

при применении селенсодержащих препаратов / И. В. Чекуров, Л. Л. Абрамова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2011. – № 2. – С. 275–278. 9. Junqueira, L. C. Basic histology: text & atlas / L. C. Junqueira, J. Carneiro. – 11-th ed. – New York: McGraw-Hill, 2005. – 502 p.

Статья передана в печать 21.01.2020 г.

УДК 576.8:57.086.13

СПОСОБ СОХРАНЕНИЯ ИНВАЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ *TOXOPLASMA GONDII* С ПРИМЕНЕНИЕМ КРИОКОНСЕРВАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Пашинская Е.С., Семенов В.М.

УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Toxoplasma является облигатным паразитом, который может инвазировать человека и животных. Токсоплазмоз относится к эндемичным заболеваниям и распространен повсеместно. Известно, что токсоплазмоз имеет различную степень тяжести. В большинстве случаев у людей с ослабленным иммунитетом инвазия протекает тяжело, с высоким уровнем заболеваемости и смертности. Чаще всего при активном течении токсоплазмоза может возникнуть поражение внутренних органов, что представляет собой определенную опасность. Известно, что токсоплазмы поражают головной и спинной мозг, глаза и мышцы. У пациентов наблюдаются нарушения деятельности мозга, может возникнуть слепота, миозит, миокардит, которые сопровождаются сердечно-сосудистой недостаточностью, судорожным синдромом, эмоциональной лабильностью, нейроэндокринными расстройствами.

Современные медицинские и биологические науки имеют необходимость совершенствования уже существующих подходов к выявлению токсоплазм для разработки новых способов диагностики, изучения токсоплазм на всех уровнях организации с целью исследования паразито-хозяйинных отношений.

Для этого в условиях лаборатории необходимо иметь постоянный доступ к культуре паразита.

Представленная статья описывает способ сохранения инвазионной культуры *Toxoplasma gondii* с применением криоконсервационных технологий. Эффект достигается за счет того, что культуру *Toxoplasma gondii* отмывают в стерильной пробирке, получают осадок, содержащий *Toxoplasma gondii*, который превращают в гомогенат, затем подсчитывают концентрацию *Toxoplasma gondii* в гомогенате, далее готовят криоконсервант. Следующим этапом в криопробирку вносят гомогенат, содержащий *Toxoplasma gondii*, затем в криопробирку добавляют криоконсервант. Далее криопробирку помещают в холодильник на 4 часа (4°C), а через 4 часа выбирают температуру хранения в зависимости от поставленных целей. **Ключевые слова:** токсоплазма, криоконсервация, выживаемость, мышь.

METHOD FOR PRESERVING *TOXOPLASMA GONDII* INVASION CULTURE USING CRYO-PRESERVATION TECHNOLOGIES

Pashinskaya E.S., Semenov V.M.

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Toxoplasma is an obligate parasite that can invade humans and animals. Toxoplasmosis is an endemic disease and is ubiquitous. Toxoplasmosis is known to have varying degrees of severity. In most cases in people with weakened immune systems the invasion is severe with a high incidence and mortality rate. Most often with the active course of toxoplasmosis, damage to the internal organs can occur, which is a certain danger. Toxoplasma is known to affect the brain and spinal cord eyes and muscles. Patients have impaired brain activity, blindness, myositis, myocarditis may occur which are accompanied by cardiovascular failure, convulsive syndrome, emotional lability and neuroendocrine disorders.

Modern medical and biological sciences need to improve existing approaches to the identification of toxoplasmas to develop new diagnostic methods, toxoplasma studies at all levels of the organization in order to study parasitic host relationships.

To do this in a laboratory you must have constant access to the culture of the parasite.

