плоскости микрососуда, которое формировалось бы в случае освещения изучаемого микрососуда плоской волной.

Корреляционная функция флуктуаций интенсивности биоспеклов может быть записана следующим образом:

$$\Psi_I\left(\frac{v \cdot t}{\lambda}\right) \propto \exp\left\{-\frac{\left[\frac{v \cdot t}{\lambda}\right]^2}{2W_0^2 + L_c^2}\right\}. \quad (28)$$

где  $L_c$  – характерный размер неоднородностей (длина корреляции) в потоке крови, исследуемого микрососуда

Измерительная система для исследования потоков крови в микрососудах представлена на рисунке 105.

Принцип работы спекл-микроскопа высокого пространственного разрешения состоит в следующем. Пучок He-Ne лазера ( $\lambda = 633$  нм) с помощью 95-кратного микрообъектива жестко фокусировали на исследуемый микрососуд в пятно малого диаметра (порядка длины волны излучения). Мощность излучения используемого лазера составляла 1 мВт. Для регулировки уровня интенсивности освещения, непосредственно перед лазером был установлен вращающийся аттенюатор (NDC-100C-4M, Mounted Continuously Variable ND Filter Thorlab). Детектирование динамики биоспеклов проводили с помощью кремниевого фотодетектора PDA 10A (Thorlab) с предварительным усилением сигнала. Площадь детектора составляла  $0.78$  мм<sup>2</sup>, полоса частот (0 Гц; 150 МГц), характеристика шума  $NEP = 5.5 \times 10^{-11}$  Вт/ Гц<sup>1/2</sup>. помимо лазера входил источник белого света и оптическая система. Усиленный

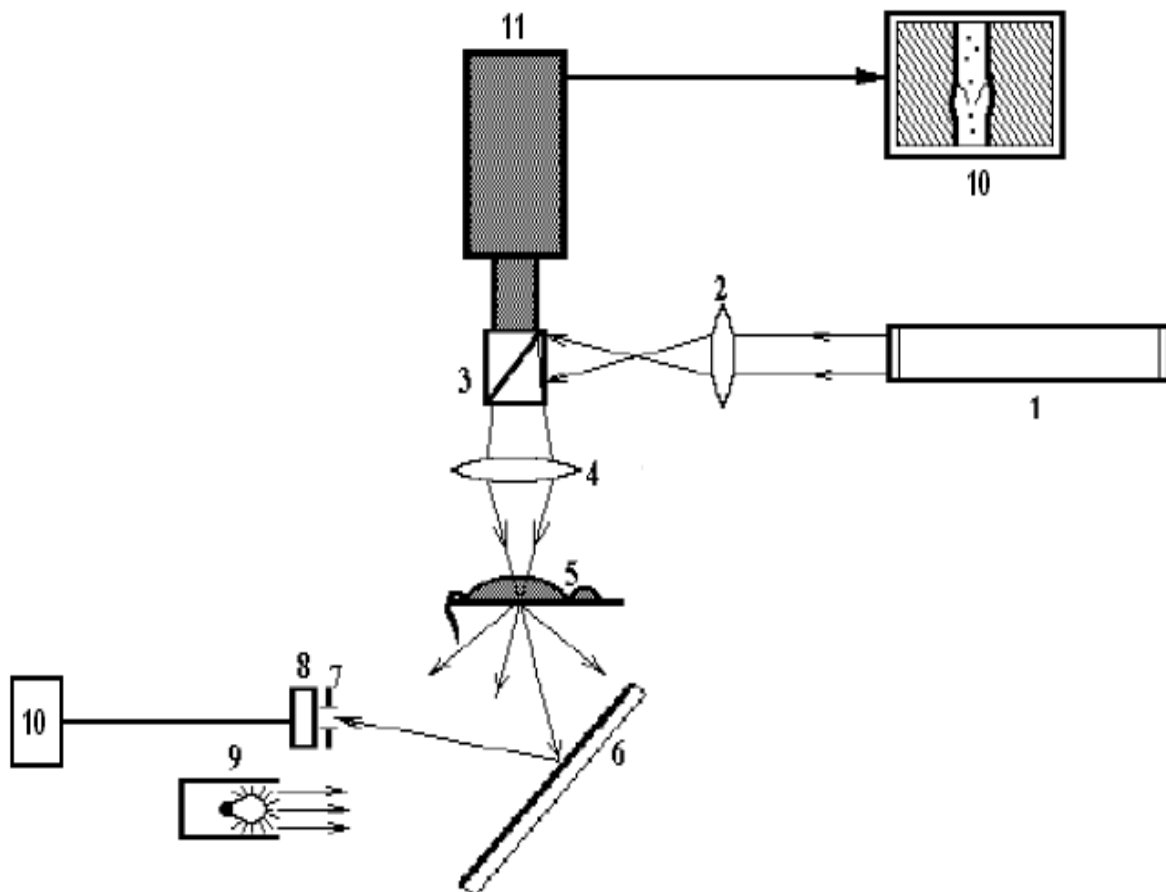


Рисунок 105 – Оптическая схема измерительной системы спекл-микроскопа:

Оптическая схема спекл-микроскопа: 1 – источник когерентного света - He-Ne лазер,

2, 4 – микрообъективы, 3 – светоделительный кубик, 5 – исследуемый сосуд

брыжейки, 6 – зеркало, 7 – диафрагма с малым отверстием, 8 – фотодетектор,

9 – источник света, 10 – фотоприемник, 11 – объектив микроскопа «Биолам»

сигнал поступал на линейный вход двухканальной платы АЦП NI USB-5133, 8 бит, полоса 50 МГц (National Instruments). В состав спекл-микроскопа, формирования изображения (микроскоп Биолам), включающая монохромную цифровую CMOS-камеру WinCamD (DataRay) с разрешением  $1024 \times 1024$  пикселей. Цифровая камера позволяла проводить визуальное наблюдение потоков крови в капиллярах и определять положение контура сосуда в реальном режиме времени.

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

Морская свинка, размещенная на спекл-микроскопе представлена на рисунках 106 а, б.

Во время исследований на брыжейку наносили 1 каплю взвеси вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 ( $5 \cdot 10^9$  м.к./мл) или *B. abortus* 19 ( $2 \cdot 10^9$  м.к./мл). Опытным животным проводили аппликацию бактериальных взвесей, инактивированных методом ФДВ, а контрольным – интактных клеток вакцинных штаммов. Наблюдали за состоянием микрососуда в течение 40 мин после аппликации бактериальной взвеси.

После аппликации на брыжейку взвеси клеток *F. tularensis* 15 визуально, на экране компьютера, наблюдали вазодилатацию микрососуда (Рисунок 107 а-в).

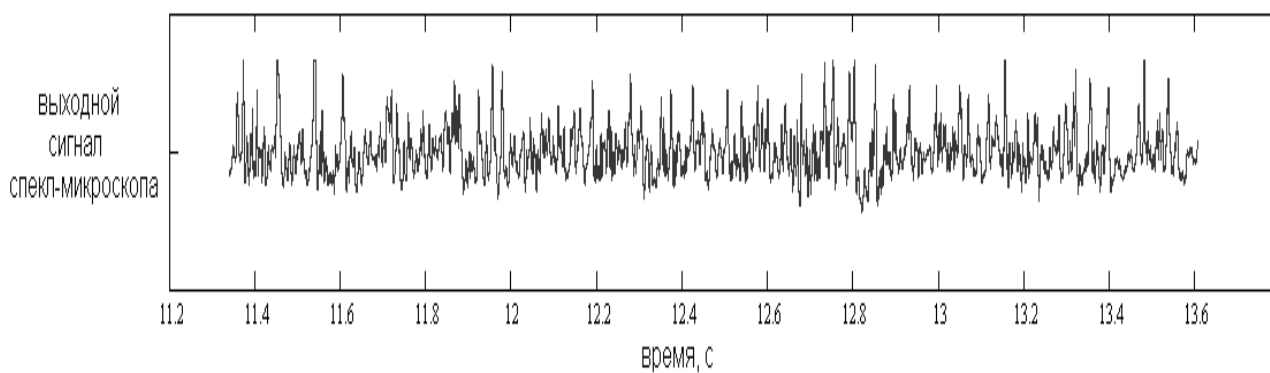
В это время были зарегистрированы спектральные функции флуктуаций интенсивности биоспеклов, вызванные движением крови в микрососуде. Как уже упоминалось, спектральные функции флуктуаций интенсивности биоспеклов, как правило, имеют сложную форму и могут содержать один или несколько локальных максимумов. Характерная реализация выходного сигнала спекл-микроскопа представлена на рисунке 108 а. Спектр флуктуаций интенсивности (соответствующий выходному сигналу, показанному на Рисунке 108 а) приведен на рисунке 108 б.



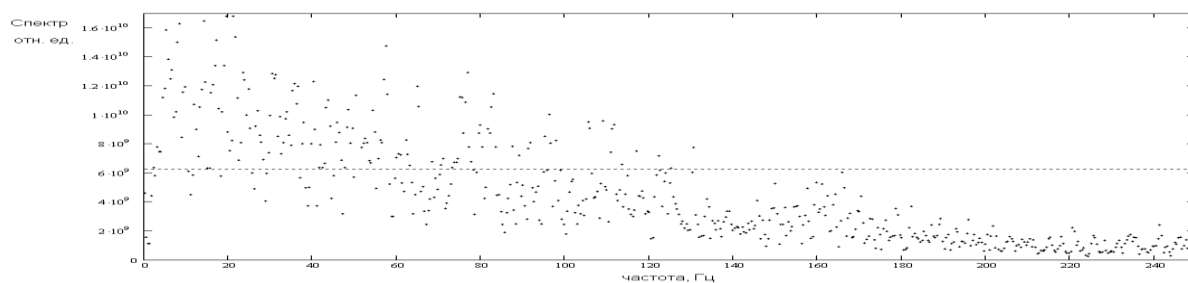
Рисунок 106 – Изображения: общий вид спекл микроскопа и интактной морской свинки (а); брыжейка интактной морской свинки, расположенной на термостабилизированном столике (б)



Рисунок 107 – Изображение уединенного микрососуда брыжейки морской свинки: интактное животное (а); после нанесения взвеси клеток *F. tularensis* 15 (б); после нанесения взвеси клеток *F. tularensis* 15, инактивированных методом ФДВ (в)



а



б

Рисунок 108 – Результаты исследований микрососуда крови брыжейки морской свинки до обработки взвесью бактерий *F. tularensis* 15: типичный выходной сигнал спекл-микроскопа длительностью 2 с (с 11-й по 13-ю с наблюдения) (а) и спектр выходного сигнала спекл-микроскопа (б)



Как показали экспериментальные исследования, при нанесении на брыжейку взвеси клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15, инактивированных методом ФДВ, практически немедленно регистрируются изменения характера кровотока в микрососуде. Кровоток существенно замедлялся, вплоть до полной его остановки. Сосуды при этом переходили в состояние престаза. Такой эффект наблюдали при воздействии вакцинных штаммов, прошедших различные режимы фотоинактивации при различных концентрациях фотосенсибилизатора. Если в норме исследуемому сосуду соответствовала ширина спектра выходного сигнала 160 Гц, то после нанесения фотоинактивированных клеток вакцинного штамма туляремии ширина спектра снижалась до 10 Гц. Это свидетельствует о замедлении кровотока в 16 раз. Динамика кровотока (изменение скорости крови во времени) представлена на рисунке 109 а. Аналогичную динамику демонстрирует среднеквадратическое отклонение *STDEV* выходного сигнала спекл-микроскопа (Рисунок 109 б).

Из рисунка 109 б видно, что кровоток практически полностью останавливается (как правило, это происходит на 10-й с воздействия препарата). Затем, через некоторое время (порядка 5 с), кровоток возобновляется, но приобретает нерегулярный характер. Это также заметно на временных реализациях выходного сигнала спекл-микроскопа (Рисунок 109 в).

Примерно через 5 мин регулярный характер кровотока восстанавливается (Рисунок 109 г), оставаясь при этом замедленным по сравнению с кровотоком в интактном сосуде. Скорость кровотока восстанавливалась до исходных значений через 10 мин после применения препарата. Проведенные эксперименты позволяют сделать заключение о том, что вакцинный штамм *F. tularensis* 15 после фотоинактивации был реактогенным для ткани кровеносных сосудов. Однако эти изменения находились в пределах допустимой нормы, поскольку нарушения микроциркуляции носили обратимый характер – кровоток полностью нормализовался в течение 10 мин.

