

# Сохранность генетических структур дрожжеподобных грибов *Candida albicans* после долгосрочного хранения при $-196^{\circ}\text{C}$

А.Ю. АРТУЯНЦ, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Integrity of Genetic Structures of Yeast Fungi *Candida albicans* after Long-Term Storage at $-196^{\circ}\text{C}$

A.YU. ARTUYANTS, I.P. VYSEKANTSEV

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

Грибы рода *Candida* являются возбудителями целого ряда заболеваний – кандидозного вульвовагинита, кандидоза кожи, висцеральных и генерализованных кандидозов, внутригоспитальных инфекций. При иммунодефицитах различного генеза, в том числе при ВИЧ-инфекции, они вызывают висцеральные и генерализованные кандидозы, поражения органов дыхания и желудочно-кишечного тракта. Возникла необходимость в создании коллекций клинических изолятов грибов рода *Candida*, выделенных из разных биотопов. Ранее нами была показана сохранность после криоконсервирования различных генетически детерминированных биологических свойств грибов *Candida albicans*, которые используются для индикации, идентификации и являются факторами патогенности.

Целью данного исследования было изучение сохранности генетических структур грибов *C. albicans* после криоконсервирования по ранее изученным режимам, а также долгосрочного хранения в жидком азоте в течение четырех лет (срок наблюдения).

Объектом исследования были криоконсервированные в различных условиях и нативные дрожжеподобные грибы *C. albicans* ATCC 885. В качестве среды консервирования использовали дистиллированную воду, среду культивирования (сусло пивное), среду культивирования с добавлением 5% ДМСО. Клетки замораживали со скоростью 7 град/мин до  $-40^{\circ}\text{C}$  в программном замораживателе биообъектов «Cryoson» с дальнейшим погружением в жидкий азот. Часть образцов замораживали путем погружения их в жидкий азот. Для определения температурозависимых мутантов размороженные и посеянные образцы инкубировали при  $22^{\circ}\text{C}$  в течение 5 суток, затем выросшие колонии нумеровали, каждую из них пересеивали на свежую среду и инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 48 ч. Сохранность структурного участка ДНК *C. albicans* в процессе криоконсервирования определяли методом ПЦР по стандартной методике, используя набор «Ампли СеНС-50 *Candida albicans*-500».

Исследования показали, что использование вышеуказанных режимов охлаждения как после кратковременного, так и последующего хранения в течение четырех лет не приводило к образованию после криоконсервирования температурозависимых мутантов, т. е. все колонии давали рост при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Также установлено, что криоконсервирование и последующее долгосрочное хранение не вызывали повреждений специфического структурного участка ДНК *C. albicans* длиной 500 пар нуклеотидов, который является матрицей для дальнейшей амплификации в полимеразной цепной реакции. Полученные результаты свидетельствуют о сохранности генетических структур грибов в процессе криоконсервирования.

Fungi *Candida* are pathogenic agents of some diseases such as: candidal vulvovaginitis, cutaneous candidosis, visceral and generalized candidiasis and in-hospital infections. At immunodeficiency of various genesis, including HIV infection, they cause a visceral and generalized candidiasis, damages of respiratory system and gastrointestinal tract. There was a need in establishing the collections of clinical isolates of fungi *Candida*, derived from various biotopes. Previously we have shown the preservation after cryopreservation of different genetically determined biological properties of the fungi *Candida albicans*, used for indication, identification, and being pathogenicity factors.

The research aim was to study the integrity of the genetic structures of fungi *C. albicans* after cryopreservation according to the previously studied regimens, as well as long-term storage in liquid nitrogen during four years (observation period).

Native yeast-like fungi *C. albicans* ATCC 885 and cryopreserved under different conditions cells were the objects of the study. There were used distilled water, culture medium (beer wort), culture medium with 5% DMSO as preservation media. The cells were cooled with the rate of 7 deg/min down to  $-40^{\circ}\text{C}$  using programmable freezer Cryoson and then plunged into liquid nitrogen. Some samples were frozen by direct plunging into liquid nitrogen. To determine temperature-dependent mutants the frozen-thawed and then seeded samples were incubated at  $22^{\circ}\text{C}$  for 5 days, then grown colonies were marked, each of them subcultured on fresh medium and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 48 hrs. During cryopreservation the examining of preservation of DNA structural site of *C. albicans* was performed by PCR according to the standard method, using Ampli SeNS-50 *Candida albicans*-500 kit.

The studies have shown that using the above-mentioned cooling regimens both after short-term and further storage for four years did not result in the formation of temperature-dependent mutants after cryopreservation, i. e. all the colonies grew at  $37^{\circ}\text{C}$ . It was also found that cryopreservation and further long-term storage did not impair specific DNA structural site of *C. albicans* with 500 base pair length, which was a matrix for the following amplification in polymerase chain reaction. The obtained results testify to integrity of fungi genetic structures during cryopreservation.