

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И КРИОКОНСЕРВАЦИИ ПАРАЗИТИЧЕСКОГО ПРОСТЕЙШЕГО *TRICHOMONAS VAGINALIS* ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С КЛЕТОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ

Л.Ф. Литвинчук ¹, Н.В. Раздольская ², М.В. Потанчук ¹, О.В. Гаврилова ², А.М. Иванов ²

¹ФГБУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития России, ² Военно-Медицинская академия

им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, office@influenza.spb.ru

В настоящем исследовании дана краткая характеристика простейшего *Trichomonas vaginalis* (T.V.), важнейшего патогена человека, входящего в структуру инфекций, передающихся половым путем. Как следует из данных литературы, методы длительного сохранения организмов такого типа несовершенны и ограничены в сроках хранения. По существу, отсутствуют современные технологии для долгосрочной консервации подобных объектов в условиях глубокого замораживания. В задачи настоящей работы входило получение модели «паразит-хозяин» *in vitro* для последующего накопления достаточного количества жизнеспособных и активных простейших и, на основе техники криоконсервации клеточных культур, проведение глубокого замораживания накопленной популяции трихомонад. Было подготовлено и криоконсервировано 6 штаммов T.V., полученных от больных трихомониазом. При консервации в жидком азоте в течение 2-х лет все штаммы сохранили подвижность, характерную морфологию и способность инициировать инфекционный процесс на клеточных культурах.

Ключевые слова: культивирование *Trichomonas vaginalis*, криоконсервация, криопротекторы, глубокое замораживание простейших, криобанки.

В последние годы сформировался устойчивый интерес к долгосрочному сохранению микроорганизмов как к компоненту биологического разнообразия. Микроорганизмы не менее значимы и как патогены человеческой популяции. Криобанки инфекционных возбудителей человека – необходимый современный базис для решения многих проблем: научно-медицинских, информационных, практических и экономических. Создание таких криобанков позволит сохранить популяции инфекционных возбудителей человека для перспективных и, что не менее важно, ретроспективных исследований изменчивости их свойств. На

охарактеризованных коллекционных моделях возможно тестирование фармпрепаратов и более углубленное изучение тонких механизмов патогенеза.

В структуре инфекций, передающихся половым путем (ИППП) инфекция, вызываемая паразитическим простейшим *Trichomonas vaginalis* (T.V.), занимает около 25%. Являясь многоочаговой инвазией, трихомонады способны поразить у мужчин уретру, семенные пузырьки, предстательную железу, мочевой пузырь и лоханки; у женщин – преддверие влагалища, само влагалище, придатки яичников, маточные трубы, матку. До 65% выявляемого трихомониаза носит транзиторный или бессимптомный характер. Инфицирование T.V. урогенитальных путей мужчин и женщин даже в бессимптомной форме приводит к нарушению экологического равновесия микробиоценоза, поддерживающего нормальный гомеостаз организма. Вследствие этого наблюдается снижение колонизационной резистентности слизистых, что способствует формированию новых микробных ассоциаций с патогенными тенденциями. При отсутствии выраженной симптоматики инфекционного заболевания трихомониазом существенно снижается качество жизни пациента. Медицинская проблема дополняется социальным компонентом (1, 2, 3, 4).

Проблема долгосрочного сохранения T.V. возникла перед исследователями сразу после выделения их из природных очагов и установления научно-практической значимости этого возбудителя для человеческой популяции. В ряде работ разных лет криоконсервации подвергались суспензионные (или бульонные) культуры, полученные в результате посева патологического материала на селективные среды. В качестве основной среды для криоконсервации использовали именно такую среду с добавлением самых разнообразных криопротекторов. Применяли глицерин, ДМСО, пропандиол, поливинилпирролидон, пропилен, этиленгликоль и др. Использовались разные режимы замораживания, включая быстрое (150°/мин) с 20% ДМСО. Концентрации криоконсервируемых простейших находились в пределах 100/мл – 10⁶/мл, что явно недостаточно. Низкие концентрации T.V. могут быть следствием некультивируемости их *in vitro* в бесклеточных системах. Дальнейшее сохранение проводилось, как правило, при температуре -70°С – -80°С. Высказывалось мнение о губительном для T.V. сохранении в жидком азоте. Несмотря на разнообразие предлагаемых методов, срок сохранения ограничивался, как правило, 0,5-1 годом (5, 6, 7, 8, 9). Предлагаемые в процитированных выше работах условия, принципы и уровень протекции простейших при криоконсервации являются, безусловно, паллиативным средством с заведомо ограниченными результатами в длительности хранения и логичной утратой при

этом биосинтетического потенциала. В настоящее время отсутствует технология долгосрочного хранения простейших в условиях глубокого замораживания.