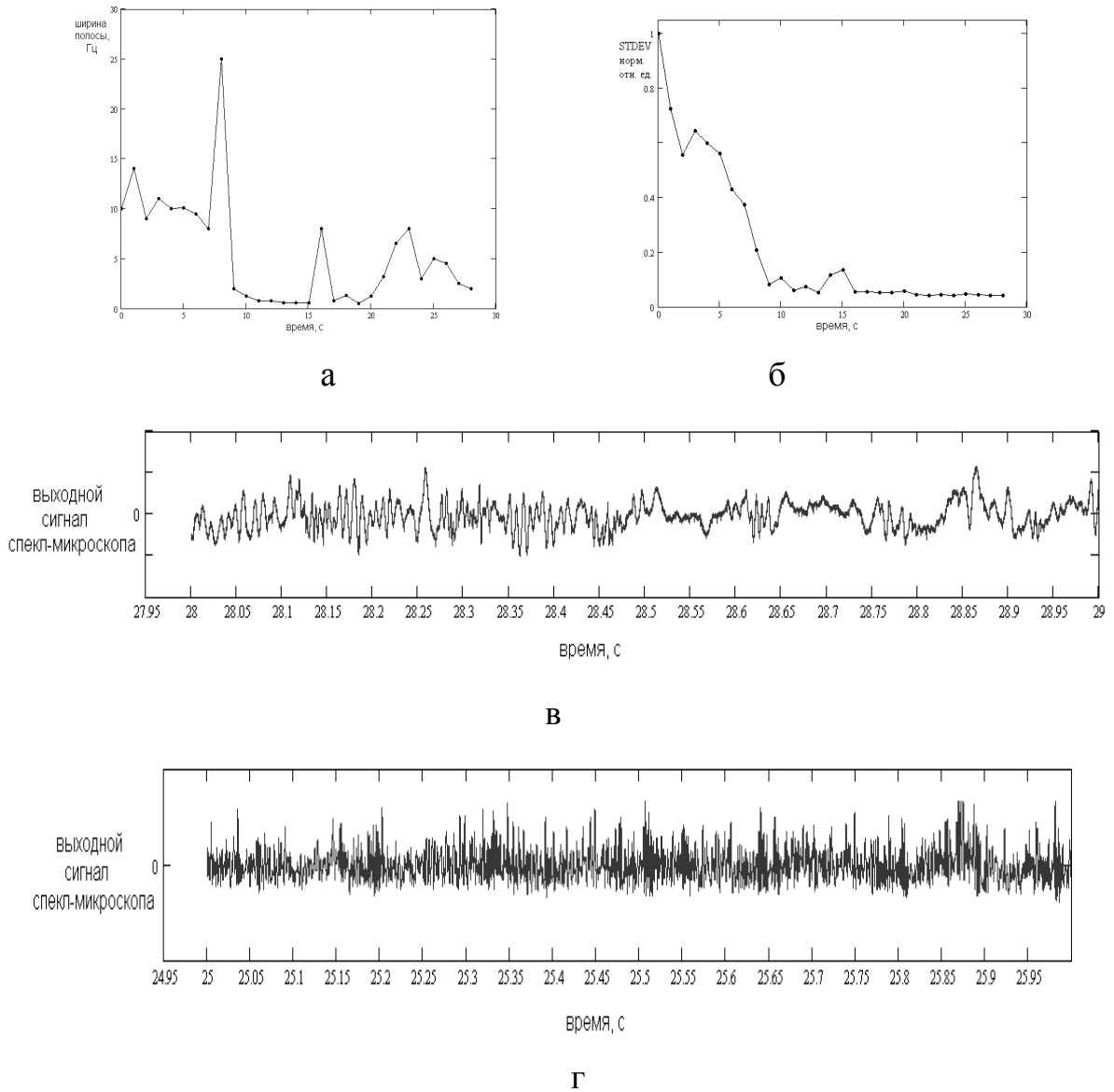


Рисунок 109 – Динамика кровотока в микрососуде после нанесения на брыжейку морской свинки клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15, инактивированных методом ФДВ: временные зависимости ширины полосы частот выходного сигнала спекл-микроскопа (а); временные зависимости среднеквадратичного отклонения  $\sigma$  выходного сигнала спекл-микроскопа (б); выходной сигнал спекл-микроскопа, демонстрирующий нерегулярный характер кровотока с 28-й по 29-ю секунду после аппликации бактериальной взвеси (в); выходной сигнал спекл-микроскопа длительностью 1 с, зарегистрированный через 5 мин после аппликации бактериальной взвеси - регулярность кровотока восстановлена (г)

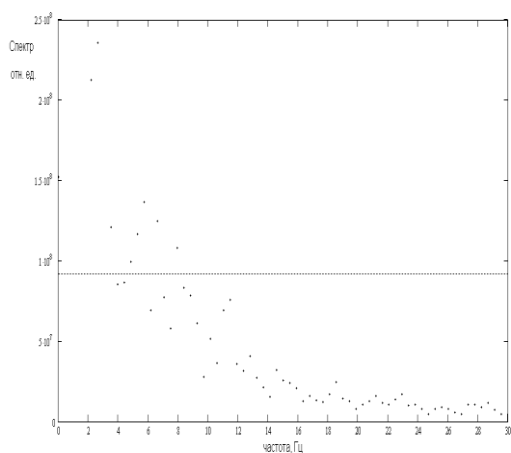
Аппликация взвеси клеток вакцинного штамма *B. abortus* 19 на брыжейку морской свинки вызывала значительное сужение просвета кровеносного микрососуда (Рисунок 110 а-в).



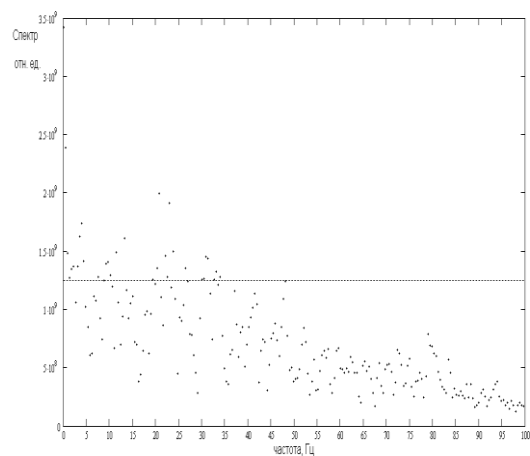
Рисунок 110 – Изображение уединенного микрососуда брыжеки морской свинки: интактное животное (а); после нанесения взвеси клеток *B. abortus* 19 (б); после нанесения взвеси клеток *B. abortus* 19, инактивированных методом ФДВ (в)

Так, например, если ширина спектра выходного сигнала спекл-микроскопа до воздействия инактивированной взвеси клеток *B. abortus* 19 составляла 9 Гц (Рисунок 111 а), то после аппликации клеток, инактивированных методом ФДВ, ширина спектра увеличивалась до 45 Гц (Рисунок 111 б, в), что свидетельствовало о пятикратном увеличении скорости кровотока. Увеличение скорости кровотока происходило из-за значительного сужения просвета сосуда, именно в этом и проявлялась реактогенность фотоинактивированных бактерий вакцинного штамма *B. abortus* 19 на сосудистую ткань. С течением времени ширина спектра и, соответственно, скорость кровотока постепенно снижались (Рисунок 111 г). Исходные показатели кровотока полностью восстанавливались на 5–7-й мин после нанесения фотоинактивированной бактериальной взвеси.

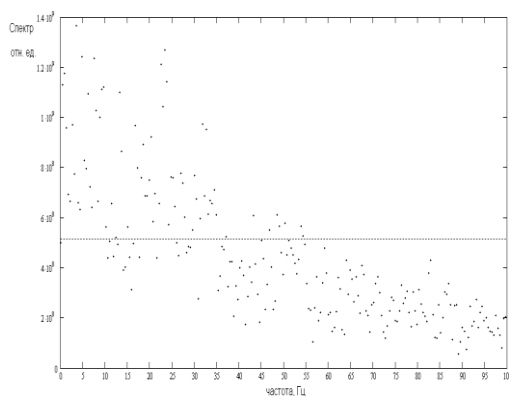
В результате оценки реактогенности фотоинактивированных вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 и *B. abortus* 19 методом спекл-микроскопии высокого пространственного разрешения, зарегистрировано влияние указанных бактерий на



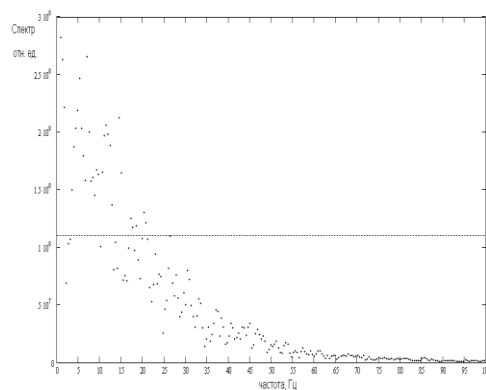
а



б



в



г

Рисунок 111 – Спектры выходного сигнала спекл-микроскопа, отражающие скорость кровотока в микрососуде брыжейки морской свинки: до аппликации клеток *B. abortus* 19 (а); после аппликации фотоинактивированных клеток *B. abortus* 19 через 1 (б), 2 (в) и 3 мин (г) наблюдения. Ширина спектра 9 (а), 45 (б), 40 (в) и 20 Гц (г)

скорость кровотока и состояние микрососудов брыжейки морской свинки. В ходе исследований удалось определить не только продолжительность влияния фотоинактивированных вакцин, но и характер их действия на сосудистую ткань. Аппликация бактерий *F. tularensis* 15 после 6 ч ФДВ приводила к расширению стенок сосуда и выраженному, в 16 раз, замедлению кровотока. Напротив, нанесение на сосуд брыжейки взвеси фотоинактивированных в течение 3 ч клеток *B. abortus* 19

вызывала сужение микрососуда и пятикратное увеличение скорости кровотока. Важно отметить, что вызванные изменения микроциркуляции крови в сосудах брыжейки морских свинок, носили обратимый характер. Кровоток полностью восстанавливался через 5-7 мин или 10 мин, после аппликации на брыжейку фотоинактивированных бактерий *B. abortus* 19 или *F. tularensis* через 15 соответственно.

Таким образом, на данном этапе диссертационных исследований проведено изучение безопасности инактивированных методом ФДВ вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ на морских свинках как традиционными методами, так и модифицированными когерентно-оптическими методами. Экспериментально доказаны безвредность, отсутствие остаточной вирулентности и снижение реактогенности фотоинактивированных вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 на морских свинках методами прижизненных наблюдений, а также по макроскопическим морфологическим показателям. После подкожной инъекции морским свинкам клеток фотоинактивированных вакцинных штаммов животные выживали, температура тела не превышала нормальные значения. Не отмечалось снижения массы тела животных, изменений внутренних органов и тканей, а также роста культуры на плотных питательных средах при их высеве.

С помощью разработанных научно-методических основ применения стандартных биосистем для оценки реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 (на организменном и тканевом уровнях) когерентно-оптическими методами объективно установлено:

- фотоинактивированные бактерии указанных штаммов в течение 40 мин после внутримышечного введения не оказывают влияния на церебральные сосуды морских свинок (установлено методом спекл-имиджинга);

- взвеси бактерий после фотодинамической инактивации вызывают выраженные, но обратимые изменения скорости кровотока в брыжеечных сосудах морской свинки: аппликация клеток *F. tularensis* 15 приводит к расширению стенок сосуда и

замедлению кровотока в 16 раз; аппликация клеток *B. abortus* 19 вызывает сужение микрососудов и пятикратное увеличение скорости кровотока. Восстановление нормального кровотока зарегистрировано через 5-10 мин (установлено методом спекл-микроскопии).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог вышеизложенному материалу, можно сделать вывод о том, что в настоящее время уделяется большое внимание повышению безопасности высокоиммуногенных вакцин. Применение более 60 лет лицензированных живых вакцин *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *Y. pestis* EV НИИЭГ привело к сдерживанию инфекционных болезней, значительному снижению смертности. Однако за длительный период их использования выявлен ряд недостатков связанных с проявлениями реактогенности некоторых штаммов-продуцентов, случаями осложнений при массовой иммунизации населения. Следует также учитывать увеличение числа лиц, страдающих вторичными иммунодефицитными состояниями и имеющих противопоказания к введению живых вакцин. Таким образом, для проведения массовой, а при необходимости и экстренной иммунизации населения и сельскохозяйственных животных необходимы не только высокоиммуногенные, но и безопасные лицензированные профилактические препараты.

Учитывая актуальность рассматриваемой проблемы целью работы явилось теоретико-экспериментальное обоснование методологии повышения безопасности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *Y. pestis* EV НИИЭГ с использованием фотодинамического воздействия и оценка ее эффективности по показателям безвредности, остаточной вирулентности и реактогенности.

В 3 главе дано описание разработки и создания лабораторной установки для инактивации бактерий методом фотодинамического воздействия. Компактные размеры установки позволяют проводить инактивацию в стерильных условиях бокса биологической безопасности и получать за один сеанс облучения препаративное количество (38,4 мл) бактериальной взвеси, которую можно использовать для проведения микробиологических, серологических и биологических исследований.

