

БІОЛОГІЯ

УДК 579:57.043

А.Ю. Артуянц, В.Ф. Марценюк, И.П. Высеканцев

СОДЕРЖАНИЕ РЕАКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ CANDIDA ALBICANS ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ПО РАЗЛИЧНЫМ ПРОГРАММАМ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

Работа выполнялась в соответствии с научной темой: «Вивчення впливу умов криоконсервування і зберігання на дріжджоподібні гриби, постнатальні фібробласти і культуру клітин, що переживаються»; государственный регистрационный номер темы: 0104U003919.

Вступление. Криоконсервирование является наиболее эффективным методом длительного хранения микроорганизмов, широко используемым в практике коллекций и банков микроорганизмов [9]. Процесс криоконсервирования может индуцировать различного рода стрессы за счет формирования кристаллов льда или воздействия криопротекторов с развитием окислительного стресса, результатом которого может стать образование реактивных форм кислорода (РФК).

РФК постоянно образуются в живой клетке как продукты нормального метаболизма кислорода, являясь необходимым атрибутом жизнедеятельности всех аэробных организмов. Они обеспечивают адаптивную реакцию клеток на внешние раздражители [2]. Реактивные формы кислорода образуются также под влиянием других внешних воздействий, таких как ионизирующее излучение, низкие температуры и др. Некоторые РФК могут играть роль медиаторов важных внутриклеточных сигнальных путей. Нормальные функции РФК включают на организменном уровне индукцию иммунной системы и на клеточном уровне - мобилизацию систем ионного транспорта. Однако повышенная продукция РФК может вызывать необратимые повреждения клеток и их дисфункцию (посредством апоптоза или некроза). Реализуемость того или иного эффекта зависит от силы и характера инициирующего действия, чувствительности клеток к окислительному стрессу, состояния антиоксидантной защиты и активности систем репарации [7].

Общеизвестно, что процессы кристаллообразования и выраженность повреждающих физико-химических факторов зависят от режимов охлаждения-отогрева [8].

Целью настоящего исследования являлось сравнительное изучение сохранности пролифера-

тивной активности клеток *C.albicans* и содержание в них внутриклеточных РФК после замораживания по различным режимам.

Объект и методы исследования. Объектом исследования была культура дрожжеподобных грибов *Candida albicans* ATCC 885, штамм, полученный из коллекции НИИ дерматологии и венерологии АМН Украины (г. Харьков).

Грибы *C.albicans* выращивали на скошенном сусле-агаре при температуре 30°C в течение 24 ч, затем инокулировали в жидкую среду на основе сусле пивного и культивировали 18 ч при температуре 30°C до середины стадии логарифмического роста (концентрация 2×10^7 кл./мл) [1, 3, 5].

Клетки замораживали со скоростями 7 и 200°C/мин до -70°C с дальнейшим погружением в жидкий азот. В качестве среды консервирования использовали среду культивирования, среду культивирования с добавлением 5% ДМСО, дистиллированную воду. Размораживали криоконсервированные образцы на водяной бане при 30°C. Затем клетки переводили в фосфатный буфер (рН 7.2) путем двукратного центрифугирования при 2000g. Число целых клеток с неповрежденной клеточной стенкой подсчитывали в камере Горяева. Пролиферативную активность клеток определяли «чашечным» методом Коха [6].

Содержание РФК в клетках *C.albicans* определяли с помощью проточного цитофлуориметра FACS Calibur, (BD, USA) и лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 meta (Carl Zeiss, Germany). Содержание внутриклеточных РФК измеряли с использованием 2',7'-дихлорофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA), дающего зеленую флуоресценцию. С помощью этого метода можно измерить количество H_2O_2 , образованного в результате возросшего окислительного метаболизма. Живые клетки могут деацетилировать DCFH-DA до 2',7'-дихлорофлуоресцеина, который не является флуорохромом, но может реагировать с кислородными формами внутри клетки с образованием флуоресцирующего 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCF) [11]. При определении к 50 мкл размороженных клеток добав-

ляли 2 мкл красителя, в конечной концентрации 50 мкМ, и 800 мкл фосфатного буфера. После перемешивания в течение 10 секунд, образцы инкубировали в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре. В ходе определения количества РФК в образцах обсчитывали по 20000 клеток [10]. Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью программ WinMDI 2.8 и LSM Image Examiner.