T.V. является легко разрушающимся в процессе охлаждения одноклеточным сложноустроенным организмом, размеры которого (7-30 микрон), сравнимы с культивируемыми клетками. Поэтому, перспективным, с нашей точки зрения, является использование для криоконсервации T.V. значительного научно-практического опыта криоконсервации клеточных культур. Основными задачами, которые представлялось необходимым решить для осуществления успешной и долгосрочной криоконсервации T.V., были следующие:

- подготовить высокожизнеспособную популяцию в концентрации не менее $2-3 \times 10^7-10^8/\text{мл}$ паразитического простейшего T.V. в условиях *in vitro*, максимально приближенных к естественным условиям его существования, то есть при совместном культивировании с клеточными культурам (в системе паразит-хозяин);
- отработать минимальную эффективную дозу быстро проникающего криопротектора ДМСО с целью уменьшения его токсического действия и оптимизировать состав криозащитной среды;
- подобрать температурный режим охлаждения для последующего длительного хранения в условиях глубокого замораживания, то есть в жидком азоте при температуре -196°C .

При условии выполнения поставленных задач, возможно формирование современной охарактеризованной криоколлекции различных штаммов паразитического простейшего T.V., близких к ним организмов и их длительное хранение. Очевидно, что существование такой коллекции невозможно без информации о каждом объекте. Поэтому в задачи исследования входила и попытка сформулировать объем и схему информации о каждом штамме T.V., т.е. предложить возможный вариант паспорта.

Материал и методы

Штаммы *Trichomonas vaginalis* были выделены из 9 клинических образцов урогенитального материала больных острым трихомониазом при посеве их на селективную среду ТУМ с добавлением 10% сыворотки КРС (Биолот). В течение 3-4 суток патологический материал культивировался при 37°C , затем полученная бульонная культура подвижных простейших центрифугировалась при 1500 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Для дальнейших исследований полученный осадок переносили на монослой клеточной культуры в концентрации $5 \times 10^4 - 5 \times 10^5/\text{мл}$. Как правило, патологический изолят

исходного материала оказывался значительно загрязненным сопутствующей бактериальной и микотической флорой, поэтому бульонная культура и, далее, инфицированная клеточная культура в той или иной степени содержали эти загрязнители, что легко определялось при прижизненной микроскопии. Оказалось, что культуры трех из девяти исходных штаммов содержали низкую концентрацию подвижных Т.У. и значительное количество посторонних загрязнителей, явно угнетающих рост Т.У. Для дальнейшей работы эти образцы оказались непригодными. Поэтому для подготовки к криоконсервации было использовано 6 штаммов паразитических простейших Т.У. С целью угнетения вегетации бактериальной и микотической флоры и последующей очистки в среду культивирования добавляли комбинацию из 3-4 антибиотиков, обязательным из которых являлся амфотерицин (5 ед/мл), что существенно сдерживало рост бактериальной и микотической флоры. Были использованы следующие антибиотики: пенициллин, стрептомицин, канамицин по 400-500 ед/мл, линкомицин 300-400 ед/мл и гентамицин 300 ед/мл. Комбинация антибиотиков подбиралась эмпирически в зависимости от конкретных результатов той или иной стадии обработки. Дополнительная очистка проводилась путем многократного пассирования на клеточных культурах. При последовательном инфицировании простейшими клеточного монослоя начальные концентрации в питательной среде находились в пределах $1-5 \times 10^3-10^5$ /мл.

Клеточные культуры, используемые в настоящем исследовании, являются коллекционными линиями ФГБУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития России. Это известные и широко используемые линии различного видового и тканевого происхождения: HEp-2, L-41, MA-104, MDCK, Vero, L-929. Линии имели паспорта и были свободны от загрязнителей. Для культивирования всех видов клеток была использована комбинация сред α MEM/199 в соотношении 1:1 с добавлением 5% сыворотки крови КРС или 5% сыворотки эмбрионов коров (все – производства «Биолот»). При культивировании клеток использовался антибиотик гентамицин 100ед/мл.

