УДК 576.8 : 57.086.13

Е. С. Пашинская, доц., канд. биол. наук;
В. М. Семенов, проф., д-р. мед. наук;
Л. А. Любаковская, доц., канд. биол. наук
(ВГМУ, г. Витебск)

ПРИМЕНЕНИЕ КРИОКОНСЕРВАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ИНВАЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ *TOXOPLASMA GONDII*

В современном мире использование живых систем, организмов для создания и совершенствования различных технологий, продуктов очень актуально. С помощью биотехнологических методов можно проводить различные процедуры модификации живых организмов с использованием генной инженерии, культуры клеток и тканей, криоконсервации.

Изучением эффектов воздействия низких температур на живые организмы занимается криобиология. Основными задачами криобиологии является исследование биологических систем, объектов при температурах ниже нормальных. Для этого используется криоконсервация.

Основной проблемой такого процесса, как криоконсервация, 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, их соотношения [1, 2].

Toxoplasma gondii - облигатный паразит, который может паразитировать не только у человека, но и у животных. Известно, что токсоплазмоз имеет различную степень тяжести. В большинстве случаев, у людей с ослабленным иммунитетом, это инвазионное заболевание протекает тяжело с высоким уровнем заболеваемости и смертности [3]. 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 [4].

Для разработки новых способов диагностики, изучения токсоплазм на всех уровнях организации, а также более глубокого понимания паразито-хозяинных отношений, необходимо совершенствовать уже существующие подходы к выявлению токсоплазм. Для этого в условиях лаборатории необходимо иметь постоянный доступ к культуре паразита.

Целью настоящего исследования являлась разработка способа сохранения инвазионной культуры *Toxoplasma gondii* с применением криоконсервационных технологий.

В эксперименте использовали культуру *Toxoplasma gondii*, полученную по разработанному нами методу [5].

Для проведения криоконсервации паразита мы готовили криоконсервант, используя раствор ДМСО (массовая доля основного вещества не менее 99,5 %), сыворотку бычью, питательную среду DMEM/F-12, учитывая объем полученного гомогената, содержащего Toxoplasma gondii. В стерильный стакан наливали 50 % сыворотки бычьей, предварительно прогретой до температуры 37 ^{0}C; 30 % питательной среды DMEM/F-12 (37 ^{0}C); 20 % ДМСО (37 ^{0}C), исходя из объема замораживаемого паразитарного материала.

После приготовления криоконсерванта, в стерильную криопробирку дозатором вносили *Toxoplasma gondii*, из расчета 5x10^6 *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 ^{0}C). Затем выбирали температуру хранения исходя из целей и задач.

В результате выявлено, что выживаемость *Toxoplasma gondii* при трехмесячном хранении при -20 ^{0}C составляет 80 %. При увеличении срока хранения до полугода выживаемость составляет 50 %. Годовой срок хранения при температуре -20 ^{0}C снижает показатели выживаемости до 30 %.

Хранение криопробирок, содержащих *Toxoplasma gondii*, в течение трех месяцев при температуре -60 ^{0}C дает выживаемость Toxoplasma gondii в пределах 99 %, а увеличение срока хранения до полугода снижает показатель до 70 %. Годовой срок хранения при температуре -60 ^{0}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 %.

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 // Методы культивирования клеток: сб. ст. – СПб. – 2008. – С. 236-250.

3. Сарсекеева, Н.Е. ВИЧ-инфекция и токсоплазмоз / Н.Е. Сарсекеева // Fundamental Research. – 2014. – № 10. – Р. 1976-1978.

4. Токсоплазмоз во время беременности профилактика, диагностика и лечение. Клиническое практическое руководство общества акушеров-гинекологов Канады. Репродуктивная эндокринология. – 2013. – №1 (9). – С. 86-91.

5. Пашинская, Е.С. Способ культивации Toxoplasma gondii на мышиной модели in vivo/ Е.С. Пашинская // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2020. – № 2 (20). – С. 6-15.