

УДК 619:576.893.192.6.095.15

**В.Т. Заблоцкий***ГНУ Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко (ВИЭВ)*

## КРИОГЕННОЕ КОНСЕРВИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПРОТОЗОЙНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ И ПРОТИВОТЕЙЛЕРИОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

В последние годы в практике различных исследований, проводимых с паразитическими простейшими, широко применение находят стабильты, то есть те или иные паразиты, замороженные до температуры ниже минус 70° С и сохраняющиеся в этом состоянии необходимое для экспериментатора время.

Преимущество этого метода очевидно. Во-первых, отпадает необходимость в трудоемкой и кропотливой работе по поддержанию штаммов возбудителей на лабораторных или дорогостоящих сельскохозяйственных животных (лошади, крупный рогатый скот, овцы и др.). Во-вторых, следует учитывать и тот факт, что в процессе такого пассирования у паразитов происходят изменения в биологических свойствах и антигенной структуре, а это подчас затрудняет получение сопоставимых результатов при проведении длительных экспериментов или их повторении. И в-третьих, при изучении изменчивости антигенных и иммуногенных свойств конкретной группы простейших необходимо использовать паразитов, находящихся на определенных стадиях развития и порой не отличимых морфологически. Эту работу без использования стабильтов фактически выполнить невозможно. Кроме того, в настоящее время в России, Иране, Израиле, Великобритании, Индии, Германии, Турции, Марокко и других странах проводятся исследования по получению живых вакцин против тейлериоза крупного рогатого скота. Эффективное сохранение их без применения метода глубокого замораживания еще не разработано.

В некоторых лабораториях нашей страны, в частности в лаборатории протозоологии ВИЭВ, создается банк возбудителей кровопаразитарных заболеваний сельскохозяйственных животных. Часть из этих возбудителей находится в глубокой заморозке при температуре минус 196° С (в жидком азоте) уже не менее 15-28 лет.

Исследований, посвященных этой про-

блеме при протозойных заболеваниях, сравнительно мало.

D. Pellegrini, B. Baldelli, T. Frescura (1963) установили, что *Trypanosoma brucei* сохраняла свою подвижность и патогенность после 5-месячного хранения при -79° С на среде, состоящей из раствора Хенкса и глицерина в 10%-ной концентрации.

D.S. Allain (1964) изучал влияние замораживания на 8-дневные культуральные формы 11 штаммов *Trypanosoma cruzi* и одного штамма *T. duttoni*, *Leishmania donovani*, *L. tropica* и *L. brasiliensis*. Ампулы с материалом хранили при -64° С в течение 6-18 месяцев. Через 6 месяцев все штаммы лейшманий оказались жизнеспособными (выделены в культурах). Через 12 месяцев 6 штаммов *Trypanosoma cruzi* и штамм *T. duttoni* были патогенными для своих хозяев.

Через 12 месяцев проверены тканевые формы *T. cruzi*, *T. lewisi* и *L. donovani* – все штаммы оказались высокопатогенными для своих хозяев.

J.H. Vincke, M. Scheepers-Biva, J. Bafort (1965) хранили кровь с *Plasmodium berghei* в 5%-ной глюкозе и 1%-ном гепарине при температуре от -73° до -75° С. Эту кровь через различные промежутки времени вводили молодым грызунам тамномисам и хомякам и исследовали на эксфлагеляцию мужских гаметоцитов.

Была осуществлена передача этих паразитов через *Anopheles atroparvus*. *P. berghei*, по данным авторов, может сохраняться при низких температурах в течение длительного времени, не теряя жизнеспособности и инвазионности.

Ch. Thongnutapot, R. Wigand (1965) изучали инвазионность мышинной крови с *Haemobartonella muris* для спленэктомированных мышей. Кровь в присутствии 15% глицерина сохраняла инвазионность до 2-4 недель при -20° С и свыше 6 месяцев при -70° С. Влияние скорости замораживания и оттаивания на инвазионность крови, по мнению авторов, оказалось несущественным.

W. Muller (1966) изучал возможность консервации трихомонад штаммов *T. vaginalis*, *T. tenax*, *T. gallinae*, *T. hominis*, *T. foetus*, *T. augusta* и изолированного из слепой кишки свиньи *Tritrichomonas* Sp., которые культивировали в среде САСН. Все виды, исключая *T. tenax*, культивировали аксенически. Автором установлена лучшая сохраняемость культур, замораживаемых в фазе максимального роста до достижения ими фазы логарифмического роста. Успех глубокого замораживания, по мнению автора, зависит в большей мере от отсутствия колебаний температуры в течение замораживания.