Совместное культивирование клеток и простейших осуществляли при 37°C. Клеточные культуры для инфицирования простейшими выращивали в пластиковых 6-, 12-, 24-луночных планшетах и пластиковых флаконах 25 см² (Orange Scientific, Бельгия). Прижизненные наблюдения осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Telaval. Для контроля контаминации и проведения более детальных исследований готовили препараты инфицированных клеточных культур, выращенных на покровных стеклах. Препараты

фиксируют 96%-ным охлажденным этиловым спиртом в течение 10 мин и окрашивают при комнатной температуре по Романовскому–Гимза. Анализируют препараты с помощью микроскопа МББ–1. Подсчеты клеток и простейших осуществляют с помощью камеры Горяева при окрашивании материала 0,4%-ным раствором трипанового синего.

Криоконсервацию T.V. осуществляли, исходя из принципов, принятых для клеточных культур, с уточнением отдельных параметров для исследуемого объекта. В качестве криопротектора использовали ДМСО. Суспензию, состоящую из простейших, клеток L-41, и содержащую криопротектор, разливали по криопробиркам. Замораживание подготовленного материала проводили в 96%-ном этиловом спирте с помощью последовательного добавления жидкого азота. В предварительных опытах по криоконсервации был испытан следующий режим охлаждения: от +4° до -30°С материал охлаждался со скоростью 1 градус в минуту, от -31° до -55°С - со скоростью 5 градусов в минуту, затем следовало быстрое охлаждение до -65° -70°С и погружение в жидкий азот. Размораживание проводилось обычным способом, как это принято для клеточных культур: помещение криопробирок с материалом из жидкого азота в воду с температурой +45 - +50°С. Пробное восстановление T.V. было произведено непосредственно после погружения в жидкий азот и через 7 дней хранения. Жизнеспособность T.V. составила 80-90%, что соответствовало исходному состоянию. Во всех последующих экспериментах был использован именно этот режим замораживания. Криоконсервации были подвергнуты 6 штаммов T.V.

Для всех криоконсервированных штаммов T.V. жизнеспособность определялась в течение всего срока хранения (2 года): через 1-2 месяца, 6 месяцев, 1 год и 2 года. При восстановлении проводили окрашивание 0,4%-ным раствором трипанового синего на нулевом пассаже и титрование заражающей дозы на монослой клеток 12- или 24- луночного планшета.

Результаты и обсуждение

Биологические свойства и строение *Trichomonas vaginalis*.

Протозойное паразитическое простейшее T.V., являющееся причиной строго антропонозного воспалительного заболевания урогенитальных путей человека, было открыто Альфредом Донне в 1836 г. как влагалищный паразит (1). Несмотря на относительно небольшие размеры (7-30 микрон), T.V. имеет довольно сложное строение (рис.1).

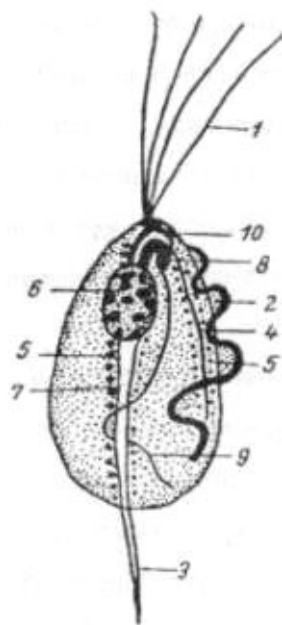


Рис 1. Схема строения клетки урогенитальной трихомонады (Суханова, 2000).

1 – жгутики, 2 – ундулирующая мембрана, 3 - шипик, 4 – коста, 5 – гидрогеносомы, 6 – ядро, 7- аксостиль, 8- парабазальное тело, 9 – парабазальный филамент, 10 – пельта.