В ходе разработки условий фотодинамической инактивации использовали разные концентрации ( $1 \cdot 10^5$ ;  $1 \cdot 10^7$ ;  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл) бактериальных взвесей *E. coli* B6, *E. coli* K12, *E. coli* O1 и *P. aeruginosa* 27533; фотосенсибилизатора (0,0005 – 0,05 %); меняли источники излучения (лазерные диоды с длиной волны 650 нм, световые диоды –  $650 \pm 10$  нм); плотность мощности излучения (1, 3, 5 мВт/см<sup>2</sup>), а также время ФДВ от 5 до 2 – 0 мин. Установлено, что на колониеобразующую способность разных штаммов бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa* оказывает влияние совокупность факторов: концентрация бактериальной взвеси, количество фотосенсибилизатора, плотность мощности излучения и время фотодинамического воздействия.

Впервые, с использованием компьютерного моделирования на основе разработанной теоретико-вероятностной модели воздействия синглетного кислорода на бактериальные клетки, определен размер области эффективного воздействия синглетного кислорода на клеточную мембрану бактерий, который близок к диаметру клетки.

Разработаны математические модели взаимодействия бактериальных взвесей *E. coli*, *P. aeruginosa* разных штаммов с оптическим излучением. Показано, что эффективная инактивация происходит при обработке бактериальных взвесей в концентрации  $10^9$  м.к./мл излучением световых диодов с длиной волны  $\lambda = 650 \pm 10$  нм, плотностью мощности излучения 1 мВт/см<sup>2</sup> и концентрацией фотосенсибилизатора метиленового синего 0,005 %. Бактерии штаммов *P. aeruginosa* 27533 и *P. aeruginosa* 27853 не утратили колониеобразующую способность после длительного фотодинамического воздействия в выбранных условиях. Скорее всего, это связано с облигатной аэробностью, мощной антиоксидантной защитой и наличием монооксидаз (окислительных ферментов), что является общей особенностью всех псевдомонад (Маянский, 1999). Микроскопический анализ клеток *P. aeruginosa* 27533 и 27853, после ФДВ не выявил изменений тинкториальных и морфологических свойств клеток



Полная потеря жизнеспособности доказана для клеток *E. coli* B6, *E. coli* O1, *E. coli* K12 при фотодинамическом воздействии в течение 60 мин.

Глава 4 посвящена проведению фотодинамической инактивации бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ с целью повышения их безопасности. На первом этапе исследований проверяли культурально-морфологические, биохимические и тинкториальные свойства культур для подтверждения типичных свойств штаммов. Предварительную фотодинамическую инактивацию проводили на созданной установке, в состав которой входили красные светодиоды ( $\lambda_0 = 650 \pm 10$  нм), плотность мощности излучения составляла  $I = 1, 3$  и  $5$  мВт/см<sup>2</sup>. В качестве фотосенсибилизатора использовали растворы МС в концентрациях 0,0005; 0,005; 0,05 %; время взаимодействия меняли от 5 до 60 мин. Параллельно с опытными исследованиями, проводили контрольные, учитывая воздействие на бактерии только фотосенсибилизатора или светодиодного излучения. После разработки математических моделей взаимодействия бактериальных взвесей *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ с оптическим излучением, проведена идентификация параметров предложенных моделей. Согласно результатам компьютерного моделирования, инактивация более 99 % клеток *B. abortus* 19 ВА происходит после 6 мин облучения, *F. tularensis* 15 НИИЭГ – после 5 мин и *Y. pestis* EV - после 11 мин при следующих условиях ФДВ:  $I = 1$  мВт/см<sup>2</sup>, концентрация МС = 0,005 %. Однако в *in vitro* эксперименте бактерии вакцинного штамма EV сохраняли колониобразующую способность даже после 360 мин фотодинамического воздействия. На наш взгляд, отсутствие полной инактивации клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ методом ФДВ, возможно, связано с определенной устойчивостью чумного микроба к фотовоздействию в выбранных режимах, несмотря на то что, по результатам математического моделирования мы должны были получить полностью инактивированные клетки, не способные к образованию колоний. С другой стороны, в результате взаимодействия лазерного излучения с

компонентами цепи переноса электронов происходит восстановление ферментов-переносчиков в дыхательной цепи и падение трансмембранного потенциала митохондрий. Световое излучение приводит к реактивации ферментов, таких как цитохромоксидаза, восстанавливает поток электронов в дыхательной цепи и увеличивает трансмембранный потенциал. Как следствие, повышается внутриклеточная концентрация  $Ca^{2+}$  и увеличивается продукция АТФ. Упомянутые явления стимулируют внутриклеточные процессы (Кару, 1989; Pastore et al., 1994). Общеизвестна потребность прокариот, в том числе и штаммов чумного микроба в ионах кальция, проявляющуюся при температуре 37 °С (Higuchi et al., 1959; Домарадский, 1993). Вероятно, при ФДВ на клетки вакцинного штамма чумного микроба, происходит не только активация ПОЛ, вызывающая нарушение структуры клеточных мембран, но и активация АО системы, а также стимуляция роста клеток ионами  $Ca^{2+}$ . В перспективе изучение упомянутых процессов, представляет интерес. В гемагглютинационном тесте по выявлению капсульного антигена в бактериальных взвесах вакцинного штамма *Y. pestis* EV до и после обработки методом ФДВ отмечалась положительная реакция.

Полная потеря жизнеспособности клеток вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА происходит после 180 мин и *F. tularensis* 15 НИИЭГ - 360 мин ФДВ. С помощью электронной микроскопии инактивированных бактерий *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ выявлено незначительное увеличение размеров клеток, тинкториальные свойства не изменились. В реакциях агглютинации и непрямой гемагглютинации выявлено сохранение у бактерий *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ после ФДВ активности диагностически значимых антигенов.

Исследования 5 главы посвящены оценке безвредности, остаточной вирулентности и реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после ФДВ на морских свинках регламентированными методами, а также когерентно-оптическими, с использованием разработанных установок, включающих биосистемы «бактерии-макроорганизм».

Установлено, что температура тела и масса животных после введения фотоинактивированных взвесей бактерий вакцинных штаммов бруцеллеза или туляремии были в пределах нормы, не отмечено гибели животных; при вскрытии изменений внутренних органов и тканей не выявлено, рост исследуемых бактерий на питательных средах в мазках отпечатках из органов отсутствовал.

Оценку реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после ФДВ проводили на морских свинках на тканевом и организменном уровнях методами спекл-микроскопии и спекл-имиджинга. В предварительных экспериментах была доказана неинвазивность использованных когерентно-оптических методов.

Методом спекл-микроскопии показано, что аппликация бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ после ФДВ на брыжейку морской свинки приводила к расширению стенок сосуда и замедлению кровотока в 16 раз, восстановление кровотока регистрировали через 5 мин. Нанесение взвеси клеток *B. abortus* 19 ВА после ФДВ вызывало сужение микрососудов и пятикратное увеличение скорости кровотока; через 10 мин кровотоки полностью восстанавливались.

Методом спекл-имиджинга установлено, что изменений топологии церебральных сосудов в течение 40 мин после введения указанных бактерий не зарегистрировано.

Таким образом, разработаны фундаментальные основы новой методологии повышения безопасности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, включающие фотодинамическую инактивацию бактерий, создание математической модели условий воздействия для каждого штамма и оценку их безопасности.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны фундаментальные основы новой методологии повышения безопасности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, включающей фотодинамическую инактивацию бактерий, создание математических моделей, оптимизацию условий воздействия для каждого штамма и методику оценки их безопасности.

2. Создана компактная лабораторная установка для инактивации бактерий методом фотодинамического воздействия, позволяющая изменять условия инактивации: концентрацию бактериальной взвеси, количество фотосенсибилизатора, источники излучения, плотность мощности излучения; длительность проведения фотодинамического воздействия для конкретных вакцинных штаммов; получать за один сеанс облучения в стерильных условиях бокса биологической безопасности препаративное количество (38,4 мл) бактериальной взвеси для дальнейших микробиологических, серологических и биологических исследований.

3. Экспериментально показана возможность проведения фотодинамической инактивации взвесей бактерий *E. coli* разных штаммов, *P. aeruginosa* 27533, *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ на созданной лабораторной установке. Установлено влияние на колониобразующую способность разных штаммов бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa*, вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ совокупности факторов: концентрации бактериальной взвеси, количества фотосенсибилизатора, плотности мощности излучения и времени фотодинамического воздействия.

4. Доказано, что эффективная инактивация происходит при обработке бактериальных взвесей в концентрации  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл излучением световых диодов с длиной волны  $\lambda = 650 \pm 10$  нм, плотностью мощности излучения  $1 \text{ мВт/см}^2$  и концентрацией фотосенсибилизатора метиленового синего 0,005 %. Доказана полная

потеря жизнеспособности клеток *E. coli* B6, *E. coli* O1, *E. coli* K12 при фотодинамическом воздействии в течение 60 мин, вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА - 180 мин и *F. tularensis* 15 НИИЭГ - 360 мин; при сохранении морфологических и тинкториальных свойств бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ и комплекса их антигенов, определяемых коммерческими диагностическими препаратами.

5. Впервые определен размер области эффективного воздействия синглетного кислорода на клеточную мембрану бактерий с использованием компьютерного моделирования на основе разработанной теоретико-вероятностной модели воздействия синглетного кислорода на бактериальные клетки.

6. Разработаны математические модели взаимодействия бактериальных взвесей разных штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ с оптическим излучением, проведена идентификация параметров предложенных моделей. В результате оптимизации определены наиболее эффективные условия фотодинамической инактивации. Проведена верификация найденных условий в *in vitro* эксперименте.

7. Экспериментально доказаны безвредность, отсутствие остаточной вирулентности и снижение реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ после фотодинамической инактивации на морских свинках методами прижизненных наблюдений, а также по макроскопическим морфологическим показателям: температура и масса тела были в пределах нормы, гибели животных не отмечено; при вскрытии не выявлено изменений внутренних органов и тканей, отсутствие роста исследуемых бактерий в мазках отпечатках из органов.

8. Впервые на морских свинках проведена оценка реактогенности на тканевом и организменном уровнях вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после фотодинамической инактивации с использованием разработанных установок, включающих биосистемы «бактерии-макроорганизм» и

регистрации результатов методами спекл-микроскопии и спекл-имиджинга; доказана неинвазивность использованных когерентно-оптических методов.

9. Показано, что взвеси бактерий после фотодинамической инактивации вызывают выраженные, но обратимые изменения скорости кровотока в брыжеечных сосудах морской свинки: аппликация клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ приводила к расширению стенок сосуда и замедлению кровотока в 16 раз, а нанесение клеток *B. abortus* 19 ВА вызывало сужение микрососудов и пятикратное увеличение скорости кровотока. Восстановление нормального кровотока зарегистрировано через 5-10 мин. Изменений топологии церебральных сосудов в течение 40 мин после внутримышечного введения указанных бактерий не зарегистрировано.

**Список принятых в работе сокращений**

$I$  – плотность мощности излучения

$P$  – мощность излучения

$\lambda$  – длина волны

АО – антиоксидантная система

ЖВ – живая вакцина

КОЕ – колониеобразующие единицы

ЛД – лазерные диоды

ЛИ – лазерное излучение

м.к. – микробные клетки

МП – микропланшет

МС – метиленовый синий

НИЛИ – низкоинтенсивное лазерное излучение

НКС – нормальная кроличья сыворотка

ПОЛ – перекисное окисление липидов

РА – реакция агглютинации

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

$C$  – концентрация метиленового синего

СД – световые диоды

УФИ – ультрафиолетовое излучение

УФО – ультрафиолетовое облучение

ФДВ – фотодинамическое воздействие

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абортотенные и антигенные свойства антибиотикорезистентных вариантов штамма *B. abortus* 82 / А. М. Фомин [и др.] // Ветеринарный врач. – 2006. – № 1. – С. 18–20.
2. Авилов, В. М. Бруцеллез животных и его специфическая профилактика / В. М. Авилов, В. В. Селиверстов // Ветеринария. – 1997. – № 7. – С. 3–13.
3. Авилов, В. М. Эпизоотологический надзор при бруцеллезе крупного рогатого скота в современных условиях : автореф. дис. ... д-а вет. наук / В. М. Авилов. – СПб., 1977. – 49 с.
4. Ада, Г. Вакцины, вакцинация и иммунный ответ / Г. Ада, А. Рамсей. – М. : Медицина, 2002. – 344 с.
5. Аденозин трифосфатная активность эритроцитарных мембран крыс во время применения низко-интенсивных лазеров / Е. Н. Панасюк [и др.] // Вопросы курортологии физиотерапии лечения физической культуры. – 1987. – № 2. – С. 8.
6. Аналитическая справка по инфекционной заболеваемости в государствах-участниках СНГ за 2010 г. – Режим доступа : <http://www.microbe.ru/kspp/analitic2>.
7. Анисимов А. П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1 / А. П. Анисимов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2002. – № 3. – С. 8–23.
8. Анисимов, А. П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 2 / А. П. Анисимов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2002. – № 4. – С. 3–11.