The presented article describes a method for preserving the invasive culture of *Toxoplasma gondii* using cryopreservation technologies. The effect is achieved due to the fact that the *Toxoplasma gondii* culture is washed in a sterile tube a precipitate containing *Toxoplasma gondii* is obtained, which is converted into a homogenate then the concentration of *Toxoplasma gondii* in the homogenate is calculated and then a cryopreservative is prepared. The next step is the introduction of a homogenate containing *Toxoplasma gondii* into cryovials then a cryopreservative is added to the cryovial. Next the cryovial is placed in the refrigerator for 4 hours (4°C) and after 4 hours the storage temperature is selected depending on the goals. **Keywords:** toxoplasma, cryopreservation, survival, mouse.

Введение. Известно, что изучением эффектов воздействия низких температур на живые организмы занимается такой раздел биологии, как криобиология. Основными задачами криобиологии является исследование биологических систем, объектов при температурах, ниже нормальных. Чаще всего объектами, подвергающимися криоконсервации [1, 2, 3], могут быть:

наследственная информация в различной форме, клетки, ткани, органы и организмы. В процессе заморозки используют различный диапазон температур, подобранных индивидуально в каждом конкретном случае.

Однако чаще всего проблемой в процессе криоконсервации является грамотное выяснение процессов, характерных для охлаждения материала, которые могут привести к необратимым повреждениям. Известно, что большое значение имеет скорость охлаждения и температура хранения материала, подбор криопротекторов и их соотношения [4, 5].

Toxoplasma gondii - облигатный паразит, который может инвазировать не только человека, но животных. Токсоплазмоз относится к эндемичным болезням и распространен повсеместно. Известно, что токсоплазмоз имеет различную степень тяжести. В большинстве случаев у людей с ослабленным иммунитетом инвазия протекает тяжело, с высоким уровнем заболеваемости и смертности. Чаще всего при активном течении токсоплазмоза может возникнуть поражение внутренних органов, что представляет собой определенную опасность. В ходе паразитирования токсоплазмы в тканях образуются некротические участки, кисты с последующим обызвествлением. Эти процессы приводят к нарушению функционирования органов. Показано, что токсоплазмы могут поражать головной и спинной мозг, глаза и мышцы. Как итог, у пациентов наблюдаются различные нарушения деятельности мозга, может возникнуть слепота, миозит, миокардит, которые могут сопровождаться сердечно-сосудистой недостаточностью, судорожным синдромом, эмоциональной лабильностью, нейроэндокринными расстройствами [6, 7].

Хотелось бы подчеркнуть, что важной проблемой также является приобретенный паразитоз беременных и врожденный токсоплазмоз детей.

Самопроизвольный аборт на любом сроке, мертворождение или рождение детей с аномалиями развития органов, системными поражениями, ведущими к гибели новорожденного – результат паразитирования токсоплазмы [8].

В связи с вышеизложенным, необходимо совершенствовать уже существующие подходы к выявлению токсоплазм для разработки новых способов диагностики, изучения токсоплазм на всех уровнях организации для более глубокого понимания паразито-хозяйинных отношений.

Для этого в условиях лаборатории необходимо иметь постоянный доступ к культуре паразита.

Цель - разработать способ криоконсервации *Toxoplasma gondii*, позволяющий сохранять жизнеспособность *Toxoplasma gondii* на протяжении длительного периода времени для последующего использования паразита в исследованиях биологического, медицинского, фармацевтического профилей.

