

УДК 579.842.11:612.13:535

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА СПЕКЛ-МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ДЕЙСТВИЯ ТОКСИНПРОДУЦИРУЮЩИХ ШТАММОВ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ НА МИКРОЦИРКУЛЯЦИЮ КРОВИ

Д.В. Подшибякин, Е.И. Тихомирова, О.В. Ульянова*,
С.С. Ульянов**, М.А. Шибаева

Саратовский государственный университет,
кафедра микробиологии и физиологии растений

* Научная бактериологическая лаборатория НИЧ,

** Кафедра оптики и биомедицинской физики

E-mail: tichomirova_ei@mail.ru

Изучали влияние штаммов энтеропатогенных кишечных палочек, продуцирующих экзо- и эндотоксины, на микроциркуляцию крови в брыжейке белых крыс методом спекл-микроскопии. Отмечено возрастание скорости кровотока в капиллярах в течение небольшого промежутка времени. Установлена более выраженная реакция микросудов брыжейки при действии микробных клеток, продуцирующих экзотоксины.

Ключевые слова: спекл-микроскопия, *Escherichia coli*, бактериальные токсины, микроциркуляция крови, брыжейка, белые крысы.

The Speckle-Microscopy Estimation of Toxinproducing *Escherichia Coli* Strains Effect on Blood Microcirculation

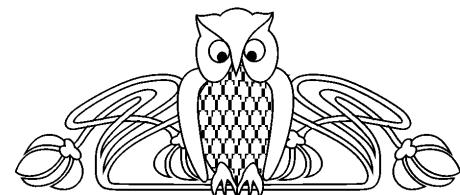
D.V. Podschibyakin, E.I. Tikhomirova, O.V. Ulianova, S.S. Ulyanov, M.A. Shibaeva

The effects of toxin producing enteropathogenic *Escherichia coli* on blood microcirculation in ventral mesentery of white rats were studied. The increasing of blood flow velocity in capillaries has been observed under the influence of toxins in the course of short intervals.

Key words: speckle-microscop, *Escherichia coli*, bacterial toxins, blood, microcirculation, ventral mesentery, white rats.

Введение

Одним из перспективных методов биотестирования токсичности в биомедицинских и экологических исследованиях является спекл-микроскопия. Традиционно токсичность инфекционных агентов определяют на лабораторных животных при внутрибрюшинном и подкожном введении. Препарат считается безвредным при отсутствии у животных в течение 7 дней каких-либо местных и общих реакций. Спекл-микроскопия является информативным, доступным и дешёвым методом, позволяющим проводить исследования микроциркуляции *in vivo* в режиме реального времени [1–7].



Изменения характеристик и структуры потоков крови несут в себе важную патогенетическую и диагностическую информацию, отражающую характер действия микроорганизма на состояние макроорганизма [8].

Интерес к энтеропатогенным кишечным палочкам (ЭПКП) связан с широким распространением колибактериозов человека и животных [9]. В патогенезе кишечной колиинфекции важнейшая роль принадлежит системе ферментов и токсинов, которые освобождаются из бактерий при размножении и массовой гибели последних в тонком кишечнике. Токсины нарушают проницаемость слизистой оболочки кишечника, проникают в систему воротной вены, печень и снижают ее дезинтоксикационную функцию. Механизмы патогенного действия токсинов и ферментов ЭПКП были предметом исследования многих авторов, тем не менее до сих пор остаются малоизученными. В связи с этим представляло интерес провести *ex tempore in vivo* оценку влияния энтеропатогенных кишечных палочек, продуцирующих экзо- и эндотоксины, на микроциркуляцию крови в брыжейке белых крыс с использованием метода спекл-микроскопии.

Материалы и методы

В исследованиях использовали культуры энтеропатогенного штамма *Escherichia coli* A5, синтезирующего экзотоксин, и энтеропатогенного штамма *Escherichia coli* B6, обладающего способностью к продукции эндотоксина. Образование токсинов у данных штаммов обусловлено наличием вне-

хромосомных репликонов. Внекромосомные элементы *E. coli* A5 представлены высокомолекулярной плазмидой размером 180 kbp и дополнительным внекромосомным репликоном размером 6 kbp. В клетках штамма *E. coli* B6 обнаружен плазмидный репликон размером $\approx 0,3$ kbp [10].

Бактерии культивировали в 5 мл мясопептонного бульона при 37°C. Суточные культуры центрифугировали при 600 g; полученные супернатанты, содержащие токсичные продукты клеток, использовали для проведения исследований.

Объектом исследования были белые крысы двухмесячного возраста массой 180–200 г, без различия пола. Животные содержались на стандартном рационе вивария и были клинически здоровы. Перед проведением экспериментов крыс наркотизировали внутримышечно инъекцией натриевой соли 5-этил-5-(1-метилбутил)-2,4,6-триоксипirimидина (нембутал) из расчёта 0,5 мг на 1 г массы тела. Затем проводили вскрытие брюшной полости и извлечение брыжейки. Вскрытую крысу помещали на термостабилизирующий столик спекл-микроскопа таким образом, чтобы брыжеечная петля находилась непосредственно под микрообъективом.