9. Антибактериальная фотодинамическая терапия при хроническом тонзиллите у детей / С. А. Наумов [и др.]. – Режим доступа : [http://altermed.com.ua/lib\\_156-6739.html](http://altermed.com.ua/lib_156-6739.html).
10. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности. СП 1.2.011-94. Санитарные правила. – М., 1994.
11. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами. СП 1.2.731-99. Санитарные правила. – М., 1999.
12. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08. – Режим доступа : <http://www.opengost.ru>.
13. Бендат, Дж. Прикладной анализ случайных данных / Дж. Бендат, А. Пирсол. – М. : Мир, 1989. – 540 с.
14. Биотехнология / под ред. А. А. Баева. – М., 1984. – 376 с.
15. Большой энциклопедический словарь. Биология / Гл. ред. М. С. Гиляров. – М. : Большая российская энциклопедия, 1999. – 864 с.
16. Брайцев, А. В. Лечение больных с ограниченными формами нейродермита и экземы ионофорозом метиленового синего / А. В. Брайцев, В. М. Желтаков // Вестник дерматологии и венерологии. – 1973. – № 7. – С. 73–76.
17. Бриль, Г. Е. Модификация лазерным излучением лимфоконстрикторного действия стафилококкового токсина / Г. Е. Бриль, Е. И. Захарова (Галанжа) // Лазерная техника и оптоэлектроника. – 1992. – № 1–2. – С. 36–39.
18. Бруцеллез / П. Н. Жованик [и др.]. – Киев : Ураджай, 1975. – 221 с.
19. Бруцеллез : метод. рекомендации по диагностике, лечению и реабилитации больных. – М., 1987. – 28 с.
20. Буткин, Е. И. Бруцеллез // Эпизоотология с микробиологией / Е. И. Буткин ; под ред. И. А. Бакулова. – М. : Колос, 1981. – С. 145–152.

21. Вакцины и вакцинация : национальное руководство / под ред. В. В. Зверева, Б. Ф. Семенова, Р. М. Хаитова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 880 с.
22. Вакцины против бруцеллеза крупного рогатого скота / К. В. Шумилов [и др.] // Ветеринария. – 1984. – № 6. – С. 26–28.
23. Вакцины, поствакцинальные реакции и функциональное состояние организма привитых / Г. К. Гапачко [и др.]. – Уфа, 1986. – 200 с.
24. Вершилова П. А. Профилактика инфекции живыми вакцинами / П. А. Вершилова // Бруцеллез. – М. : Медгиз, 1960. – 270 с.
25. Вершилова, П. А. Бруцеллез в СССР и пути его профилактики / П. А. Вершилова, А. А. Голубева. – М. : Медицина, 1970. – 189 с.
26. Вершилова, П. А. Бруцеллез / П. А. Вершилова. – М., 1972. – 439 с.
27. Вершилова, П. А. Бруцеллез / П. А. Вершилова [и др.]. – М., 1975. – 297 с.
28. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю. А. Владимиров // Соросовский Образовательный Журнал. – 2000. – Т. 6. – № 12. – С. 13–19.
29. Владимиров, Ю. А. Лазерная терапия: настоящее и будущее / Ю. А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 12. – С. 1–8.
30. Владимиров, Ю. А. Физико-химические основы фотобиологических процессов / Ю. А. Владимиров // Гидробиологический журнал. – 1989. – Т. 15. – Вып. 5. – С. 64.
31. Воробьев, А. А. Адьюванты (неспецифические стимуляторы иммуногенеза) / А. А. Воробьев, Н. Н. Васильев. – М. : Медицина, 1969. – 206 с.
32. Воробьев, А. А. Оценка вероятности использования биоагентов в качестве биологического оружия / А. А. Воробьев // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2001. – № 6. – С. 54–56.
33. Воробьев, А. А. Проблемы микробиологической безопасности на современном этапе. Вакцинация / А. А. Воробьев // Биотерроризм. – 2002а. – №3 (21). – С. 12–18.

34. Восканян, К. Ш. Некоторые общие закономерности действия ионизирующих и лазерных излучений на клетки бактерий : автореферат дис. ... д-ра биол. наук / К. Ш. Восканян. – Обнинск, 2003. – 42 с.
35. Генетические вакцины / А. Л. Гинцбург [и др.] // Вестник Российской Академии медицинских наук. – 2005. – № 1. – С. 14–19.
36. Геномика и генная инженерия: рациональные подходы для разработки новых средств борьбы с туберкулезом / А. Л. Гинцбург [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2004. – № 4. – С. 94–101.
37. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – Москва : Мир, 2002. – 589 с. – ISBN 5030033289.
38. Глонти, Т. М. Аллергическое состояние овец, привитых разными вакцинами против бруцеллеза / Т. М. Глонти // Тр. ВГНКИ. – М., 1973. – Вып. 19. – С. 84–88.
39. Гремякова, Т. А. Сравнительная характеристика препаратов капсульного антигена F1 *Yersinia pestis*, полученных из штаммов-продуцентов с различной структурой липополисахаридов / Т. А. Гремякова [и др.] // ЖМЭИ. – 1994. – № 3. – С. 10–14.
40. Гремякова, Т. А. Структурно-функциональная вариабельность антигенов *Yersinia pestis* и методология конструирования противочумных иммунопрофилактических препаратов : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Т. А. Гремякова. – М., 2004. – 36 с.
41. Григорьева, Г. И. Применение иммуноферментного анализа для определения противобруцеллезных антител в сыворотке крови крупного рогатого скота / Г. И. Григорьева, А. А. Улицкая // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1990. – № 2. – С. 86–91.
42. Дебабов, В. Г. ДНК-вакцинация и генотерапия на основе транзитной экспрессии нуклеиновых кислот в соматических клетках человека и животных / В. Г. Дебабов // Молекулярная биология. – 1997. – Т. 31. – С. 209–215.

43. Девдариани, З. Л. Перспективы создания экспериментальных антиидиотипических вакцин против чумы / З. Л. Девдариани, В. А. Федорова // Иммунология. – 2006. – № 3. – С. 144–148.
44. Девятков, Н. Д. Использование когерентных волн в медицине и биологии / Н. Д. Девятков, О. В. Бецкий, М. Б. Голант // МИС-РТ. – 1998. – Сб. № 22. – С. 1–12.
45. Действие низко-интенсивного лазерного излучения на функциональный потенциал лейкоцитов / Г. И. Клебанов [и др.] // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 1997. – № 4. – С. 8.
46. Дженкинс, Г. Спектральный анализ и его приложения / Г. Дженкинс, Д. Ваттс. М. : Мир, 1971. – Вып. 1. – 300 с.
47. Диксон, М. Ферменты: в 3 т. / М. Диксон, Э. Уэбб. – М. : Мир, 1982. – Т. 1. – 195 с., Т. 2. – 209 с., – Т. 3. – 172 с.
48. ДНК-вакцины: современное состояние и перспективы / Р. М. Хаитов [и др.] // Иммунология. – 2007. – № 2. – С. 114–123.
49. Домарадский, И. В. Чума: современное состояние, гипотезы, проблемы / И. В. Домарадский. – Саратов, 1993. – 132 с.
50. Домарадский, И. В. Проблемы патогенности франсиселл / И. В. Домарадский // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 1. – С. 106–110.
51. Домнин, С. Г. К оценке возможного влияния изменений климата на здоровье населения / С. Г. Домнин, М.Н. Корсак // сборник. матер. Междунар. семинара (5–6 апреля 2004 ). – М. : Адамант, 2004. – С. 199–201.
52. Дробков, В. И. Проблемы и перспективы разработки и внедрения генотерапевтических препаратов и ДНК-вакцин / В. И. Дробков, И. В. Маракулин, Я. А. Кибирев // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2010. – № 1. – С. 35–40.

53. Дятлов, А. И. Влияние антропогенных и природных факторов на эколого-эпидемиологическую обстановку при ряде зоонозных инфекций на Северном Кавказе / А. И. Дятлов, Г. М. Грижебовский, В. Й. Ефременко // Журн. микробиол. – 2002. – № 6. – Приложение. – С. 59–61.
54. Жаботинский, М. Е. Квантовая электроника. Маленькая энциклопедия / М. Е. Жаботинский. – М. : СЭ, 1969. – 432 с.
55. Желудков, М. М. Бруцеллез в России: современная эпидемиология и лабораторная диагностика : дис. ... д-ра мед. наук / Желудков М. М. – М., 2009. – 268 с.
56. Желудков, М. М. Лабораторная диагностика бруцеллеза : учеб. пособие / М. М. Желудков, М. И. Чернышева, И. В. Власова ; Центр. ин-т усоверш. врачей. – М. : ЦОЛИУВ, 1988. – 42 с.
57. Живая туляремийная вакцина Nik-sp. *Francisella tularensis* // Пат. 2308969 Россия, МПК {7} А61К 39/02, А61К 35/74. ООО БИОТЭК. № 2006121120/15 / Кисличкин Н.Н.; заявл. 16.06.06; опубл. 27.10.07, Бюл. № 30.
58. Жуков-Вережников, Н. Н. Иммунология чумы / Н. Жуков-Вережников. – М. : Л. : Медгиз, 1940. – 266 с.
59. Заболеваемость зооантропонозными и природноочаговыми инфекциями и меры по их профилактике / Г. Г. Онищенко [и др.] // ЖМЭИ. – 1999. – № 4. – С. 14–18.
60. Задачи противодействия биологическим угрозам на современном этапе / Г. Г. Онищенко [и др.] // Материалы IX Всерос. науч.-практ. общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. В 3 т. – Т. 3. – М. : Санэпидмедиа, 2007. – С. 129–130.
61. Защитные свойства внешних мембран *Francisella tularensis* при экспериментальной инфекции морских свинок / В. С. Хлебников [и др.] // ЖМЭИ. – 1994. – № 1. – С. 84–88.

- 62.Изменение последовательности адениловых нуклеотидов в бактериальных клетках *E. coli* 1257 под действием низкоинтенсивного He-Ne лазера / Н. А. Романова [и др.] // Биохимия. – 1993. – № 3. – С. 84.
- 63.Изменение спектра поглощения монослоя живых клеток под действием низкоинтенсивное лазерного излучения / Т. И. Кару [и др.] : докл. Акад. наук. – 1998. – Май. – С. 70.
- 64.Изыскание и результаты применения новых препаратов для специфической профилактики бруцеллеза крупного рогатого скота / А. В. Иванов [и др.] // Ветеринарный врач. – 2006. – № 1. – С. 14–18.
- 65.Ильина, А. А. Новые приборы и метод измерений. Светофильтры для ближней инфракрасной части спектра / А. А. Ильина // Успехи физических наук. – 1946. – Т. XXIX. – Вып. 3–4. – С. 359–366.
- 66.Иммунологическая активность химической чумной вакцины, стерилизованной различными способами / С. М. Дальвадянц [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – Саратов, 1997. – № 2. – С. 69–73.
- 67.Иммунопрофилактика / под ред. В. К. Таточенко, Н. А. Озерецковского. – М., 2001. – 176 с.
- 68.Инструкция по применению диагностикума эритроцитарного бруцеллезного иммуноглобулинового жидкого / НИПЧИ. – Режим доступа : <http://snipchi.ru>.
- 69.Инструкция по применению диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового сухого. – Режим доступа : <http://www.medsovet.info>.
- 70.Инструкция по применению диагностикума эритроцитарного чумного иммуноглобулинового жидкого / НИПЧИ. – Режим доступа : <http://snipchi.ru>.
- 71.Инструкция по применению систем индикаторных бумажных для идентификации микроорганизмов (СИБ). – ФСП 42-0100-3827-03 ГОСТ 18589-73. – М., 1973.

72. Инфекционная заболеваемость в России за 2010 г. – Режим доступа: <http://www.carnivorousplant.info/fauna/31150-infekcionnaya-zabolevaemost-v-rossii-za-2010-g.html>.
73. Калмыков, В. В. Методы проверки иммуногенности противобруцеллезных вакцин / В. В. Калмыков // Тезисы докладов. Научно-практическая конференция. – Новосибирск, 1995. – С. 94–95.
74. Кару, Т. Й. Фотобиология регуляции метаболизма клетки низкоинтенсивным видимым светом / Т. Й. Кару // Сообщение НИ центра по технологическим лазерам АН СССР. – Троицк, 1985. – № 8. – С. 1–54.
75. Клебанов, Г.И. Клеточные механизмы прайминга и активации фагоцитов / Г.И. Клебанов, Ю.А. Владимиров // Успехи современной биологии. – 1999. – № 5. – С. 462-474.
76. Клебанов, Г.И. Молекулярно-клеточные механизмы лазерной и антиоксидантной терапии ран // В кн. Антиоксиданты и лазерное излучение в терапии ран и трофических язв // М: Издательский дом «Эко». - 2001. -С.7-10
77. Клебанов, Г. И. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на пероксидацию мембранных липидов и концентрацию ионов кальция в цитозоле фагоцитов / Г. И. Клебанов, Т. В. Чичук, Ю. А. Владимиров // Биологические мембраны. – 2001. – Т. 18. – № 1. – С. 42–50.
78. Клебанов, Г. И. Молекулярно-клеточные механизмы лазерной и антиоксидантной терапии ран / Г. И. Клебанов // Антиоксиданты и лазерное излучение в терапии ран и трофических язв. – М. : Эко, 2001. – С. 7–101.
79. Книрель, Ю. А. В борьбе за контролем над чумой. Прошлое и настоящее «черного мора» / Ю. А. Книрель, В. А. Федорова, А. П. Анисимов // Вестник РАН. – 2011. – Т. 80. – № 1. – С. 11–10.
80. Кобзарь, А. И. Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников / А. И. Кобзарь. – М. : ФИЗМАТЛИТ, 2006. – 816 с.