Материалы и методы исследований. В эксперименте мы использовали культуру *Toxoplasma gondii*, которую получали методом флотации фекалий семейства кошачьих и размножали способом *in vivo* на мышевидных грызунах следующим образом: цисты культуры *Toxoplasma gondii* трехкратно отмывали в пробирках в 0,9%-ном растворе натрия хлорида путем центрифугирования при 1500 об/мин. Лишнюю жидкость адсорбировали. Далее в пробирках оставляли не менее 1 мл осадка, который встряхивали и превращали в гомогенат. После этого дозатором на предметное стекло наносили 10 мкл гомогената, содержащего культуру *Toxoplasma gondii*, готовили мазок, который окрашивали раствором Гимза и накрывали покровным стеклом. Через 5-10 минут препарат анализировали под микроскопом. На предметном стекле в поле зрения мы обнаруживали спорозоиты *Toxoplasma gondii*. Далее рассчитывали концентрацию *Toxoplasma gondii* в гомогенате, используя камеру Горяева [9]. Нами выявлено, что оптимальная концентрация для введения *in vivo* составляет 5000 спорозоитов на 1 г массы тела животного (мышь, 18-20 г). Нужной концентрации спорозоитов в гомогенате мы достигали путем добавления 0,9%-ного водного раствора натрия хлорида. Затем гомогенат набирали в инсулиновые шприцы для последующего внутрибрюшинного введения мыши.

Для осуществления внутрибрюшинного введения животное фиксировали вручную. Место инъекции смазывали ватным тампоном, смоченным в дезрастворе. Мышь опускали вниз головой. Стенку нижней трети живота брали пальцами в складку, у основания которой делали прокол. После этого иглу направляли по ходу складки и вводили гомогенат, содержащий культуру *Toxoplasma gondii*.

После проведенных манипуляций мышей содержали в стандартных условиях вивария с постоянным доступом к воде и пище. Контроль над состоянием животных проводили ежедневно.

На 5-7 день после перевивки инвазионной культуры *Toxoplasma gondii* для получения внутрибрюшинного экссудата и смыва, содержащего тахизоиты токсоплазм, мы проводили убой мышей под воздействием эфирного наркоза или хлороформа. Перед вскрытием покровы тела каждого животного тщательно дезинфицировали. Далее мышь фиксировали на подложке с помощью препаровальных игл. Кожу в области живота оттягивали пинцетом и аккуратно срезали с помощью ножниц, не повреждая брюшину. Полученное «окно» смазывали антисептиком. Далее

в стерильный шприц набирали 3 мл 0,9%-ного водного раствора натрия хлорида. Оттягивали пинцетом брюшину, шприцем с иглой аккуратно вводили 3 мл раствора натрия хлорида в брюшную полость животного, стараясь не задеть внутренние органы. Затем шприц с иглой вынимали и массировали брюшную стенку для равномерного распределения 9%-ного водного раствора натрия хлорида. Далее стерильным шприцем с иглой прокалывали брюшину и забирали полученный экссудат, содержащий тахизоиты *Toxoplasma gondii*.

Для получения максимального количества паразита у этого же животного мы брали смыв из брюшной полости, который также содержал *Toxoplasma gondii*. Для этого набирали в стерильный шприц 5 мл 0,9%-ного водного раствора натрия хлорида, брюшину обрабатывали антисептиком и вскрывали с помощью ножниц. Фиксировали мышью рукой и промывали брюшную полость с внутренними органами 5 мл 0,9%-ного водного раствора натрия хлорида над стерильной емкостью. Полученный смыв, содержащий тахизоиты *Toxoplasma gondii*, фильтровали и отмывали в стерильной пробирке в 0,9%-ном растворе натрия хлорида путем центрифугирования при 1500 об/мин трехкратно. Далее адсорбировали верхний слой жидкости, получали осадок, содержащий *Toxoplasma gondii*. Затем путем встряхивания пробирки осадок, содержащий *Toxoplasma gondii*, превращали в гомогенат. Подсчет концентрации *Toxoplasma gondii* в гомогенате осуществляли, используя камеру Горяева [9]. Нами выявлено, что оптимальная концентрация *Toxoplasma gondii* для криоконсервации составляет 5×10^6 в криопробирке.

Для проведения криоконсервации мы готовили криоконсервант, используя раствор ДМСО (массовая доля основного вещества - не менее 99,5%), сыворотку бычьей, питательную среду DMEM/F-12, учитывая объем полученного гомогената, содержащего *Toxoplasma gondii*. В стерильный стакан наливали 50% сыворотки бычьей, предварительно прогретой до температуры 37°C; 20% питательной среды DMEM/F-12 (37°C); 20% ДМСО (37°C), исходя из объема замораживаемого паразитарного материала.