От переднего конца клетки отходит 5 жгутиков, 4 из которых направлены вперед, а 5-й (возвратный или рекуррентный) жгутик – к заднему концу клетки. Ядро имеет структуру, характерную для большинства ядер эукариот, окружено 2-х-слойной ядерной мембраной и смещено к передней части клетки. Вдоль всего тела простейшего проходит так называемая ундулирующая мембрана, являющаяся, наряду со жгутиками, органоидом движения. Комплекс этих структур может выполнять поступательные и вращательные движения T.V., что является важным при передвижении в вязкой межклеточной среде макроорганизма. Структуры аксостиль, коста и пельта являются элементами цитоскелета. Аксостиль проходит по всей длине клетки и его задний конец выдается наружу в виде шипика. Особенностью T.V. является отсутствие в цитоплазме типичных митохондрий. Неким аналогом митохондрий принято считать гранулярные структуры гидрогеносомы. В цитоплазме визуализируются лизосомоподобные структуры – фагосомы. T.V. имеет диплоидный набор хромосом $2n=6$, но половой процесс неизвестен. Исследования *in vitro* по совместному культивированию T.V. с лактобациллами, стафилококками, лейкоцитами и эритроцитами продемонстрировали фагоцитарную активность T.V. в отношении всех перечисленных бактерий и клеток. Феномен

обнаружения *in vivo* бактерий и вирусов человека внутри цитоплазмы T.V. мало изучен и требует дальнейшего детального исследования (1, 10, 11, 12).

Нормативные документы РФ по лабораторной диагностике трихомониаза регламентируют дифференцировку исключительно типичных грушевидных форм T.V., которые при остром трихомониазе легко идентифицируются при микроскопии нативных изолятов благодаря своей подвижности (13). Тем не менее, многолетними исследованиями отечественных и зарубежных авторов продемонстрировано существование T.V. в материалах от больных трихомониазом одновременно в 3-х морфологических формах или морфотипах: грушевидная жгутиковая, обладающая подвижностью, амебоидная и округлая. Установлено, что переход от одного фенотипа к другому сопровождается корреляционной изменчивостью внутреннего строения. Патогенетический смысл морфотипов T.V. и их жизненный цикл активно обсуждается на протяжении многих лет. Фенотипическая изменчивость паразитического T.V. *in vivo* обусловлена, по-видимому, постоянно меняющимися условиями внутренней среды макроорганизма, влиянием нейрогуморальных и иммунных факторов, а также конкурентными метаболическими взаимоотношениями с биоценозом ацидофильной и анаэробной микрофлоры человека. В настоящее время представляется убедительной точка зрения, характеризующая округлые и амебоидные морфотипы не как дегенеративные или тупиковые формы T.V., а как одну из стадий их жизненного цикла, а именно: стадию непосредственной адгезии на эпителиальную клетку и последующее её разрушение, т.е. проявление цитотоксичности по отношению к клетке хозяина. Этот факт продемонстрирован в многочисленных экспериментах *in vitro*, в том числе и в работах авторов этой статьи (4, 14, 15, 16, 17, 18, 19).

Культивирование *Trichomonas vaginalis*.

На первом этапе настоящего исследования необходимо было выбрать наиболее оптимальную клеточную линию для подготовки и накопления достаточного количества жизнеспособных T.V. при проведении криоконсервации. Для первичного заражения клеток 2-х - 4-х суточную бульонную культуру T.V. в селективной бесклеточной среде ТУМ с добавлением сыворотки КРС центрифугировали и осадок простейших наносили на клеточный монослой в концентрации 2×10^3 - 10^5 /мл. В начале исследования были произвольно использованы клетки L-41. Разрушение клеточного пласта и накопление T.V. происходили в течение 24-48 часов и зависели от исходного материала. В результате полной деструкции клеток популяция T.V. увеличивалась, как правило, в несколько раз. Контроль осуществлялся

при прижизненной микроскопии и на окрашенных препаратах. Второй и последующий пассажи для накопления биомассы простейших не представляли особой трудности. На пассажах концентрация T.V. могла достигать 2-3-х 10^8 /мл. В течение 8-12 часов после разрушения клеточного монослоя T.V. сохраняли высокий пролиферативный и жизненный потенциал, далее отмечались процессы старения, выражающиеся в уменьшении количества и подвижности T.V. При заражении клеточного монослоя линий HEp-2, L-41, MA-104, MDCK, Vero, L-929 дозами T.V. 10^5 и 10^6 /мл были прослежены скорость и характер разрушения монослоя и клеток. Хотя принципиальных отличий в деструктивных процессах и в количестве получаемых T.V. выявлено не было, дольше всего процесс разрушения длился на клетках Vero и L-929; средние показатели были характерны для клеточных линий MA-104 и MDCK. Монослои клеточных линий HEp-2 и L-41 разрушались наиболее быстро. Неодинаковая чувствительность клеточных линий определялась, по-видимому, не только самой природой клеток, но и гистотипической структурой монослоя. Для последующей работы была выбрана линия L-41 как удобная, простая в культивировании, активно пролиферирующая клеточная линия, характеризующаяся выраженными адгезивными свойствами и высокой плотностью насыщения монослоя. Накопление T.V. в любых количествах при использовании клеток L-41 не представляло больших трудностей.