81. Козлов, В. И. Лазеротерапия / В. И. Козлов, В. Н. Буйлин. – М. : Медицина, 1993. – 149 с.
82. Козлов, В. И. Лазеротерапия с применением АЛТ «МУСТАНГ» / В. И. Козлов, В. А. Буйлин. – М. : Техника, 1998. – 148 с.
83. Комитет экспертов ФАО/ВОЗ по бруцеллезу. Шестой доклад. – Женева. Всемирная организация здравоохранения, 1986. – Режим доступа: <http://www.who.int/csr/delibepidemics/en/Annex3Ru.pdf>
84. Коробкова, Е. И. Живая противочумная вакцина (Теория и практика иммунопрофилактики чумы) / Е. И. Коробкова. – М. : Медгиз, 1956. – 207 с.
85. Коробкова, Е. И. Иммунизация против легочной чумы живой вакциной / Е. И. Коробкова, А. А. Крайнова // Вестник микробиологии, эпидемиологии, паразитологии. – 1939. – Т. 18. – С. 223–235.
86. Королев, Ю. Н. Характерное действие низко-интенсивного лазерного излучения на ультраструктуру кардиомиоцитов / Ю. Н. Королев, М. С. Гениатулина // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры. – 1997. – № 6. – С. 5–7.
87. Коротяев, А. И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология : учебник для мед. вузов. – 3-е изд. / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев. – СПб. : СпецЛит, 2002. – 591 с.
88. Косилов, И. А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных / И. А. Косилов // Новосибирск, 1992. – 260 с.
89. Красавин, Е. А. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ / Е. А. Красавин, С. Козубек. – М. : Энергоатомиздат, 1991. – 183 с.
90. Красновский, А. А. мл. Синглетный молекулярный кислород и первичные механизмы фотодинамического действия оптического излучения. Итоги науки и техники / А. А. Красновский мл. // Современные проблемы лазерной физики. – 1990. – Т. 3. – С. 63–135.



- 91.Красновский, А. А. мл. Фотодинамическое действие и синглетный кислород / А. А. Красновский мл. // Биофизика. – 2004. – Т. 49. – Вып. 2. – С. 305–321.
- 92.Кутырев, В. В. Современное состояние проблемы совершенствования средств вакцинопрофилактики чумы / В. В. Кутырев, А. А. Бывалов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 2. – С. 97–104.
- 93.Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / под ред Г. Г. Онищенко, В. А. Кутырева. – М. : Медицина, Шико, 2009. – 472 с.
- 94.Лазерная фотохимиотерапия микробной экземы / А. А. Данилов [и др.] // Вестник дерматологии. – 1991. – № 3. – С. 24–25.
- 95.Лазерная фотохимия микробной экземы / А. А. Данилова [и др.] // Вестник дерматологии. – 1991. – № 3. – С. 24–26.
- 96.Майский, И. Н. Иммунология туляремии / И. Н. Майский. – М.: Изд-во АМН СССР, 1953. 186 с.
- 97.Марданов Р. Микробы под прицелом / Р. Марданов // Российская газета. – 2004. – № 3419.
- 98.Марешаль, А. Структура оптического изображения. Дифракционная теория и влияние когерентности света / А. Марешаль, М. Франсон ; пер. с фр. Н. Н. Губеля, под ред. Г. Г. Слюсарева. - М. : Мир, 1964. – 295 с.
- 99.Марьяновская Т., Митрикова Л., Тимченко О. Случаи туляремии среди жителей Москвы // Врач. – 2007. – № 12. – С. 79–80.
100. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – М. : Новая Волна, 2005. – Т. 2. – С. 462.
101. Маянский, А. Н. Микробиология для врачей / А. Н. Маянский. – Нижний Новгород : НГМА, 1999. – 475 с. (С. 122–130).
102. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / под ред. акад. РАМН А. А. Воробьева. – М. : МИА (медицинское информационное агенство), 2004. – 688 с.

103. Медуницын, Н. В. Вакцинология / Н. В. Медуницын. – 2-е изд. ; перераб. и доп. – М. : Триада–Х, 2004. – 448 с.
104. Мельниченко, П. И. Военная гигиена и военная эпидемиология : учебник для студентов медицинских вузов / П. И. Мельниченко, П. И. Огарков, Ю. В. Лизунов. – М. : Медицина, 2006. – 400 с.
105. Мировая статистика здравоохранения ВОЗ, 2010 ВОЗ. – Режим доступа : [http://www.who.int/whosis/whostat/RU\\_WHS10\\_Full.pdf](http://www.who.int/whosis/whostat/RU_WHS10_Full.pdf).
106. Модуляция иммунобиологических свойств чумных вакцинных препаратов монофосфориллипидом А / Т. А. Гремякова [и др.] // Биотехнология. – 1997. – № 11–12. – С. 18–31.
107. Морфо- и патогенез повреждений злокачественных опухолей при фотодинамической терапии / Е. А. Коган [и др.] // Архив патологии. – 1993. – № 6. – С. 73–76.
108. Методические указания. Порядок уничтожения непригодных к использованию вакцин и анатоксинов. МУ 3.3.2.1764-03. – М. : Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава РФ, 2004. – Режим доступа : <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=EXP;n=339255>.
109. Наумов, А. В. Иммунология чумы / А. В. Наумов, М. Ю. Ледванов, И. Г. Дроздов. – Саратов, 1992. – 172 с.
110. Низкоинтенсивное действие лазерного излучения на состояние протеинов крови / В. М. Генкин [и др.] // Бюл. экспер. биол. мед. – 1989. – № 8. – С. 90.
111. Николаев, Н. И. Чума (клиника, диагностика, лечение и профилактика) / Н. И. Николаев. – М., 1968. – 236 с.
112. О влиянии ирригационных работ на ландшафты и структуру экосистем природно-очаговых инфекций в Калмыцкой АССР / П.С. Денисов [и др.] // Эпизоотол. и профилактика чумы и холеры. – Саратов, 1983. – С. 67–72.
113. О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения : [Федер. закон, принят Гос. Думой 30 марта 1999 г. N 52-ФЗ] // СПС «Гарант».

114. О совершенствовании организации и проведения мероприятий по профилактике чумы : Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 08 мая 2008 г. № 152 // СПС «Гарант».
115. Об усилении мероприятий по профилактике заболеваемости туляремией в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре : [Постановление № 9 от 25 августа 2013 года] / Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Ханты-Мансийскому автономному округу – Югре. – Режим доступа : <http://86.rospotrebnadzor.ru>.
116. Об утверждении Положения о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации и Положения о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании : [Постановление Правительства Российской Федерации от 24 июля 2000 г. N 554] // СПС «Гарант».
117. Об утверждении Списка возбудителей заболеваний (патогенов) человека, животных и растений, генетически измененных микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий, подлежащих экспортному контролю : Указ Президента РФ №1004 от 8.08.2001. – Режим доступа : <http://www.tks.ru/news/law/2001/08/15/0002>.
118. Об эпидемиологической ситуации по карантинным и особо опасным болезням и вакцинации лиц, выезжающих в зарубежные страны : Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 28 декабря 2007 г. № 0100/13646-07-32 // СПС «Гарант».
119. Олсуфьев, Н. Г. Природная очаговость, эпидемиология и профилактика туляремии / Н. Г. Олсуфьев, Т. Н. Дунаева. – М., 1970. – 273 с.
120. Олсуфьев, Н. Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии / Н. Г. Олсуфьев. – М., 1975. – 284 с.

121. Олсуфьев, Н. Г. Туляремия / Н. Г. Олсуфьев, Г. П. Руднева. – М. : Медгиз, 1960. – 458 с.
122. Онищенко, Г. Г. Об эпидемической ситуации и заболеваемости природноочаговыми инфекциями в Российской Федерации и мерах по их профилактике / Г. Г. Онищенко // ЖМЭИ. – 2001. – № 3. – С. 22–28.
123. Онищенко, Г. Г. Контроль за инфекционными заболеваниями - стратегическая задача здравоохранения России в XXI веке / Г. Г. Онищенко // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2002. – № 6. – С. 4–16.
124. Основные требования к вакцинным штаммам туляремиального микроба. Методические указания. МУ 3.3.1.2161-07 (Утв. Роспотребнадзором 12.02.2007). – Режим доступа : <http://www.zakon.law7.ru/legal2/se13/pravo13534/index.htm>
125. Очерки истории чумы / М. В. Супотницкий [и др.]. – М., 2006. – 1164 с.
126. Пат. SU (11) 1593216. Установка для инактивации микроорганизмов / Дамиров И. И., Ковальчук Л. И., Качалов В. Н., Гуславский А. И., Токарик Э.Ф. – Режим доступа : <http://www.findpatent.ru/patent/159/1593216.html>.
127. Пат. SU (13) 1714926. Установка для инактивации микробиологических вакцин / Горшкова Т. К., Ковальчук Л. И., Гуславский А. И., Токарик Э. Ф., Качалов В. Н., Дамиров И. И. – Режим доступа : <http://www.findpatent.ru/patent/171/1714926.html>.
128. Перспективные вакцины против бруцеллеза крупного рогатого скота / К. В. Шумилов [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2008. – № 4. – Режим доступа : 2008 <http://www.kubanvet.ru/journal15755551.html>.
129. Перспективы изучения цитокинового статуса при хроническом бруцеллезе / Е. П. Ляпина [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2004. – № 12. – С. 55–56.
130. Петров, Р. В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 608 с.

131. Петров, Р. В. Иммуногены нового поколения / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов. – М. : ГЭОТАР – Иедиа, 2011. – 608 с.
132. Петров, Р. В. Я или не я / Р. В. Петров. – М. : Молодая гвардия, 1983 – 272 с.
133. Плазмоинициированная деструкция красителя метиленового синего в водном растворе / Ю. В. Титова [и др.]. – Режим доступа : <http://www.isuct.ru/istapc2005/proc/1-11.pdf>.
134. Покровский, В. И. Инфекции наступают, но победить не должны / В. И. Покровский // Эпидемиология и вакциропрофилактика. – 2001. – № 1. – С. 3–5.
135. Порядок выдачи разрешения на работу с микроорганизмами I–IV групп патогенности и рекомбинантными молекулами ДНК (СП 1.2.006-93). Санитарные правила по безопасности работ с микроорганизмами. Ч. I. – М., 1993.
136. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности. СП 1.2.036-95. Санитарные правила. – М., 1995.
137. Посудин Ю. И. Фотодинамическая диагностика и терапия злокачественных опухолей / Ю. И. Посудин, И. П. Лобода, В. И. Лобода // Клиническая хирургия. – 1982. – № 5. – С. 43–45.
138. Приказ Минвуза СССР от 13.11.1984 № 742. – Режим доступа : <http://www.bestpravo.ru/sssр/gn-pravo/t3a.htm>.
139. Приказ Минздрава РФ № 125. Об усилении мероприятий по профилактике туляремии : [Приказ Минздрава РФ от 14 апреля 1999 г. – № 125]. – Режим доступа : [www.lawmix.ru/med.php?id=13140-130k](http://www.lawmix.ru/med.php?id=13140-130k) – 1999.
140. Приказ Минздрава СССР от 12.08.1977 № 755. – Режим доступа : <http://www.worklib.ru/laws/ml03/pages/10009478.php>.
141. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири : монография / под ред. Г. Г.Онищенко, В. В. Кутырева; Федер. служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [и др.]. - М. : Медицина : Шико, 2004. - 191 с. : ил. ; 25 см. - Библиогр.: с. 185-189.

