

РЕЖИМ ЛИОФИЛИЗАЦИИ КУЛЬТУРЫ  
*LEISHMANIA TROPICA MAJOR*

К. А. Юсупов и В. Ю. Щеткин

Узбекский научно-исследовательский институт  
экспериментальной медицинской паразитологии и гельминтологии,  
Самарканд

Для консервации культур *Leishmania tropica major* разработан режим их лиофилизации, позволяющий сохранить подвижность у 10% паразитов.

Используемая для специфической профилактики кожного лейшманиоза живая культура имеет очень короткий срок годности (3 дня). Получение живой вакцины с длительным сроком годности, так же как создание коллекции штаммов лейшманий со стабилизированными иммунологическими свойствами, ускорило бы решение проблемы ликвидации кожного лейшманиоза. Недавно было показано, что использование для консервации лептомонад лиофильного высушивания обеспечивает сохранение ими подвижности и вирулентности для белых мышей (Серебряков и др., 1967). Однако очень низкая выживаемость лептомонад в процессе лиофилизации (до 0.001%), потеря ими культуральных свойств и грубое изменение морфологии сделали необходимыми дальнейшие поиски щадящего режима лиофилизации, обеспечивающего сохранение подвижности и основных иммунологических свойств максимальным количеством клеток.

Известно, что при лиофильном высушивании живых клеток значительная часть их гибнет. По поводу механизма повреждающего и губительного действия лиофилизации существует несколько теорий (механическая, химическая и биохимическая), каждая из которых пока недостаточно аргументирована фактами (Бланков и Клебанов, 1961; Фрай, 1956; Мазур, 1960; Смит, 1963, и др.).

Причину массовой гибели и повреждения лептомонад в наших опытах мы затрудняемся объяснить. Однако нам представляется, что на определенных этапах процесса лиофилизации клетки гибнут в результате воздействия на них неблагоприятных механических и химических факторов в их сочетании. Так, при замораживании материала клетки могут гибнуть в результате механического повреждения их кристаллами льда, образующимися вне- и внутриклеточно, и от воздействия повышенной концентрации солей, образующейся в результате вымораживания воды. Мы предприняли попытку изучить интенсивность гибели лептомонад на определенных этапах процесса лиофилизации — при замораживании материала и его высушивании, а также найти средства, которые бы смягчили влияние неблагоприятных факторов и позволили бы снизить интенсивность гибели лептомонад.

Прежде всего нас интересовало влияние на выживаемость лептомонад степени охлаждения и эффект от добавления в охлаждаемый материал различных защитных веществ. Для этого мы провели серию опытов по однократному замораживанию и оттаиванию взвеси лептомонад в различных условиях.

Выращенную в течение 9—10 дней на среде NNN без обогащающей жидкости культуру лептомонад смывали 0.6% раствором хлористого натрия. Полученную взвесь разливали по 1 мл в пробирки либо без добавления каких-либо веществ, либо с добавлением 2 или 5% глицерина. Часть взвеси в каждом опыте обрабатывали раствором таннина 1 : 20 000, что позволяло испытать также таннинизированную культуру — без добавления защитных веществ и с добавлением 5% глицерина. Затем разлитый в пробирки материал подвергали воздействию низких температур от  $-17$  до  $-78^{\circ}$  путем погружения его в охлаждающую смесь на 15 мин., оттаивали в водяной бане при температуре  $25^{\circ}$ , после чего во всех пробирках подсчитывали (в камере Горяева) относительное число подвижных клеток. В качестве хладоагентов были использованы смеси твердой углекислоты с этиловым спиртом, хлористого натрия с пищевым льдом, хлористого кальция с пищевым льдом и их сочетания. Для охлаждения 1 мл взвеси до заданной температуры было достаточно 15 мин.

После замораживания и последующего оттаивания культуру изучали под микроскопом в «раздавленной» капле в фиксированных и окрашенных по Романовскому препаратах. Просмотр препаратов в «раздавленной» капле показал, что в зависимости от глубины охлаждения имеет место изменение морфологических признаков различной степени: клетки полиморфны, жгутики обломаны, цитоплазма оптически неоднородна и состоит как бы из отдельных гранул, подвижность значительно ограничена. Вместе с измененными встречаются единичные морфологически не измененные клетки. В окрашенных препаратах заметны явное смещение ядра к периферии клетки и неровность краев пелликулы; цитоплазма клеток плохо воспринимает окраску. Эти изменения были более выражены, когда взвесь лептомонад подвергалась воздействию температуры  $-30^{\circ}$  и ниже. Эффект тем более выражен, чем ниже температура охлаждения. Добавление глицерина в указанных концентрациях несколько смягчает отрицательное влияние охлаждения, однако при охлаждении взвеси лептомонад до  $-40^{\circ}$  и ниже защитный эффект глицерина выражен слабее. Предварительная таннинизация лептомонад не обеспечила эффективной защиты клеток. При охлаждении взвеси до температуры  $-20$ ,  $-25^{\circ}$  с добавлением глицерина сохраняли подвижность 80—90% клеток.

Культуральные свойства лептомонад, подвергавшихся охлаждению (вплоть до температуры  $-78^{\circ}$ ), полностью сохранялись. При посеве на среду NNN на ее поверхности вырастали колонии, ничем не отличающиеся от обычных. При охлаждении культур, инкубированных 7—9 и 15—16 дней, отчетливо прослеживается влияние возраста культуры на выживаемость — она почти вдвое выше в молодых генерациях, чем в старых.