Трудноразрешимой проблемой оказалась деконтаминация штаммов T.V. от бактериальной и микотической флоры, полученной из первичного патологического изолята. Ситуация усугублялась тем, что при культивировании T.V. на культуральных средах, дополненных ростовыми факторами клеток, активно размножались не только T.V., но и ассоциированные с ними контаминанты. Необходим был комплекс мер, направленных на сдерживание активного роста контаминантов и, по возможности, удаления их из среды культивирования. Для этого в среду вводили комплекс подобранных эмпирически 3–4-х антибиотиков с увеличенными в 4-6 раз дозами по сравнению с профилактическими. Обязательно добавлялся амфотерицин, доза которого была увеличена в 2 раза. В дополнение к культивированию в присутствии антибиотиков был использован достаточно эффективный, как оказалось, метод разделения популяции T.V. и сопутствующих контаминантов. Для этого клетки L-41 выращивали до плотного монослоя в нескольких пластиковых флаконах (25 см²). Затем на монослой наносилась 1/3–1/2 суспензии T.V. от предыдущего пассажа после полного разрушения монослоя вместе с питательной средой и детритом и выдерживалась 2-3 часа при 37°C. Затем среда сливалась, монослой осторожно споласкивался теплой средой и заливался

новой порцией среды с усиленной дозой антибиотиков. Далее культивирование T.V. снова проходило до полного разрушения клеточного монослоя (24-36 часов) и 1/3 полученной суспензии трихомонад переносилась на новый монослой клеток L-41. Описанная процедура повторялась многократно. Комплексы антибиотиков, временные интервалы, заражающие дозы подбирались эмпирически в зависимости от конкретных результатов. Контроль осуществлялся с помощью микроскопирования нативных и окрашенных препаратов. Можно было добиться такого состояния популяции T.V., при котором на окрашенных препаратах активно вегетирующая сопутствующая бактериальная флора не идентифицировалась. От микотической составляющей ассоциированных с T.V. контаминантов вышеописанными процедурами удавалось избавиться полностью в течение нескольких пассажей, о чем свидетельствовало отсутствие дрожжеподобных и мицелиальных элементов гриба при длительном культивировании популяции простейших и при их культивировании после криоконсервации. Полностью избавиться от бактериальной флоры оказалось практически невозможным.

Процесс размножения T.V. сопровождался проявлением феномена активного фагоцитоза ими бактерий, которые, возможно, достаточно длительное время сохраняют свою жизнеспособность в фагоцитированном состоянии, в том числе и в процессе криоконсервации. Популяцию T.V. считали условно деконтаминированной и готовой к криоконсервации при отсутствии на окрашенных препаратах вегетирующей бактериальной флоры в течение 2-х – 3-х и более пассажей с интервалом пересева 48–72 часа. О высокой жизнеспособности T.V. свидетельствовала выраженная подвижность простейших и способность к развитию инфекционного процесса при небольших заражающих дозах – 200-400/мл. Как правило, процедура подготовки штамма T.V. занимала 1–2 месяца.

Криоконсервация *Trichomonas vaginalis* и характеристика криоконсервированных штаммов.

Для криоконсервации были подготовлены 6 штаммов T.V. В результате заражения 3-х пластиковых флаконов (25 см²) можно было получить 15-20 мл культуры T.V. с концентрацией 10⁷-10⁸/мл. На последнем этапе подготовки суспензии концентрат T.V. наносился на адекватную площадь клеточного монослоя L-41 с удаленной средой, т.е. 20 мл концентрированной суспензии T.V. наносились на монослой клеток во флаконе объемом 200 мл. Через 30–80 минут разрыхленный и частично разрушенный монослой можно было легко стряхнуть с подложки вместе с T.V. Полученная суспензия, как правило, содержала не менее 2 x 10⁸/мл простейших и могла быть далее сконцентрирована или подвергнута