142. Природные очаги туляремии на острове Врангеля / И. С. Мещерякова [и др.] // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2006. – № 4. – С. 32–34.
143. Проблема биотерроризма в современных условиях / А. А. Воробьев [и др.] // ЖМЭИ. – 2002б. – № 3. – С. 3–12.
144. Профилактика бруцеллеза. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 3.1.7. 2613 -10. – Режим доступа : <http://www.epidemiolog.ru/law/san/3240081.html>.
145. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей : метод. указания МУ 3.1.7.1189-03 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 30 января 2003 г.). – М., 2003.
146. Профилактика инфекционных болезней. Инфекции, общие для человека и животных. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.7.2492-09. – М., 2009.
147. Профилактика туляремии. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 3.1.7. 2642 -10. – Режим доступа : <http://www.epidemiolog.ru/law/san/3240133.html>.
148. Профилактика чумы. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.7.2492-09. – Режим доступа : <http://www.epidemiolog.ru/law/san/3240016.html>.
149. Рейф, Ф. Берклевский курс физики / Ф. Рейф. – М. : Наука, 1986. – Т. V. Статистическая физика. – 336 с.
150. Руководство по инфекционным болезням у детей / под ред. С. Д. Носова. – М. : Медицина, 1980. – 600 с.
151. Руководство по профилактике чумы / под общ. ред. А. В. Наумова, Л. В. Самойловой ; Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». – Саратов : Слово, 1992. – 278 с.

152. Салмаков, К. М. Бруцеллез крупного рогатого скота / К. М. Салмаков // Ветеринарный врач. – 2000. – № 1. – С. 41–46.
153. Салмаков, К. М. Изучение иммунитета у морских свинок и крупного рогатого скота, привитых вакцинными штаммами № 19 и 82 / К. М. Салмаков // Ученые записки Казанского ветеринарного института. – Казань, 1996. – Т. 97. – С. 125–128.
154. Салмаков, К. М. Иммунодефициты сельскохозяйственных животных / К. М. Салмаков, Г. А. Белозерова // Тез. Докл. 1-й Всерос. науч. конф. – М., 1994. – С. 14–21.
155. Салмакова, А. В. Сравнительное изучение живых вакцин из различных штаммов *B.abortus* и влияния иммуномодуляторов на их эффективность : дис.... канд. биол. наук : 06.02.02 / Салмакова А. В. – Казань, 2010. – 128 с.: ил. РГБ ОД, 61 10-3/577.
156. Сафина, Г. М. Напряженность иммунитета животных, ревакцинированных вакциной из инагглютиногенного штамма *B.abortus* R-1096 / Г. М. Сафина, А. М. Фомин, К. М. Салмаков // Ветеринарный врач. – 2004. – № 1. – С. 27–30.
157. Сборник санитарных и ветеринарных правил. Санитарные правила СП 3.1.085-96. Ветеринарные правила ВП 13.3.1302-96. Профилактика и борьба с болезнями, общими для человека и животных. Бруцеллез. – М. : Инф.-изд. центр Госкомсанэпиднадзора России, 1996. – 256 с.
158. Седов, Л. Методы теории подобия и размерностей в механике / Л. Седов. – М. : Наука, 1987. – 430 с.
159. Селиверстов, В. В. Результаты производственного испытания адъювант-вакцины против бруцеллеза крупного рогатого скота / В. В. Селиверстов, К. В. Шумилов // Ветеринария. – 2001. – № 6. – С. 10–12.
160. Скатов, Д. В. Влияние антигенных фракций внешней мембраны *Francisella tularensis* на функциональную активность макрофагов / Д. В. Скатов, В. С. Хлебников, Н. Р. Василенко // ЖМЭИ. – 1993. – № 4. – С. 87–91.

161. Скляр, О. Д. Бруцеллез животных. Диагностика, профилактика, меры борьбы и ветеринарно-санитарная экспертиза / О. Д. Скляр, Й. А. Логинов, И. Г. Серегин. – М.: МГУПБ, 2008. – 256 с.
162. Состояние и перспективы изыскания нового поколения вакцин при бруцеллезе животных / А. В. Иванов [и др.] // Ветеринарный врач. – 2009. – № 6. – С. 9–12.
163. Социально-экономическое положение России – 2012 год / Федеральная служба государственной статистики. – Режим доступа : [http://www.gks.ru/bgd/regl/b12\\_01/IssWWW.exe/Stg/d04/3-3.htm](http://www.gks.ru/bgd/regl/b12_01/IssWWW.exe/Stg/d04/3-3.htm).
164. Сочнев, В. В. Проявление бруцеллеза крупного рогатого скота в свежем эпизоотическом очаге / В. В. Сочнев // Методы профилактики и лечения инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных в Нечерноземье. – Горький : НИВИ, 1984. – С. 21–27.
165. СП 3.1.085-96, ВП 13.3.1302-96 // Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных: сб. санитарных и ветеринарных правил. – М., 1996. – Режим доступа : <http://vetpk.ru/docs/sanpiny/?p=3&rpp=10>
166. Способ получения препарата для активной иммунизации против туляремии : Патент 22215 91 РФ / Жемчугов В.Е., Дятлов И.А., Кутырев В.В., Волох О. А. Приоритет от 27.01.2003; опубл. 01.2004, Бюл. № 2. – 12 с.
167. Справочник Видаль 2011. Лекарственные препараты в России / под ред. Е. А. Толмачевой. – М. : АстраФармСервис, 2011. – 1728 с.
168. Сравнение действия видимого фемптосекундного пульсирующего лазера и непрерывного волнового низкоинтенсивного лазерного излучения на генетические клоны *Escherichia coli* / Т. И. Кару [и др.] // Фотохимия и фотобиология. – 1991. – № 4. – С. 44.
169. Сравнительная характеристика физико-химических свойств липополисахаридов *Yersinia pestis* и R-мутантов энтеробактерий / Т. А. Гремякова [и др.] // Микробиология. – 1996. – Т. 65. – № 6. – С. 763–767.



170. Страховская, М. Г. Фотодинамическая инактивация микроорганизмов: фундаментальные и прикладные аспекты : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / М. Г. Тараненко – Москва, 2010. – 49 с.
171. Супотницкий, М. В. Очерки истории чумы : в 2 кн. / М. В. Супотницкий, Н. С. Супотницкая // Кн. 2: Чума бактериологического периода. – М. : Вузовская книга, 2006. – 696 с.
172. Таран, И. Ф. Бруцеллез (микробиология, иммунология, эпидемиология, профилактика) / И. Ф. Таран, Г. И. Лямкин. – Ставрополь, 1996. – 176 с.
173. Тараненко, Т. М. Углеводсодержащие антигены чумного и псевдотуберкулезного микробов (теоретические и прикладные аспекты) : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Т. М. Тараненко – Саратов, 1988. – 41 с.
174. Тифлова, О. А. Действие низкоинтенсивного лазерного излучения на нестационарные метаболические процессы в клетках / О. А. Тифлова, Т. И. Кару // докл. Академии наук СССР. – М., 1987. – № 4. – С. 5.
175. Туляремия. Санитарные правила СП 3.1.097-96 Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. Туляремия / VetClub. Сообщество профессионалов. – Режим доступа : <http://www.vetclub.ru/content/view/30/60/#6>.
176. Ульянов, С. С. Исследование микроциркуляции с использованием явления дифракции сфокусированных лазерных пучков / С. С. Ульянов, Г. Е. Бриль, Е. И. Захарова (Галанжа) // Физическая медицина. – 1994. – Т. 4. – № 1–2. – С. 39.
177. Условия транспортировки и хранения медицинских иммунобиологических препаратов. СП 3.3.2.028-95. Санитарные правила. – М., 1995. Участие оксида азота в регуляции функции лимфатических микрососудов / Е. И. Галанжа [и др.] // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2002. – Т. 88. – № 6. – С. 801–807.
178. Учайкин, В. Ф. Руководство по клинической иммунологии / В. Ф. Учайкин, О. В. Шамшева. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 592 с.

179. Федоров В. Н. Профилактика чумы / В. Н. Федоров, И. И. Рогозин, Б. К. Фенюк. – М: Медгиз, 1955. – 103 с.
180. Федоров Ю. М., Горшенко В. В. Всес. конф. «Актуальные вопросы профилактики бруцеллеза и организации медицинской помощи больным». Тез, докл. -Новосибирск, 1989. -С. 3-4.
181. Фотодинамическая терапия / В. А. Кац [и др.] // Вопросы онкологии. – 1992. – Т. 38. – № 10/11/12. – С. 1403–1410.
182. Фотодинамическая терапия рецидивных и «остаточных» опухолей орофаринголарингеальной области / Е. Ф. Странадко [и др.] // Вестник оториноларингологии. – 2001. – № 3. – С. 36–39.
183. Функциональная организация лимфатических микрососудов брыжейки белых крыс / Г. Е. Бриль [и др.] // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2001. – Т. 87. – № 5. – С. 600–607.
184. Хаитов, Р. М. Вакцины нового поколения на основе синтетических полиионов: история создания, феноменология и механизмы действия, внедрение в практику / Р. М. Хаитов, Р. В. Петров // Иммунология. – 1998. – № 5. – С. 4–11.
185. Чубукова, О. В. Перспективы применения ДНК-вакцин в профилактике хантавирусных инфекций / О. В. Чубукова, Ю. М. Никоноров // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2008. – № 2. – С. 37–40.
186. Чума на о. Мадагаскар / В. В. Кутырев [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – Вып. 108. – С. 5–11.
187. Чумная химическая вакцина / С. М. Дальвадянц [и др.] // Состояние и перспективы специфической профилактики чумы : материалы науч.-практ. конф. – Саратов, 1997. – Т. 1. – С. 201.
188. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М. : Мир, 1987. – 452 с.

189. Шумилов, К. В. Изучение вакцинных штаммов *B. abortus* 104-М, *Brucella melitensis* Rev-1, *B. abortus* 82 на крупном рогатом скоте / К. В. Шумилов, А. В. Акулов // Тр. ВИЭВ. М., 1977. - Т. 45. - С. 29-36.
190. Щелкунов, С. Н. Съедобные вакцины на основе трансгенных растений / С. Н. Щелкунов, Г. А. Щелкунова // Молекулярная медицина. – 2008. – № 2. – С. 3–12.
191. Эпидемиологическая обстановка по опасным инфекционным болезням в России и мире. – Режим доступа : <http://30.rospotrebnadzor.ru/directions/nadzor/86391>.
192. Ющук, Н. Туляремия / Н. Ющук, Г. Кареткина // Медицинская газета № 95 (стр.8-9), 07.12.2005.
193. A *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) mutant with a deletion in *capB*, encoding a putative capsular biosynthesis protein, is significantly more attenuated than LVS yet induces potent protective immunity in mice against *F. tularensis* challenge / Q. Jia // Infect. Immun. – 2010; 78(10):4341–55.
194. A multiplex polymerase chain reaction microarray assay to detect bioterror pathogens in blood / K. Tomioka et al. // J. Mol. Diagn. – 2005; 7(4): 486– 494.
195. A typical plague bacilli isolated from rodents, fleas, and man / J. E. Williams et al. // Am J Public Health. – 1978. – Vol. 68. – No. 3. – P. 262–264.
196. Absence of shedding of two *B. abortus* strains in goats after vaccination with live vaccines / A. Soberón-Mobarak et al. // Vaccine. – 2000, Jul 1;18(26):3018–20.
197. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation / T. I. Karu et al. // Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2005. 81, 98–106.
198. Aizu, Y. Bio-speckle phenomena and their application to the evaluation of blood flow / Y. Aizu, T. Asakura // Opt. Laser Technol. – 1991. – Vol. 23. – No. 4. – P. 205–219.

199. Aizu, Y. Bio-speckle phenomena for blood flow measurements: speckle fluctuations and Doppler effects / Y. Aizu, T. Asakura; C. Fotakis, T. Papazoglou, and C. Kalpouzos, eds. // *Optics and lasers in Biomedicine and Culture, OWLS V – Optics Within Life Sciences*. – Berlin, 2000. – P. 297–300.
200. Aizu, Y. Compensation of eye movements in retinal speckle flowmetry using flexible correlation analysis based on the specific variance / Y. Aizu, T. Asakura, A. Kojima // *Journal of Biomedical Optics*. – 1998. – Vol. 3. – No. 3. – P. 227–236.
201. Anisimov, A. P. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis* / A. P. Anisimov, L. E. Lindler, G. B. Pier // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2004. – Vol. 17. – P. 434–464.
202. Antigenic composition of a vaccine strain of *Francisella tularensis* / S. E. Holm, A. Tarnvik, G. Sandstrom // *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* – 1980. 61:136–144.
203. Banai, M. Taxonomy of *Brucella* / M. Banai, M. Corbel // *Open Vet. Sci. J.* – 2010. – Vol. 4. – P. 85–101.
204. Barry, E. M. Vaccines against tularemia / E. M. Barry. L. E. Cole, A. E. Santiago // *Hum. Vaccine*. – 2009; 5(12):832–8.
205. Bergstrom, K. E. *Brucella* surveillance and clinical sampling among animals in Sweden / K. E. Bergstrom, S. Boqvist // *Brucellosis 2003 International Research Conference September 15-17, University of Navarra*. – Pamplona (Spain), 2003. – P. 94–95.
206. Berman, D. T. Characterization of *Brucella abortus* soluble antigen employed in immunoassay / D. T. Berman, E. L. Wilson, E. Moreno // *J. of Clinical Microbiol.* – 1980. – No. 11. – P. 355–362.
207. Biomedical application of coherent-optical methods for the analysis of lymph flow in microvessels / A. V. Solov'eva et al. // *Proc. SPIE*. – 2001. – Vol. 4434. – P. 223–226.
208. Boyce, J. M. Recent trends in the epidemiology of tularemia in the United States / J. M. Boyce // *J. Infect. Dis.* – 1975. – 131:197–199.