Оптическая схема спекл-микроскопа для изучения движущихся биологических сред представлена на рис. 1. Луч Не-Не лазера ($\lambda = 633$ нм) фокусируется в пятно небольшого радиуса ($w_0 = 1,5$ $\mu\text{м}$) на исследуемом сосуде.

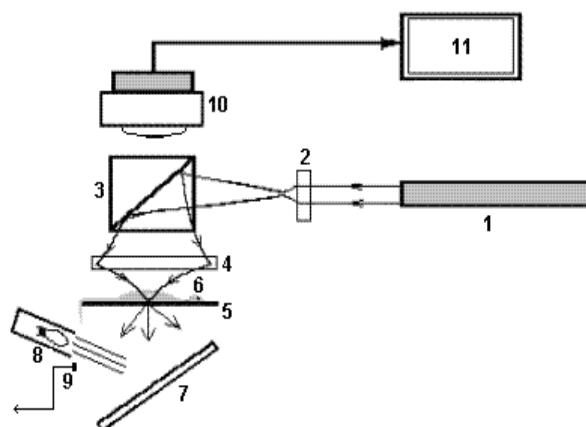


Рис. 1. Оптическая схема спекл-микроскопа: 1 – лазер; 2 – окуляр с 10-кратным увеличением; 3 – разделитель лучей; 4 – микрообъектив с 8-кратным увеличением; 5 – столик; 6 – биологический объект (брыйжейка белой крысы); 7 – зеркало; 8 – источник света; 9 – фотодетектор; 10 – видеокамера; 11 – компьютер

Опционально микроскоп может быть снажён цифровой монохромной камерой типа Mutech 1280-USB, позволяющей наблюдать кровоток в сосуде визуально. При прохождении сильно сфокусированного лазерного пучка через поток крови в сосуде происходит его модуляция, что приводит к формированию динамических спеклов в зоне дифракции. Спеклы большого размера формируются при небольшом числе рассеивателей (клеток крови) таким образом, что диаметр фотодетектора оказывается существенно меньше размера спеклов. Временные вариации сигнала оцифровываются, записываются, а затем обрабатываются с помощью компьютерной программы (рис. 2).

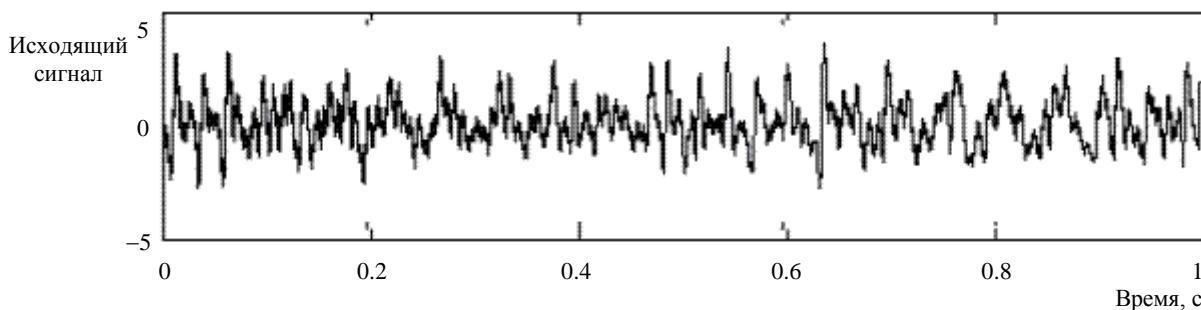


Рис. 2. Выходящий сигнал спекл-микроскопа. Лазерный луч сфокусирован на кровеносном сосуде диаметром ~ 15 $\mu\text{м}$

Небольшое количество супернатанта культуры (~ 1 мл) наносили на петлю брыжейки и немедленно регистрировали исходя-

щий сигнал спекл-микроскопа в течение 10 с. Повторные регистрациями проводили через 1, 2, 3, 4 и 5 мин для изучения динамики про-



цесса. В качестве контроля использовали характеристики кровотока до нанесения супернатанта. Выходящий сигнал оцифровывался, записывался в wav-файл и затем обрабатывался при помощи оригинального алгоритма для прикладного пакета программ MathCAD 2001.

Полученные данные представлены как изменения ширины полосы спектра (ШПС) флюктуации интенсивности сигнала для каждой секунды регистрации.

Результаты и их обсуждение

Было проведено сравнение влияния экзо- и эндотоксина *E. coli* на микроциркуляцию крови в брыжейке белых крыс. Полученные результаты представлены на рис. 3, 4.