Результаты исследований и их обсуждение. Замороженные образцы хранили при температуре жидкого азота. В качестве контроля использовали культуру до замораживания. Ранее нами было установлено, что основная гибель клеток *C.albicans* происходит на этапе охлаждения и отогрева, процесс низкотемпературного хранения дополнительной гибели криоконсервированных клеток не вызывал [4]. Максимальное количество жизнеспособных дрожжеподобных грибов обеспечивало замораживание со скоростью 7°C/мин с добавлением в среду консервирования 5% ДМСО. Минимальный показатель жизнеспособности был в образцах, замороженных со скоростью 200°C в дистиллированной воде (рис.1).

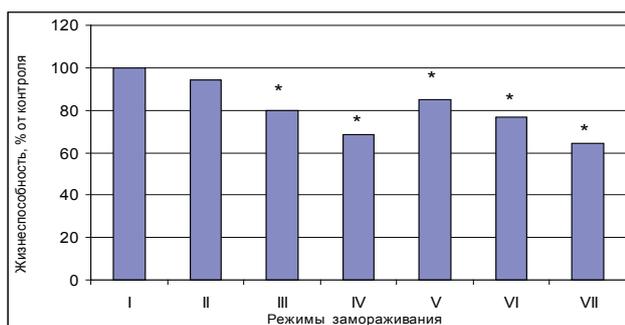


Рис. 1. Жизнеспособность дрожжеподобных грибов Candida albicans после криоконсервирования по разным режимам.

Примечание: I – контроль; II – замораживание в сусле + 5% ДМСО со скоростью 7°C/мин до -70°C с последующим погружением в азот; III – замораживание в сусле со скоростью 7°C/мин до -70°C с последующим погружением в азот; IV – замораживание в дистиллированной воде со скоростью 7°C/мин до -70°C с последующим погружением в азот; V – замораживание в сусле + 5% ДМСО со скоростью 200°C/мин до -196°C; VI – замораживание в сусле со скоростью 200°C/мин до -196°C; VII – замораживание в воде со скоростью 200°C/мин до -196°C.

На следующем рисунке (рис.2) представлены результаты, полученные при помощи проточного цитофлуориметра (левый столбец) и лазерного сканирующего конфокального микроскопа (правый столбец) по всем вариантам замораживания.

Вертикальный параметр рисунка, демонстрирующего результаты проточного цитофлуориметра (SSC-H) – боковое светорассеивание, параметр, который показывает размер клеток. Горизонтальный параметр – канал DCF. Левый