#### **Материалы и методы.**

В опытах использовали возбудителей некоторых протозойных болезней животных: *Th. annulata*, *Toxoplasma gondii*, *Tr. evansi*, *Anaplasma ovis*, *A. marginale*, а также 12 бычков черно-пестрой породы в возрасте 8-10 месяцев, 2 овцы, 20 белых мышей. Готовили, фиксировали и окрашивали мазки крови по общепринятым в гематологии методам.

При замораживании суспензии клеток, инвазированных гранатными телами тейлерий и инвазированной крови, в качестве криозащитного вещества использовали глицерин или DMSO в таком объеме, чтобы конечная концентрация его в материале составила 10%. После эквипирации в течение 1 ч при 22° С суспензию инвазированных клеток расфасовывали в стеклянные ампулы объемом 8-10 мл. Затем ампулы помещали в термос с этиловым спиртом. Для контроля скорости снижения температуры в спирт опускали термометр, а затем подбрасывали маленькие кусочки сухого льда с такой частотой, чтобы температура спирта равномерно понижалась с заданной скоростью. Охлажденные до минус 70°С ампулы с материалом помещали на хранение в сосуд Дьюара с жидким азотом в специальных кассетах. Использовали трехступенчатый режим замораживания, при котором скорость охлаждения материала от плюс 20° С до минус 20°С составляла один градус в минуту, в диапазоне температур от минус 20 до минус 40° – полтора градуса в минуту и четыре градуса в минуту при дальнейшем охлаждении материала до минус 70°С.

Оттаивание замороженного материала проводили быстро. Для этого ампулы прямо из сосуда Дьюара помещали в водяную баню, где поддерживали температуру 38-39° С.

Жизнеспособность клеток определяли методом субвиталяного окрашивания

0,5%-ным раствором трипановой сини.

Изучение влияния низкой температуры (-70°С) на жизнеспособность и инвазионность *Theileria annulata* нами проведено в 1968 г. в двух опытах на шести животных.

От бычка №84, больного тейлериезом при паразитемии 60% *Th. annulata*, взяли 100 мл крови в гепарин и заморозили до -70°С. Спустя 72 и 80 часов кровь быстро разморозили и ввели четырем здоровым бычкам подкожно в дозе 20 мл. Двум телкам для контроля ввели свежую гепаринизированную кровь от того же бычка № 84.

На 18-22 день у подопытных и контрольных животных отметили повышение температуры тела, продолжавшееся в течение 5-9 дней с максимумом до 41,8° С. У опытных бычков паразитемия достигла уровня – 1,6-30%, а у контрольных телок – 0,6-11%.

Следующее определение жизнеспособности и патогенности тейлерий провели после 495 и 1010 дней нахождения их в жидком азоте. С этой целью разморозили 4 ампулы, содержащие суспензию инвазированных тейлериями лимфоидных клеток.

При определении жизнеспособности размороженного материала было установлено, что 83% лимфоидных клеток оказались живыми. Для проверки патогенных свойств тейлерий двум бычкам ввели по 7 мл материала, хранившегося в азоте 495 дней, а двум другим – аналогичное количество суспензии, хранившейся в течение 1010 дней.

Через 16-17 дней у всех животных повысилась температура тела. В пунктатах из увеличенных регионарных лимфатических узлов были обнаружены гранатные тела тейлерий. Лихорадка продолжалась в течение 6-8 дней. Паразитемия у бычков была в пределах 20-68%. Два животных пали от тейлериеза.

Влияние низкой температуры на жизнеспособность и патогенность *Trypanosoma evansi* и *Toxoplasma gondii* при длительном хранении в жидком азоте изучили в двух опытах.

В первом опыте использовали кровь белых мышей с массой трипаносом, которую заморозили до -196°С.

Результаты опыта показали, что трипаносомы полностью сохраняют свою жизнеспособность и вирулентность после 425 дней хранения в замороженном состоянии. В процессе размораживания эритроциты белых мышей в отдельных случаях частично лизировались. При микроскопическом исследовании обнаружено, что трипаносомы

сомы, обладали активной подвижностью. В дальнейшем ими заразили шесть белых мышей. Материал вводили подкожно в дозе 0,1 мл размороженной крови. Одновременно контрольных мышей заразили кровью от больной трипаносомозом мыши. За мышами вели ежедневное наблюдение и исследовали кровь на наличие трипаносом. Первых паразитов обнаружили как у подопытных, так и у контрольных мышей на 4-5-е сутки после заражения. В последующие дни паразитения нарастала. Все подопытные и контрольные мыши пали одновременно на 7-8-9-й день после заражения.