При испытании влияния высушивания на выживаемость лептомонад мы, кроме глицерина, в качестве защитных веществ испытывали некоторые комбинации кроличьей сыворотки, гемолизированных эритроцитов, 0.1% раствора пептона, 10 сахарозы, 20 глюкозы, 5 яичного альбумина и 10% снятого молока. Защитные вещества добавляли в той последовательности, которая обеспечивала бы контакт клетки сначала с веществом, проникающим внутрь нее, а затем с обволакивающим веществом. Для обеспечения тесного контакта защитных веществ с клетками ампулы с материалом перед лиофилизацией выдерживали 1 час в термостате при  $22^{\circ}$ . Разлитый в ампулы материал в течение 15 мин. охлаждали до температуры  $-22$  или  $-23^{\circ}$ , после чего ампулы подключали к портативной сушильной установке коллекторного типа с рабочим вакуумом 0.05 мм рт. ст. Заданную температуру охлаждения материала поддерживали в течение 6 час., пока происходило удаление свободной воды. Затем охлаждение прекращалось и досушивание проводилось в течение еще 2—3 час. при комнатной температуре ( $20-22^{\circ}$ ).

Наилучшим по своим защитным свойствам оказался глицерин в концентрациях 2—5% — подвижность сохраняли 7.6—10% лептомонад. Дальнейшее увеличение его концентрации (10%) не усиливало защитного действия. Добавление к глицерину сахарозы, глюкозы и яичного альбу-

мина не повышало защитного действия (число клеток, сохранивших подвижность, оставалось в пределах 7%). Сочетание 25% кроличьей сыворотки, гемолизированных эритроцитов (8%), пептона и снятого молока не обеспечило эффективной защиты лептотомнад от гибели и повреждения подвижных клеток (1—1.5%). Препараты, высушенные с добавлением глицерина, имели вид сухой пленки, прочно прилипшей к стенкам, и растворялись в течение 2—3 мин. при энергичном взбалтывании, тогда как препараты с кроличьей сывороткой имели вид таблеток, при регидратации растворяющихся за 15—20 сек. Добавление в среду высушивания снятого молока, яичного альбумина и гемолизированных эритроцитов также не обеспечило защиту клеток; число клеток, сохранивших подвижность в этих опытах, не превышало 0.7—0.8%.

Было изучено также влияние на выживаемость лептотомнад колебаний температуры культуры в процессе высушивания. Если температура охлаждающей смеси, в которую была погружена ампула с лиофилизруемым материалом, повышалась с  $-22$ ,  $-23$  до  $-14$ ,  $-15^{\circ}$ , количество клеток, сохранивших подвижность, уменьшалось в 2—3 раза.

Изучение морфологических свойств лиофилизированной культуры и сравнение их со свойствами культуры, подвергавшейся однократному замораживанию и оттаиванию, показало, что лиофилизация вызывает более грубые морфологические изменения и обуславливает потерю подвижности большим числом клеток. В первые часы после регидратации лиофилизированные клетки, сохранившие подвижность, представляются резко деформированными и уменьшенными в размерах, мало подвижными. После экспозиции регидратированного материала в термостате при  $22^{\circ}$  в течение 18—20 час. активные движения клеток усиливаются, а морфологические дефекты становятся менее выраженными.

Таким образом, из испытанных в описанных сериях экспериментов условий наилучшая выживаемость лептотомнад при их лиофилизации достигалась при охлаждении материала перед сушкой до температуры  $-22$  или  $-23^{\circ}$  и поддержании этой температуры в течение 5—6 час., т. е. до удаления из лиофилизруемого материала практически всей свободной воды при добавлении в лиофилизруемый материал глицерина в концентрации 2—5% и использовании культур 7—9-дневного возраста. В этих условиях удавалось обеспечить выживание до 10%, а в отдельных опытах до 15% клеток.

#### Л и т е р а т у р а

- Б л а н к о в Б. И. и К л е б а н о в Д. Л. 1961. Применение лиофилизации в микробиологии. М.: 1—188.
- С е р е б р я к о в В. А., Ю с у п о в К. А., Ш и ш л я е в а - М а т о в а З. С. и Н и Г. В. 1967. Опыты по консервированию культуры *L. tropica major* при помощи лиофильного высушивания. Матер. первой межреспубл. научн. конф. для республик Средней Азии и Казахстана. Ташкент: 44—46.
- С м и т О. (S m i t h A. U.). 1956. Влияние низких температур на живые клетки и ткани. В кн.: Применение замораживания—высушивания в биологии. Изд. ИЛ, М.: 1—30.
- Ф р а й Р. (F r y R. M.). 1956. Консервирование бактерий. Применение замораживания—высушивания в биологии. Изд. ИЛ, М.: 1—338.
- М а z u r P. 1960. The effect of subzero temperatures on microorganisms. Recent research in freezing and drying. Edited by Parkes and Smith: 65—77.

#### LYOPHILIZATION REGIME OF THE CULTURE OF LEISHMANIA TROPICA MAJOR

K. A. Jusupov and V. Ju. Shchetkin

#### S U M M A R Y

Lyophilization regime was worked out for the conservation of the culture of *L. tropica major*. Lyophilic drying of young (7—9 day-old) cultures after their preliminary cooling to  $-23^{\circ}$ , with the use of 2% or 5% glycerine as a protective substance, at the working vacuum in the desiccator equal to 0.05 mm of mercury column and the duration of drying from 8 to 9 hours provides the preservation of mobility of 10 per cent of cells with some changes in their morphological properties.