криоконсервации в исходной концентрации. В качестве криопротектора был использован ДМСО. Для уточнения минимальной концентрации ДМСО была проведена пробная криоконсервация одного штамма T.V. с 3%, 5% и 10% ДМСО. Каждый вариант был восстановлен сразу после замораживания и через месяц хранения в жидком азоте. Для каждого варианта было восстановлено по 3 криопробирки с материалом и определена доля жизнеспособных T.V. и минимальная заражающая доза. Существенных отличий между вариантами с 5 и 10% ДМСО на нулевом пассаже и после месяца хранения обнаружено не было. Жизнеспособность простейших, криоконсервированных с 3% ДМСО, после месяца хранения снизилась на 25%. Исходя из полученных результатов, основную криоконсервацию всех штаммов проводили с 5% ДМСО. Таким образом, подготовленная к криоконсервации суспензия для каждого штамма T.V. состояла из кондиционированной культуральной среды (75%), содержащей концентрат T.V. ($2-3 \times 10^7-10^8/\text{мл}$), клетки L-41 и клеточный детрит, сыворотку КРС или эмбрионов коров (20%) и ДМСО (5%). Полученную суспензию разливали по криопробиркам и замораживали в соответствии с режимом, изложенным в разделе «Материал и методы».

6 криоконсервированных штаммов T.V. хранятся в криохранилище более 2-х лет. Контрольные размораживания простейших проводили через 1-2 месяца, 6 месяцев, 1 и 2 года. В течение первого года хранения количество жизнеспособных особей T.V. сократилось на 15-25% от исходного состояния, а к концу второго года - на 25–30%. Следует отметить, что и к концу второго года хранения при восстановлении T.V. с использованием клеточной культуры, простейшие приобретают подвижность через 10–15 мин после инфицирования ими клеток. При увеличении заражающей дозы быстро развивается инфекционный процесс, разрушается монослой и популяция T.V. быстро восстанавливается.

Возможность длительного хранения T.V. в условиях глубокого замораживания позволяет создать криобанк длительного хранения патогенных простейших, входящих в структуру ИППП. Предлагаемый ниже проект характеристики (паспорт) можно считать предварительным обобщением научно-практического опыта исследований авторов в течение нескольких лет по лабораторной диагностике и культивированию T.V. *in vitro*. Характеристика штамма дана на основе схемы паспорта коллекционной клеточной линии.

Характеристика штамма паразитического простейшего *Trichomonas vaginalis* Donne

Коллекционный номер, обозначение (наименование) штамма _____

Биологический вид, классификация _____

Автор, публикация _____

История происхождения штамма

Дата, географическое место выделения T.V. _____

Клинические данные о пациенте (диагноз, характеристика патологического изолята, сопутствующие инфекции, методы выделения и диагностики) _____

Сведения о безопасности материала (наличие у пациента СПИДа, гепатита и прочих опасных сопутствующих инфекций) _____

Морфологическая характеристика in vivo и in vitro _____

Характеристика вирулентности (степень манифестации инфекционного процесса in vivo и in vitro, маркеры вирулентности) _____

Условия и параметры культивирования in vitro (клеточные линии, среды, сыворотки, антибиотики, пассажы и дозы заражения in vitro) _____

Криоконсервация. Состав замораживаемой суспензии: ростовая среда, T.V. (концентрация), клеточная линия, сыворотка, антибиотики, ДМСО _____

Определение жизнеспособности после криоконсервации (доля T.V., окрашенных трипановым синим на нулевом пассаже в %, и определение минимальной заражающей дозы на клеточных культурах in vitro) _____

Контроль контаминации _____

Контроль видовой идентичности _____

Кариология _____

Другие характеристики и особенности штамма (биохимические маркеры, клонирование, феномен внутриклеточного фагоцитоза) _____

Область применения _____

Коллекции _____

Многие положения данной характеристики являются дискуссионными и требуют развернутых обсуждений и, по мнению многих авторов, не имеют еще достаточно убедительных данных. Например, такой показатель как маркер вирулентности, то есть степени манифестации инфекционного процесса in vivo, логично мог бы быть протестирован in vitro на клетках, но не все авторы с этим согласны. Мало изучен такой феномен трихомонад как способность к фагоцитозу. Продемонстрирована способность T.V. фагоцитировать клетки, дрожжеподобные элементы гриба, бактерии и вирусы (герпес), но не решен вопрос о сохранении жизнеспособности фагоцитированных агентов. Если экстраполировать эти