209. Briers, J. D. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field, technique for monitoring capillary blood flow / D. J. Briers, S. Webster // *Journal of Biomedical Optics*. – 1996. – Vol. 1. – No. 2. – P. 174–179.
210. Briers, D. J. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging / D. J. Briers // *Physiol. Meas.* – 2001. – Vol. 22. – R35–R66.
211. Brucellosis epidemiological and clinical aspects (Is brucellosis a major public health problem in Bosnia and Herzegovina?) / S. Krkic-Dautovic et al. // *Bosn J Basic Med SCI*. – 2006. – Vol. 6 (2). – P. 11–15.
212. Burrows, T. W. Virulence of *Pasteurella pestis* and immunity to plague / T. W. Burrows // *Ergeb. Mikrobiol. Immuniat. for schung. experiment. Therapy*. – 1963. – Bd. 37. – S. 59–113.
213. Change in adenine nucleotide pool in *E. coli* 1257 bacterial cells under the action of a low intensity He-Ne laser / N. A. Romanova et al. // *Biokhimiia*. – 1993 March; 58(3):376–84 Article in Russian.
214. Clinical manifestations of tularemia in Japan – analysis of 1355 cases observed between 1924 and 1987 / Y. Ohara et al. // *Infection*. – 1991. 19:14–17.
215. Computer-controlled laser irradiation unit for studies of light-induced processes in cell cultures / A. W. Knappe et al. // *Biomed. Tech.* – 1995. – Vol. 40. – P. 272–275.
216. Conlan, J. W. Tularemia vaccines: recent developments and remaining hurdles / J. W. Conlan. – *Future Microbiol.* – 2011; 6(4):391–405.
217. Conlan, J. W. Vaccines against *Francisella tularensis* past, present and future / J. W. Conlan // *Expert Rev Vaccines*. – 2004. – Jun. – 3 (3). – P. 307–314.
218. Corbel, M. J. Recent advances in the study of Brucella antigens and their serological cross-reactions / M. J. Corbel // *Vet. Bull.* – 1985, 55, 927–942.
219. Corbel, M. J. Urease activity of Brucella species, 1985 / M. J. Corbell, D. M. Hendry // *Res. Vet. Sci.* 38:252–253.

220. Corbel, M. J. Microbiology of the genus *Brucella* / E. J. Young, M. J. Corbel (Eds.) // *Brucellosis: Chemical and Laboratory*. CRC Press. Boca Raton, 1989. Fl., 53–69.
221. Corbel, M. J. Vaccines against human brucellosis / M. J. Corbel, V. A. Feodorova // *Vaccine Against Bacterial Biothreat Pathogens*, 2011. – P. 78–91.
222. Cronquist, S. D. Tularemia: the disease and the weapon / S. D. Cronquist // *Dermatologic clinics*. – 2004. – Jul; 22(3). – P. 313–320.
223. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo / J. A. Wolff et al. // *Science*. – 1990. – Vol. 247. – P. 1465–1468.
224. DNA vaccines / J. Donnelly et al. // *Annu. Rev. Immunol.* – 1997. – Vol. 15. – P. 617–648.
225. Does low-intensity he-ne laser radiation produce a photobiological growth response in *Escherichia coli* / L. L. Daniels et al. // *Photochemistry and photobiology*. – 1994. – Vol. 60 – No. 5. – P. 481–485.
226. Dougherty, T. J. Photodynamic therapy / T. J. Dougherty // *Medical radiology innovations in radiation oncology*. – 1988. – No. 1. – P. 175–188.
227. Dubray, G. Protective antigens in brucellosis. 2-nd Forum in Microbiology *Brucella and brucellosis* / G. Dubray // *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* – 1987. – Vol. 138. – No. 1. – P. 84–87.
228. Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle / A. K. Dunn et al. // *J. of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2001. – Vol. 21. – P. 195–201.
229. Effect of low-intensity argon laser irradiation on mitochondrial respiration / Y. Morimoto et al. // *Lasers Surg. Med.* – 1994. – Vol. 15. – No. 2. – P. 191–9.
230. Effect of Plasmid DNA Vaccine Design and In Vivo Electroporation on the Resulting Vaccine-Specific Immune Responses in Rhesus Macaques / A. Luckay et al. // *J. Virol.* – 2007. – Vol. 81. – P. 5257–5269.

231. Effects of two viral inactivation methods on platelets: laser-UV radiation and merocyanine 540-mediated photoinactivation / K. N. Prodouz et al. // *Blood Cells*. – 1992. – Vol. 18. – No. 1. – P. 14.
232. Eigelsbach, H. T. Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig / H. T. Eigelsbach, C. M. Downs // *J. Immunol.* – 1961. – Vol.87. – P. 413–425.
233. Evaluation of blood flow at ocular fundus by using laser speckle / Y. Aizu et al. // *Applied Optics*. – 1992. – Vol. 31. – No.16. – P. 3020–3029.
234. Evolution of Subspecies of *Francisella tularensis* / Kerstin Svensson et al. // *J. Bacteriol.* – 2005, June. – Vol. 187. – No. 11. – P. 3903–3908.
235. Experimental lymphedema in a new animal model / V. P. Zharov et al. // *Proc. of 5th National Lymphedema Network International Conference, August*. – Chicago, 2002. – P. 16–17.
236. Feodorova, V. A. Prospects for new plague vaccines / V. A. Feodorova, M. J. Corbel // *Exp. Rev. Vaccine*. – 2009. – Vol. 8. – P. 1721–1738.
237. Feodorova, V. A. Vaccines Against Bacterial Biothreat Pathogens / V. A. Feodorova, V. L. Motin. – Signpost Kerala, India, 2011. – P. 175–233.
238. Field investigations of tularemia in Norway / B. P. Berdal et al. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 1996. – 13:191–195.
239. Functional imaging of tumor vascular network in small animal models / V. Kalchenko ; in H. Sterenborg and I. Vitkin eds.// *Novel Biophotonic Techniques and Applications* : paper 809007, Proceedings of SPIE-OSA Biomedical Optics, 2011. – Vol. 8090.
240. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp *tularensis* / M. Broekhuijsen et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – 41(7):2924–2931.

241. Girard, G. L'Immunité dans l'infection pesteuse. Acquisitions apportées par 30 années de travaux sur la souche de "P. pestis EV (Girard et Robic)" / G. Girard // *Biologic Medicale*. – 1963. – T. 52. – P. 631–731.
242. Guffey J.S., Wilborn J. In vitro bactericidal effects of 405 and 470 nm blue light // *Photomed. Laser Surg*. 2006. Vol. 24. P. 684–688.
243. Gurycova, D. Analysis of the incidence and routes of transmission of tularemia in Slovakia / D. Gurycova // *Epidemiol. Microbiol. Immunol.* – 46:67–72.
244. Gurycova, D. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe / D. Gurycova // *Eur. J. Epidemiol.* – 1998. 14, 797–802.
245. Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? // *J. Photochem. Photobiol.* 2004. № 3. P. 436–450.
246. Higuchi, K. Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. 3. Effects of calcium ions on the growth of virulent and avirulent strains of *Pasteurella pestis* / K. Higuchi, L. Kupferberg, J. Smith // *J. Bacteriol.* – 1959. – Vol. 77. – P. 317–321.
247. Hongcharu W, Taylor CR, Chang YD, Aghassi D, Suthamjariya K, Anderson RR. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. *J. Invest. Dermatol.*
248. Human brucellosis in a nonendemic country: a report from Germany, 2002 and 2003 / S. Al Dahouk et al. // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2005. – Vol. 24 (7). – P. 450–456.
249. Imaging cerebral blood flow through the intact rat skull with temporal laser speckle imaging / P. Li et al. // *Opt. Lett.* – 2006. – Vol. 31. – P. 1824–1826.
250. Imaging of lymph flow in single microvessels in vivo / E. I. Galanzha et al. // *Pros. SPIE.* – 2000. – Vol. 4224. – P. 317–321.
251. Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* LVS / G. Sandstrom et al. // *FEMS Microbiol. Immunol.* – 1992. 5:201–210.



252. Immunopotential of live brucellosis vaccine by adjuvants / A. A. Denisov et al. // *Vaccine*. – 2010. – Oct 1;28. – Suppl 5:F17-22. – URL : 10.1016/j.vaccine.2010.03.054.
253. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals / L. Babiuk et al. // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 21. – P. 649–658.
254. Ivory, C. Genet. Leishmania vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology / C. Ivory, K. Chadee // *Vaccines Ther.* – 2004. – Vol. 2. – P. 17–45.
255. Jawetz, E. Avirulent strains of *Pasteurella pestis* / E. Jawetz, K. F. Meyer // *J. Infect. Dis.* – 1943. – Vol. 73. – P. 124–143.
256. Jawetz, E. Studies on plague immunity in experimental animals. II. Some factors of the immunity mechanism in bubonic plague / E. Jawetz, K. F. Meyer // *J. Immunol.* – 1944. – Vol. 49. – P. 15–30.
257. Jefferson, T. Vaccines for preventing plague / T. Jefferson, V. Demicheli, M. Pratt // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 1998. – Iss. 1. – No. CD000976. DOI: 10.1002/14651858.CD000976.
258. Karu T. Photobiology of low-power laser effects / T. Karu // *Health Phys.* – 1989, May; 56(5):691–704.
259. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible and near infra red radiation on cells / T. Karu // *J. Photochem. Photobiol.* – 1999. – Vol. 49. – P. 1–17.
260. Karu, T. I. Cellular mechanism of low power laser therapy: new questions / T. I. Karu // *Lasers in Medicine and Dentistry*, Ed. by Z. Simunovic. – Vitgraf: Rieka, 2003. – Vol. 3. – P. 79–100.
261. Karu, T. I. Effect of low-intensity monochromatic visible light on the growth of *Escherichia coli* / T. I. Karu, O. A. Tiphlova // *Microbiology (Moscow)*. – 1987. 56(4), 492–496, (Engl. transl. of *Mikrobiologiya*, 56(4), 626–630, 1988).
262. Karu, T. I. Low power laser therapy / T. I. Karu // *Biomedical Photonics Handbook*. – Ch. 48, Editor-in-chief Tuan Vo-Dinh. – Boca Raton: CRC Press, 2003.

263. Kolle, W. Die active Immunisierung gegen Pest mittele abgeschwahcter Kulturen / W. Kolle, R. Otto // Zbl. Bakteriол. Parasitenkn. Infektionskrakht. I Abt. Ref. – 1903. – Bd. 34. – S. 470–471.
264. Laser speckle imaging of dynamic changes in flow during photodynamic therapy / B. Kruijt et al. // Lasers Med Sci. – 2006. – Vol. 21. – No. 4. – P. 208–212.
265. Logan, I. D. An investigation of the cytotoxic and mutagenic potential of low intensity laser irradiation in Friend erythroleukaemia cells / I. D. Logan, P. G. McKenna, Y. A. Barnett // Mutat Res. – 1995. – Vol. 347. – No. 2. – P. 67–71.
266. Low intensity laser irradiation inhibits tritiated thymidine incorporation in the hemopoetic cell lines HL-60 and U937 / O' Kane et al. // Lasers Surg Med. – 1994. – Vol. 14. – No. 1. – P. 34–9.
267. MacIntyre, S., Knight S.D., Fooks L.J. Structure, Assembly and applications of the polymeric F1 antigen of *Yersinia pestis* / S. MacIntyre et al.; ed. E. Carniel, B.J. Hinnebusch // Molecular and cellular biology. – 2004. – P. 363–407.
268. Maiman, T.H. Stimulated optical radiation in ruby / T. H. Maiman // Nature. – 1960. 187 (4736): 493–494.
269. Manteifel, V. M. Structure of mitochondria and activity of their respiratory chain in successive generations of yeast cells exposed to He–Ne laser light / V. Manteifel, T. I. Karu // Biology Bulletin. – 2005. – Vol. 32. – No. 6. – P. 556–566.
270. McCoy, G. W. Further observations on a plaguelike disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, Bacterium tularense / G. W. McCoy, C. W. Chapin // J. Infect. Dis. – 1912. 10:61–72.
271. Measurements of flow velocity in a microscopic region using dynamic laser speckles based on the photon correlation / Y. Aizu et al. // Opt. Commun. . – 1989. – Vol. 72. – No. 5. – P. 269–273.
272. Membrane proteins of *Francisella tularensis* LVS differ in ability to induce proliferation of lymphocytes from tularemia-vaccinated individuals / H. M. Surcel et al. // Microb. Pathog. – 1989. 7:411–419.