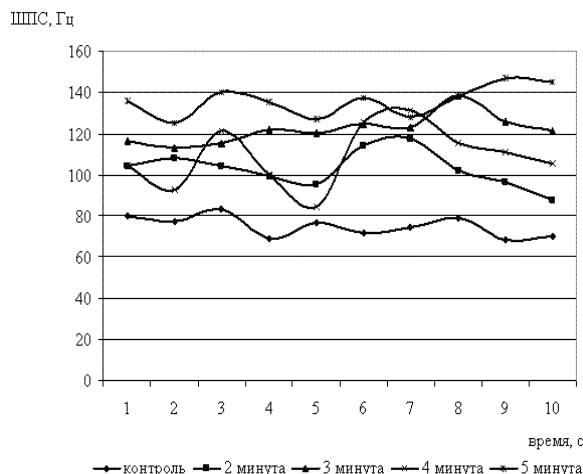


Рис. 3. Эффект действия экзотоксина *Escherichia coli* A5 на микроциркуляцию крови в брыжейке белых крыс

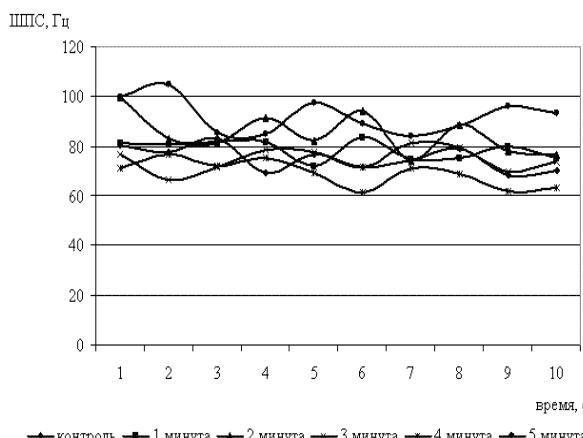


Рис. 4. Эффект действия эндотоксина *Escherichia coli* B6 на микроциркуляцию крови в брыжейке белых крыс

Установлено немедленное усиление скорости кровотока после нанесения супернатанта *E. coli* A5, содержащего экзотоксин, на микроциркуляцию крови в капиллярах. Было отмечено динамическое увеличение ширины полосы спектра флюктуации интенсивности сигнала примерно вдвое, что свидетельствует об ускорении кровотока в капилляре (рис. 3).

При нанесении супернатанта *E. coli* B6, содержащего эндотоксин, выявлены более низкие изменения скорости кровотока (рис. 4). Максимальное увеличение ширины полосы спектра флюктуации интенсивности сигнала в данном случае составило примерно ~ 20 Гц.

Следовательно, в целом действие экзо- и эндотоксинов кишечной палочки на микроциркуляцию крови в брыжейке кишечника экспериментальных животных однотипно.

Поскольку желудочно-кишечный тракт отличается, наряду с общими миопаралитическими эффектами, сложной нейротонической пептидоэргической регуляцией, можно предположить, что повышение скорости микрогемоциркуляции может быть связано с изменениями в системе вегетативной иннервации и продукции гастроинтестинальных гормонов [11, 12].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №06-04-39016), National Science Foundation of China (Grant No.30711120171), и US Civil Research and Development Foundation (AWARD REC~006).

Библиографический список

- Галанжа Е.И. Микролимфодинамика в норме и патологии. Оптические методы исследования: Дис. ... д-ра мед. наук / Сарат. гос. ун-т. Саратов, 2004.
- Федосов И.В., Ульянов С.С. Особенности проявления эффекта Допплера при дифракции сфокусированного коherentного излучения в рассеивающем потоке // Оптика и спектроскопия. 2001. Т.91, №2. С.325–329.
- Aizu Y., Asakura T., Ogino K., Sugita T. Evaluation of flow volume in a capillary using dynamic laser speckles based on the photon correlation // Opt. Commun. 1990. Vol.80(2). P.1–6.
- Ulyanov S.S. New type of manifestation of the Doppler effect: an applications to blood and lymph flow measurements // Opt. Eng. 1995. Vol.34(10). P.2850–2855.
- Ulyanov S.S., Tuchin V.V., Bednov A.A. et al. The applications of speckle interferometry for the monitoring of blood and lymph flow in microvessels // Lasers in Medical Sciences. 1997. Vol.12. P.31–41.
- Ulyanov S.S. High-resolution speckle-microscopy: study of the spatial structure of a bioflow // Physiol Meas. 2001. Vol.22. P.1–10.



7. *Ulyanov S.* Principles of high-resolution speckle microscopy: analysis of bioflows // Proc SPIE. 2002. Vol.4607. P.374–380.
8. Ульянова О.В., Ганилова Ю.А., Ульянов С.С. Использование спекл-микроскопии при тестировании токсичности бактериальных препаратов // Вестн. Сарат. гос. аграрного ун-та. 2007. №2. С.18–20.
9. Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник / В.И. Покровский, С.Г. Пак, Н.И. Брико, Б.К. Данилкин. 2-е изд. М.: ЭОТАР-МЕД, 2004. 816 с.
10. Волкова М.В. Разработка экспериментальной живой вакцины для профилактики колибактериоза свиней: Автoreф. дис. канд. биол. наук. Саратов, 2006.
11. Мельников Н.И., Мельников В.Н., Гимранов М.Г. Ферменты патогенности и токсины бактерий. М.: Медицина, 1969. 252 с.
12. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Основы общей патологии: Учеб. пособие для студентов медвузов. СПб.: ЭЛБИ, 1999. Ч.1. Основы общей патофизиологии. 624 с.