данные и на более опасные инфекции, такие как СПИД и гепатит, то очевидно, что и степень опасности работы с T.V. и контроля штаммов T.V. должны быть расширены. На основании многолетнего опыта работы с T.V. можно сделать заключение, что этот организм может представлять интерес не только как патоген человека, но и как объект со сложной организацией, с высоко плеiomорфными потенциями, непростым жизненным циклом. T.V. может эффективно использоваться как модель и инструмент исследования в экспериментальной медицине и биологии.

Список литературы

1. **Дмитриев Г.А.** Лабораторная диагностика бактериальных урогенитальных инфекций. М. «Мед. книга» - Н.Новгород. Изд-во НГМА. 2003, 336 с.
2. **Клименко Б.В., Авазов Э.П., Барановская В.Б.** Трихомониаз мужчин, женщин и детей. СПб, «Сюжет». 2001, 183 с.
3. **Скрипкин Ю.К., Шарапова Г.Я., Селицкий Г.Д.** Инфекции, передаваемые половым путем: практическое руководство. М. 2001, 368 с.
4. **Раздольская Н.В.** Диагностическое значение цитоморфологических, культуральных и иммуногенных свойств *Trichomonas vaginalis*. Автореф. канд. дисс. СПб. 2009, 24 с.
5. **Christian R.T., Miller N.F., Ludovici P.P., Riley G.M.** A study of *Trichomonas vaginalis* in human cell culture. Am.J.Obst.& Gynec. 1963, 1: 947-954.
6. **Беднова В.Н., Кисина В.И., Данилова Т.Н., Каменецкая С.Б., Нарзикулов Р.М.** Способ длительного сохранения штаммов влагалищной трихомонады. Вестник дерматологии и венерологии. 1990, 10: 24-26.
7. **Miyake Y., Karanis P. Uga S.** Cryopreservation of protozoan parasites. Cryobiology. 2004, 48: 1-7.
8. **Matsuo J.** A simple and rapid method for cryopreservation of *Trichomonas vaginalis*. Parasitol. Res. 2007, 101: 907-911.
9. **Barchardt K.A.** A new method for extended trichomonad storage. Sex Transm. Infect. 2004, 80: 74-78.
10. **Суханова К.М.** Протисты. Часть 1. Руководство по зоологии. СПб. Наука. 2000, 368 с.
11. **Карпов С.А.** Строение клетки протистов. СПб. «ТЕССА». 2001, 382 с.
12. **Yuh Y.S., Lied J.Y., Shaio M.F.** Chromosome number of *Trichomonas vaginalis*. J. Parasitol. 1997, 83. 3: 551-553.
13. Национальный стандарт «Урогенитальный трихомониаз, неосложнённая форма», проект. Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии. М. 2008.
14. **Alderete J.F., Pearlman E.** Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. Br.J.Vener.Dis. 1984, 60: 99-105.
15. **Alderete J.A., Demes P., Gombosova A., Valent M.** Specific Parasitism of Purified Vaginal Epithelial Cells by *Trichomonas vaginalis*. Infection and Immunity. 1988, 56. 10: 2558-2562.
16. **Jesus J.B., Vannier-Santos M.A., Britto C., Godefroy P.** *Trichomonas vaginalis* virulence against epithelial cells and morphological variability: the comparison between a well-established strain and a fresh isolate. Parasitol. Res. 2004, 93: 369-377.
17. **Rojas L., Sariego I., Fraga J., Sarria C.A.** Use of in vitro cytoadherence assays in the comparative study of the virulence of isolates of *Trichomonas vaginalis*. Parasitol. Res. 2004, 93: 332-337.

18. **Раздольская И.В., Литвинчук Л.Ф., Иванов А.М., Гаврилова О.В.** Инфицирование клеточных культур паразитическими простейшими *Trichomonas vaginalis*. Бюлл. Моск. общ. испыт. природы. 2009, 114, 2: 88-89.
19. **Gilbert R.O., Ella G., Beach D.H.** Cytopathogenic Effect of *Trichomonas vaginalis* on Human Vaginal Epithelial Cells Cultured In Vitro. Infection and Immunity. 2000, 68, 7: 4200-4206.