273. Meyer, K. F. Effectiveness of live or killed plague vaccines in man / K. F. Meyer // *Bull World Health Organ.* 1970;42(5):653–666.
274. Meyer, K. F. Plague immunization. VI. Vaccination with the fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* / K. F. Meyer, J. A. Hightower, F. R. McCrumb // *J. Infect. Dis.* – 1974. – 129 (Suppl): S. 13–18.
275. Mishina, H. A laser Doppler microscope / H. Mishina, T. Asakura, S. Nagai // *Optics Communications.* – 1974. – Vol. 11. – P. 99–102.
276. Monitoring of lymph flow in microvessels by biomicroscopy and speckle-interferometry / E. I. Galanzha et al. // *Pros. SPIE.* – 2001. – Vol. 4251. – P. 210–214.
277. Monitoring thermal-induced changes in tumor blood flow and microvessels with laser speckle contrast imaging / D. Zhu et al. // *Applied Optics.* – 2007. – Vol. 46. – No. 10. – P. 1911–1917.
278. Morner, T. The ecology of tularemia / T. Morner // *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* – 1992. 11:1123–1130.
279. Olsen, S. C. Immune responses of bison to ballistic or hand vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 / S. C. Olsen, T. J. Kreeger, W. Schultz // *J. Wildl. Dis.* – 2002, Oct. – No. 38(4). – P. 738–745.
280. Olsen, S. C. Report of the Vaccine Working Group. Enhancing Brucellosis Vaccines, Vaccine Delivery, and Surveillance Diagnostics for Elk and Bison in the Greater Yellowstone Area / S. C. Olsen, P. Mamer : *Proceedings of the United States Animal Health Association Working Symposium, August 16-18, 2005.* – Laramie, Wyoming, 2005. – P. 5–12.
281. Otten, L. Immunization against plague with live vaccine / L. Otten // *Indian J. Med. Res.* – 1936. – Vol. 24. – No. 1. – P. 73–101.
282. Outer membranes of a lipopolysaccharide-protein complex (LPS-17 kDa protein) as chemical tularemia vaccines / V. S. Khlebnikov // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 1996; 13:227–33.

283. Passive immunity to yersiniae mediated by anti-recombinant V antigen and protein A-V antigen fusion peptide / V. L. Motin et al. // *Infect. Immun.* – 1994. 62: 4192–201.
284. Perry, R. D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague / R. D. Perry, J. D. Fetherston // *Clinical microbiol. reviews.* – 1997, Jan. – P. 35–36.
285. Pollitzer, R. Plague and plague control in the Soviet Union: history and bibliography through 1964 / R. Pollitzer. – Bronx, N.Y. : Fordham University Press, 1966. – 478 p.
286. Preliminary report of an epidemic tularemia outbreak / P. Bachiller Luque et al. // *Valladolid. Rev. Clin. Esp.* – 1998:789–793.
287. Protective efficacy of *Yersinia* outer proteins against bubonic plague caused by encapsulated and noncapsulated *Yersinia pestis* / G. P. Andrews et al. // *Infect. Immun.* 1999. 67: 1533-7.
288. Random process estimator for laser speckle imaging of cerebral blood flow / P. Miao et al. // *Opt. Express.* – 2010. – Vol. 18. – No. 1. – P. 218–236.
289. Reactive oxygen species inducible by low-intensity laser irradiation alter DNA synthesis in the haemopoietic cell line U937 / Gary A. Callaghan et al. // *Lasers in surgery and medicine (Lasers surg. med.)*. – 1996. – Vol. 19. – No. 2. – P. 201–206.
290. Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion / M. Draijer et al. // *Lasers Med. Sci.* – 2006. – Vol. 21. – No. 4. – P. 208–212.
291. Riva, C. E. Laser Doppler Measurements of Blood Flow in Capillary Tubes and Retinal Arteries / C. E. Riva, B. Ross, G. B. Benedek // *Invest. Ophthalmol.* – 1972. – No. 11. – P. 936–944.
292. Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of *Francisella tularensis* / M. Fulop et al. // *Vaccine.* – 2001; 19(31):4465–4472.

293. Role of lipopolysaccharide and a major outer-membrane protein from *Francisella tularensis* in the induction of immunity against tularemia / M. Fulop et al. // *Vaccine*. – 1995; 13(13):1220–1225.
294. Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status / I. Moriyón et al. // *Vet. Res. – EDP Sciences*. – 2004. – No. 35. – P. 1–38.
295. Serological survey for diseases in free-ranging coyotes (*Canis latrans*) in Yellowstone National Park / E. M. Gese et al. // *Wyoming. J. Wildl. Dis.* – 1997. 33:47–56.
296. Shuring, G. G. *Brucellosis Vaccines: Past, Present and Future* / G. G. Shuring, N. Sriranganathan, M. J. Corbel // *Vet. Microbiol.* – 2001. – Vol. 90. – P. 479–496.
297. Sini, M. S. Analysis of cerebral blood flow imaging by registered laser speckle contrast analysis (rLASCA) / M. S. Sini, J. A. Linsely // *Proc. on Signal Processing, Communication, Computing and Networking Technologies (ICSCCN)*. – 2011. P. 207–212.
298. Sjostedt A. Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis* / A. Sjostedt // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2003, Feb; 6(1):66–71.
299. Sjostedt, A. Humoral and cell-mediated immunity in mice to a 17-kilodalton lipoprotein of *Francisella tularensis* expressed by *Salmonella typhimurium* / A. Sjostedt, G. Sandstrom, A. Tarnvik // *Infect. Immun.* – 1992. 60:2855–2862.
300. Sjostedt, A. Immunization of mice with an attenuated *Salmonella typhimurium* strain expressing a membrane protein of *Francisella tularensis*. A model for identification of bacterial determinants relevant to the host defense against tularemia / A. Sjostedt, G. Sandstrom, A. Tarnvik // *Res. Microbiol.* – 1990. 141:887–891.
301. Sjostedt, A. Several membrane polypeptides of the live vaccine strain *Francisella tularensis* LVS stimulate T cells from naturally infected individuals / A. Sjostedt, G. Sandstrom, A. Tarnvik // *J. Clin. Microbiol.* – 1990. 28:43–48.
302. Sjostedt, A. Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis* II *Curr. Opin. / A. Sjostedt // Microbiol.* – 2003. – No. 6. – P. 66–71.

303. Speckle and Doppler methods of blood and lymph flow monitoring. – Chapter 17 / E. I. Galanzha et al. // Handbook of Optical Biomedical Diagnostics. – SPIE Press Monograph, 2002. – P. 875–937.
304. Stewart, S. J. Tularemia: association with hunting and farming. FEMS / S. J. Stewart // Immunol. Med. Microbiol. – 1996. 13:197–199.
305. Studies on immunization against plague. The isolation and characterization of the soluble antigens of *Pasturella pestis* / E. E. Baker et al. // J. Immunol. – 1952. – Vol. 69. – P. 131–145.
306. Stukelj, M. Surveillance and monitoring of brucellosis in Slovenia / M. Stukelj // Brucellosis 2003 International Research Conference September 15-17, University of Navarra. – Pamplona (Spain), 2003. – P. 89–90.
307. Swiss Army survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and tick-borne encephalitis virus in ticks / R. Wicki et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2000. 19:427–432.
308. Tang, D.C. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response / D. C. Tang, M. DeVit, S. A. Jonston // Nature. – 1992. – Vol. 356. – P. 152–154.
309. Tarnvik, A. Epidemiological analysis of tularemia in Sweden, 1931–1993 / A. Tarnvik, G. Sandstrom, A. Sjostedt // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 1996. 13:201–204.
310. T-cell-independent resistance to infection and generation of immunity to *Francisella tularensis* // K. L. Elkins et al. // Infect. Immun. – 1993. 61:823–829.
311. Temporal dynamics of blood microcirculation in oral cavity mucous membrane, caused by low-intensity laser irradiation / S. Ulyanov et al. // Proc. SPIE, SPIE Press. – 2005. – Vol. 5696. – P. 215–221.

312. The application of Speckle Interferometry for the Monitoring of Blood and Lymph Flow in Microvessels / S. S. Ulyanov et al. // *Lasers in Medical Science*. – 1997. – No. 12. – P. 31–41.
313. The NlpD lipoprotein is a novel *Yersinia pestis* virulence factor essential for the development of plaque / A. Tidhar et al. // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4. – P. 7023.
314. Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery / A. Coelho-Castelo et al. // *Genet. Vaccines Therapy*. – 2006 – Vol. 4. – No. 1. – P. 1–10.
315. Titball, R. W. *Francisella tularensis* / R. W. Titball, P.C.F. Oyston // *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases* – 2009. – Vol. – P. 1241–1253.
316. Titball, R. W. Vaccination against bubonic and pneumonic plague / R. W. Titball, E. D. Williamson // *Vaccine*. – 2001. – Vol. 19(30). – P. 4175–84.
317. Titball, R.W. *Francisella tularensis*: an overview / R. W. Titball, A. Sjostedt // *ASM News*. – 2003.69:558-563.
318. Toward selective elicitation of TnI-controlled vaccination responses: vaccine application of bacteria surface layer proteins / B. Jahn-Schmid et al. // *J. Biotechnol.* – 1996; 44:225–31.
319. Tuchin, V. V. Coherent optical techniques for the analysis of tissue structure and dynamics / V. V. Tuchin // *J. Biomed. Opt.* – 1999. – Vol. 4. – No. 1. – P. 106–124.
320. Tuchin, V. V. *Tissue optics: Light scattering methods and instruments for medical diagnosis*. 2-nd edition, PM 166 / V. V. Tuchin. – Bellingham, WA: SPIE Press., 2007. – 882 p.
321. Tularemia / J. Ellis et al. // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2002; 15(4):631–646.
322. Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years / S. Helvaci et al. // *Eur. J. Epidemiol.* – 2000. 16:271–276.
323. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies / R. Reintjes et al. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2002. 8:69–73.

324. Ulmer, Jeffrey B. Vaccine manufacturing: challenges and solutions / Jeffrey B Ulmer, Ulrich Valley, Rino Rappuoli // *Nature Biotechnology*. – 2006. – URL : doi:10.1038/nbt1261.
325. Ulyanov, S. S. A New Type of Manifestation of Doppler Effect. An Application to Blood and Lymph Flow Measurements / S. S. Ulyanov // *Optical Engineering*. – 1995. – Vol. 34. – No. 10. – P. 2850–2855.
326. Ulyanov, S. S. High resolution speckle-microscopy: study of the spatial structure of a bioflow / S. S. Ulyanov // *Physiological Measurements*. – 2001. – Vol. 22. – P. 81–691.
327. Ulyanov, S. S. Speckled Speckles Statistics with a small number of scatterers: An implication for blood flow measurements / S. S. Ulyanov // *Journal of Biomedical Optics*. – 1998. – Vol. 3. – No. 3. – P. 237–245.
328. Ulyanov, Sergey Statistical properties of dynamic small-N speckles within highly scattering media // *JOSA A*. –2008. – Vol. 25. – P. 2207–2214.
329. Update on plague in Madagascar / S. Chanteau et al. // *Med Trop (Mars)*. – 1998. – No. 58. – P. 25–31.
330. Walsh, L. J. The current status of Low Level Laser Therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications / L. J. Walsh // *Australian Dental Journal*. – 1997. – No. 42 (5). – P. 302–306.
331. Wilson, M. Sensitisation of oral bacteria to killing by low-power laser irradiation / M. Wilson, J. Dobson, W. Harvey // *Current Microbiology*. – 1992. – No. 25. – P. 77–81.
332. Winter, A. J. Effectiveness of natural and synthetic complexes of protein and O polysaccharide as vaccines against *Brucella abortus* in mice / A. J. Winter, G. E. Rowe, J. R. Duncan // *Infect. And Immun.* – 2002. – Vol. 56. – No. 11. – P. 2808–2817.



333. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis / A. Johansson et al. // J Bacteriol. – 2004. 186, 5808–5818.
334. *Yersinia* outer proteins (YOPS) E, K and N are antigenic but non-protective compared to V antigen, in a murine model of bubonic plague / S. E. C. Leary et al. // Microbial Pathogenesis. 1999; 26(3):159–169.
335. *Yersinia pestis* outer membrane type III secretion protein YscC: / J. L. Goodin et al. // Protein Expr Purif. – 2005. 40: 152–63.
336. Yu, P. Time-dependent speckle in holographic optical coherence imaging and the health of tumor tissue / P. Yu, L. Peng, M. Mustata // Opt. Lett. – 2004. – Vol. 29. – P. 68–70.
337. Yumiko, Imada. Diagnosis Report of Human Brucellosis caused by *Brucella melitensis* in Japan / Yumiko Imada // Bui. Natl. Anim. Health. – 2004. – Vol. 1. – P. 1–4.