

Влияние режимов охлаждения на содержание реактивных форм кислорода в клетках *Candida albicans*

А.Ю. Сиренко, П.М. Зубов, О.А. Михайлова, В.Ф. Марценюк
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cooling Regimens on Content of Reactive Oxygen Species in *Candida albicans* Cells

A.YU. SIRENKO, P.M. ZUBOV, O.A. MIKHAYLOVA, V.F. MARTSENYUK

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Криоконсервирование – наиболее эффективный метод длительного хранения микроорганизмов, широко используемый в практике коллекций и банков микроорганизмов. Тем не менее процесс криоконсервирования может индуцировать различные стрессы за счет формирования внутриклеточного льда, осмотического шока или токсичности криопротекторов с развитием окислительного стресса, результатом которого может стать образование реактивных форм кислорода (РФК), вызывающих необратимые повреждения клеток и их дисфункцию.

Цель работы – сравнительное изучение оценки сохранности клеток *C. albicans* после замораживания по различным режимам охлаждения, учитывая способность к колониеобразованию, и определение содержания внутриклеточных РФК.

Объектом исследования были клетки *C. albicans* ATCC 885, криоконсервированные по различным режимам.

Грибы *C. albicans* выращивали на сусло-агаре, инокулировали в жидкую среду на основе суслу пивного и культивировали до стадии середины логарифмического роста. Клетки замораживали со скоростями 7 и 200°C/мин до –70°C, затем погружали в жидкий азот. В качестве среды консервирования использовали среду культивирования (с или без добавления 5%-го ДМСО) или дистиллированную воду. Криоконсервированные образцы размораживали на водяной бане, переводили в фосфатный буфер. Количество целых клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли “чашечным” методом Коха. Содержание РФК в клетках *C. albicans* исследовали с помощью проточного цитофлуориметра (FACSCalibur, BD, USA) и лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 meta (Carl Zeiss, Германия). При измерении содержания внутриклеточных РФК использовали 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFH-DA). Полученные результаты обрабатывали с помощью программ WinMDI 2.9 и LSM Image Examiner.

Результаты проведенного исследования показали, что жизнеспособность клеток *C. albicans* в процессе криоконсервирования зависит от режимов охлаждения и состава среды консервирования. Наиболее высокие показатели обеспечивал режим замораживания со скоростью 7°C/мин в среде, содержащей 5%-й ДМСО. Было также установлено, что показатели содержания РФК в клетках *C. albicans* коррелировали с потерей жизнеспособности клеток после криоконсервирования. Это позволяет предположить, что РФК накапливаются в клетках, потерявших способность к колониеобразованию, т. е. в клетках, получивших в процессе криоконсервирования летальные и условно-летальные повреждения. Определение содержания РФК с помощью зонда DCF может быть использовано для оценки сохранности функциональных свойств микробных клеток после криоконсервирования.

Cryopreservation is the most efficient method of long-term storage of microorganisms and it is widely used in the practice of collections and banks of microorganisms. Nevertheless, the process of cryopreservation may induce different stresses due to the formation of intracellular ice, osmotic shock or toxicity of cryoprotective agents with the development of oxidative stress, the result of which may be the formation of reactive oxygen species (ROS) causing the irreversible damages of cells and their dysfunction.

The research aim was a comparative study of the assessment of cell integrity of *C. albicans* cells after freezing according to different cooling regimens, considering the ability to colony formation and examining the content of intracellular ROS.

As the research object there were used *C. albicans* cells ATCC 885, cryopreserved according to different regimens.

The *C. albicans* fungi were grown on wort-agar, inoculated into liquid medium based on beer wort and cultured up to the stage of the middle of logarithm growth. The cells were frozen with the rates of 7 and 200°C/min down to –70°C, then they were immersed into liquid nitrogen. As the cryopreservation medium there was used the culturing one (with or without adding 5% DMSO) or distilled water. Cryopreserved samples were thawed on water bath and then removed into phosphate buffer. The number of integral cells was counted in Goryaev's chamber. Cell viability was examined with “plate” Koch's method. The content of ROS in *C. albicans* cells was examined with flow cytometer (FACS Calibur, BD, USA) and laser scanning confocal microscope LSM 510 meta (Carl Zeiss, Germany). When measuring the content of intracellular ROS the 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate was used. The obtained results were processed with the software WinMDI 2.9 and LSM Image Examiner.

The results of performed study have shown that viability of *C. albicans* cells during cryopreservation depends on cooling regimens and composition of the cryopreservation medium. Higher indices were provided with freezing regimens with the rate of 7°C/min in the medium, containing 5% DMSO. There was also established that indices of ROS content in *C. albicans* cells correlated with the loss of cell viability after cryopreservation. This allows us to suppose that ROS are accumulated in cells that lost the ability to colony formation, *i. e.* in the cells which were lethally or relatively lethally damaged. The examining of ROS content with DCF probe may be used for assessment of integrity of functional properties of microbe cells after cryopreservation.