Анализируя полученные данные, мы не нашли различий в вирулентности замороженного и незамороженного штаммов трипаносом.

Во втором опыте 1,5 мл экссудата, полученного из брюшной полости больных токсоплазмозом белых мышей, также заморозили до  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Через 10 месяцев разморозили одну ампулу для проверки жизнеспособности и инвазионности возбудителя и ввели материал 10 белым мышам внутрибрюшинно в дозе по 0,1 мл.

На четвертый день три белые мыши были убиты и в мазках-отпечатках из селезенки, печени, окрашенных по Романовскому-Гимза, обнаружили массу токсоплазм. Остальные семь мышей пали на 7-й день после заражения. Из органов приготовили мазки-отпечатки и клеточную суспензию, которую ввели в дозе 0,25-0,3 мл здоровым белым мышам. На 4-й день после заражения в экссудате из брюшной полости подопытных мышей обнаружено много токсоплазм.

Нами проведены исследования по изучению влияния глубокого замораживания на инфекционные свойства *Anaplasma marginale* и *A. ovis* – возбудителей анаплазмоза рогатого скота.

Эритроциты, инфицированные *A. ovis*, хранили в замороженном состоянии при температуре жидкого азота в течение 126

дней; кровь, инфицированную *A. marginale*, – в течение 38 и 95 дней.

Биопроба поставлена на 4 животных, в том числе: на 2 овцах и двух телятах с соответствующими возбудителями.

Одной овце ввели подкожно 6 мл инфицированных *A. ovis* эритроцитов, подвергнутых замораживанию; контрольной овце также подкожно ввели 6 мл эритроцитов из той же крови, но не подвергавшейся замораживанию.

Кровь, инфицированную *A. marginale*, ввели: бычку №141 – через 38, бычку №143 – через 95 дней хранения в замороженном состоянии в дозах 8 и 6 мл соответственно.

На 15-20-й дни в крови подопытных животных обнаружены анаплазмы. Паразитения у овец, как у подопытных, так и у контрольной, была в пределах 5-10%; преобладали анаплазмы крупных размеров. Значительно (в два раза) снижался уровень гемоглобина и эритроцитов, анаплазмы длительное время обнаруживались в крови. Не отмечено различия в клинико-гематологическом состоянии подопытных и контрольной овец в период переболевания.

Телята, зараженные инфицированной кровью, подвергнутой замораживанию в течение различных сроков (38-95 дней) хранения переболели анаплазмозом сравнительно (с овцами) легко. В крови обнаруживали до 20-30 анаплазм при просмотре 100 полей зрения микроскопа; уровень гемоглобина снижался на 2-3 г%.

#### Заключение.

Разработан и внедрен метод криогенного консервирования возбудителей протозойных болезней животных, а также культуральной противотейлериезной вакцины. Паразитические простейшие и анаплазмы сохраняли исходную вирулентность после хранения в жидком азоте при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  в течение:

*Th. annulata* – 1010 дней; *T. gondii* – 300 дней; *Tr. evansi* – 425 дней; *A. ovis* – 126 дней; *A. marginale* – 95 дней (во всех случаях указан срок наблюдения).

#### SUMMARY

**Parasitic protozoa and anaplasma were of virulence after freezing ( $T -1960\text{C}$ ) in period:**

***Th. annulata* – 1010 days; *T. gondii* – 300 days; *Tr. evansi* – 425 days; *A. ovis* – 126 days; *A. marginale* – 95 days (the times of observation is recording in all cases).**

#### Литература

- Allain D.S. Evaluation of the viability and pathogenicity of hemoflagellates after freezing and storage. *J. Parasitol.*, 1964, 50, №5.
- Muller W. Zur Frage der Konservierung von Laborstämmen verschiedener Trichomonas und Tritrichomonasarten durch tiefe Temperaturen. *Z. Tropenmed. Und Parasitol.*, 1966, 17, №1.
- Pellegrini D., Baldelli B., Frescura T. Conservazione di un ceppo di *Trypanosoma brucei* con le basse temperature. «*Atti Soc. Ital. Sci. veterin.*», 1963, 17.
- Thongnutapot Ch. Wigand R. Stabilität und Konservierung von *Haemobartonella muris*. *Z. Tropenmed. und Parasitol.* 1965. 16. №1.
- Vincke J.H., Scheepers – Biva M., Bafort J. Conservation de gametocytes de *Plasmodium berghei* viables et transmissibles a basse temperature. *Ann. Soc. belge med. trop.* 1965, 45, №2.
- И.В. Абрамов и др. Изучение влияния низкой