После приготовления криоконсерванта в стерильную криопробирку дозатором вносили гомогенат, содержащий *Toxoplasma gondii*, из расчета 5×10^6 *Toxoplasma gondii* на криопробирку, добавляли криоконсервант в том же объеме, что и гомогенат, содержащий *Toxoplasma gondii*. Криопробирку закрывали, слегка встряхивали и помещали в холодильник на 4 часа (4°C). Затем мы выбирали температуру хранения исходя из целей и задач.

Результаты исследований. Выявлено, что выживаемость *Toxoplasma gondii* при трехмесячном хранении при -20°C составляет 80%. При увеличении срока хранения до полугода выживаемость составляет 50%. Годовой срок хранения при температуре -20°C снижает показатели выживаемости до 30%.

Хранение криопробирок, содержащих *Toxoplasma gondii*, в течение трех месяцев при температуре -60°C дает выживаемость *Toxoplasma gondii* в пределах 99%, а увеличение срока хранения до полугода снижает показатель до 70%. Годовой срок хранения при температуре -60°C сохраняет показатели выживаемости в пределах 70%.

Криоконсервация *Toxoplasma gondii* в течение трех месяцев в жидком азоте сохраняет выживаемость *Toxoplasma gondii* на 99%, а увеличение срока хранения до полугода снижает показатель до 40%. Годовой срок хранения в жидком азоте снижает показатели выживаемости до 30%.

Заключение. Таким образом, предложенный способ позволяет криоконсервировать *Toxoplasma gondii* с последующим использованием культуры для исследований биологического, медицинского, фармацевтического профилей.

Литература. 1. Шубин, Н. А. Прикладная криобиология. Криотехника и организация криобанков // Методы культивирования клеток : сб. ст. – СПб., 2008. – С. 50–261. 2. Попов, А. С. Криоконсервация культивируемых клеток / Н. А. Шубин // Методы культивирования клеток : сб. ст. – СПб., 2008. – С. 236–250. 3. Методы консервации коллекционных культур микроорганизмов : методические рекомендации / В. И. Сафронова [и др.]. – СПб. : ГНУ ВНИИСХМ, 2007. – 32 с. 4. Способ длительного хранения естественных симбиотических ассоциаций микроорганизмов человека и животных : RU 98103006 / Б. А. Шендеров, Э. Н. Гахова, М. А. Манвелова, Д. А. Пиорунский, В. Н. Карнаухов. – Оpubл. 10.12.1998. 5. Изучение биологических свойств и криоконсервации паразитического простейшего *Trichomonas vaginalis* при совместном культивировании с клеточными культурами / Л. Ф. Литвинчук [и др.] // Клеточные культуры. – 2011. – С. 46. 6. Домонова, Э. А. Разработка и оценка аналитических характеристик ПЦР тест-систем для выявления ДНК *Toxoplasma gondii* / Э. А. Домонова [и др.] // Молекулярная диагностика ВИЧ. – 2013. – Т. 1. – С. 141–144. 7. Сарсеева, Н. Е. ВИЧ-инфекция и токсоплазмоз / Н. Е. Сарсеева // Fundamental Research. – 2014. – № 10. – P. 1976–1978. 8. Токсоплазмоз во время беременности профилактика, диагностика и лечение : клиническое практическое руководство общества акушеров-гинекологов Канады // Репродуктивная эндокринология. – 2013. – №1 (9). – С. 86–91. 9. Черкасова, Е. И. Работа с культурами клеток : учебно-метод. пособие / Е. И. Черкасова, А. А. Брилкина. – Нижний Новгород : Изд. Нижегородского ун-та, 2015. – С. 32–35.

Статья передана в печать 07.02.2020 г.