- температуры (-70° С) на биологические свойства *Theileria annulata*. Труды ВИЭВ, 1970 г. том 38, стр. 64.
- И.В. Абрамов и др. Изучение влияния глубокого замораживания при температуре жидкого азота (-196° С) на инфекционность анаплазм рогатого скота (*A. ovis*, *A. marginale*). Труды ВИЭВ, 1970 г. т. 38, стр. 321.
  - Н.И. Степанова и др. Влияние низкой температуры на жизнеспособность и вирулентность *T. evansi* и *Toxoplasma gondii* при длительном хранении в жидком азоте. Бюллетень ВИЭВ, 1974, выпуск 18, стр. 53.
  - В.Т. Заблочкий. Стабильность биологических свойств тейлерий в процессе длительного хранения при температуре минус 196° С. Бюллетень ВИЭВ, 1977, выпуск 31, стр. 10.
  - Методические рекомендации по изучению и разработке мер борьбы с протозойными болезнями животных., М. 1984, стр. 3
  - В.Т. Заблочкий. Специфическая профилактика тейлерииоза крупного рогатого скота. Автореферат докторской диссертации, М. 1985. стр.22.

### А.С. Попов

*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева*

## КРИОСОХРАНЕНИЕ РАСТЕНИЙ И ИХ КЛЕТОК

Криосохранение растений и их культивируемых клеток позволяет сохранять не только клеточные штаммы *in vitro*, но и виды, и сорта сельскохозяйственных растений с помощью хранения в жидком азоте семян. Криохранение культивируемых клеток растений намного труднее, чем клеток животных из-за специфики первых: наличия вакуолей, прежде всего центральной, занимающей в зрелой клетке 90 – 95 % и имеющей огромный объем, который в несколько тысяч раз больше, чем объем соматических клеток животных [1]. Для успешного замораживания, чтобы возобновился рост клеток после оттаивания, эту воду необходимо удалить тем или иным способом, дабы предотвратить губительное образование внутриклеточного льда. Но при удалении столь большого количества воды неизбежно происходит чрезмерное сжатие протопласта и (помимо других повреждений) фазовые переходы липидов и деструкции в клеточной мембране вплоть до нарушения ее непрерывности и гибели клетки.

Названные процессы отсутствуют (или очень ослаблены) при замораживания достаточно сухих объектов с влажностью менее 12-13 %, т.е. почти не содержащих свободной воды (в некоторых случаях допустима влажность 18-19 %). Такое низкое (и даже меньшее) содержание воды имеют семена (называемые ортодоксальными) большинства растений, чей генофонд надо сохранять, конечно, прежде всего семенами. Замораживание в этом случае не требует криозащитных веществ, специальной подготовки (кроме, может быть, поверхностного подсушивания) и программного охлаждения. Хранение ортодоксальных

семян в жидком азоте гарантирует отсутствие процессов их старения и порчи.

Однако, имеются многие важные сельскохозяйственные и лесные виды (орехи, каштаны, дубы и др.), многие плодовые, особенно тропические (кофе, какао и др.), которые имеют рекальцитрантные семена, неподдающиеся высушиванию без потери жизнеспособности и не хранящиеся даже в специальных условиях дольше нескольких недель или месяцев. В таких случаях для сохранения генофонда приходится вырезать зародыши и разрабатывать методики их культивирования *in vitro* и криосохранения для каждого вида. Работа эта столь же трудная и длительная и требующая отработки всех тех же этапов со всеми их условиями, как и глубокое замораживание и оттаивание меристем растений, размножаемых только вегетативно. Это обширная группа как сельскохозяйственных (картофель, плодовые и др.), так и дикорастущих растений, размножение которых обычными ботаническими семенами не воспроизводит всех их характеристик, или у которых получение полноценных семян затруднено.

В настоящее время процедуры криосохранения разработаны для более чем 100 видов растений. Существует обширная литература, доказавшая идентичность изученных признаков у клеточных штаммов или растений, восстановленных после криосохранения, и у исходных, контрольных. В рамках настоящей статьи можно привести лишь некоторые примеры. Как известно, число хромосом является одним из наиболее стабильных признаков вида. И в первой же работе на клетках моркови, замо-