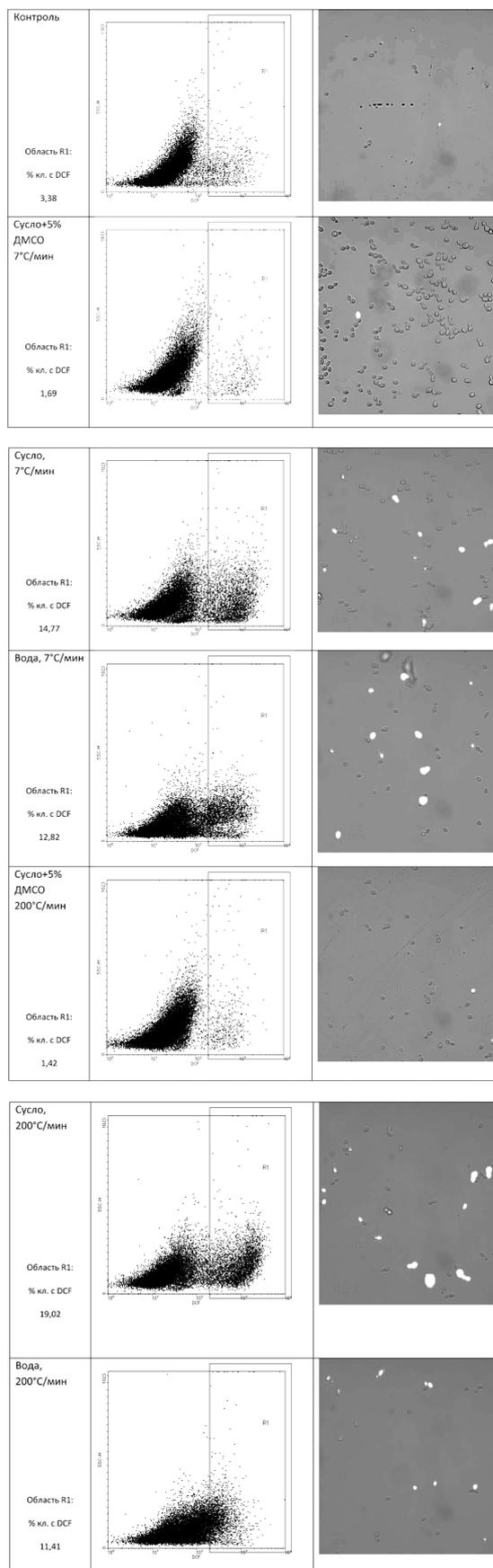


Рис. 2. Результаты, полученные при помощи проточного цитофлуориметра и лазерного сканирующего микроскопа.

квадрат – DCF-минус-клетки. Область R1 – область клеток, меченных DCF.

На рисунке, демонстрирующем результаты лазерного сканирующего конфокального микроскопа, светлые клетки – клетки с красителем DCF, темные клетки – клетки без красителя

Как видно из представленного рисунка, количество РФК в образцах варьирует в зависимости от режима консервирования.

Процент нежизнеспособных целых клеток вычисляли по данным определения концентрации целых клеток в камере Горяева и концентрации жизнеспособных клеток «чашечным» методом (табл.)

В ходе эксперимента было установлено, что показатели содержания РФК в замороженных в различных условиях клетках коррелировали с потерей жизнеспособности клеток после криоконсервирования (рис. 3).

Описание режимов замораживания представлены на рис.1.

На основе этих данных был подсчитан коэффициент парной корреляции Пирсона. Он составлял 0.9, корреляция значима на уровне 0.01, что указывает на очень высокую корреляцию этих переменных.

Выводы.

1. Жизнеспособность клеток *C.albicans* зависит от режима криоконсервирования и состава среды консервирования. Максимальный уровень сохранности жизнеспособности дрожжеподобных грибов обеспечивало замораживание со скоростью 7°С/мин до -70°С с последующим погружени-

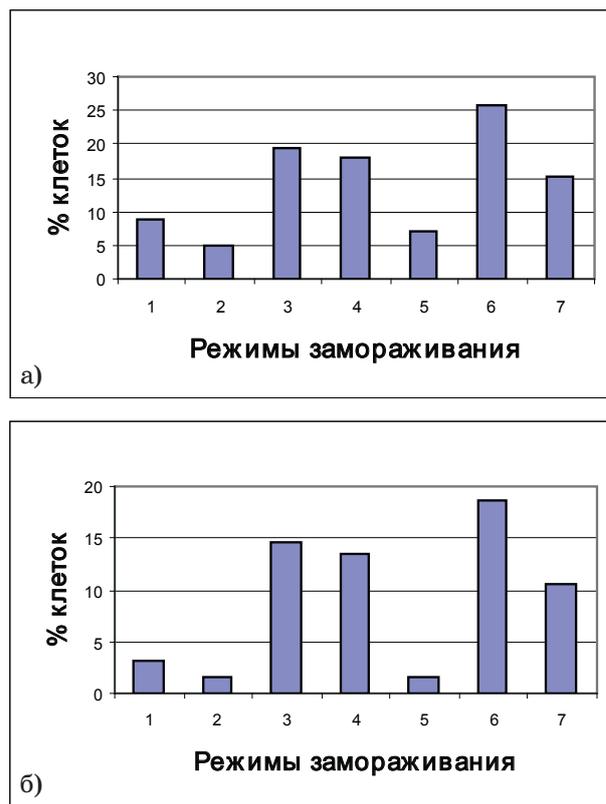


Рис. 3. Корреляция показателей содержания РФК с потерей жизнеспособности клетками: а) - % клеток с РФК; б) - % нежизнеспособных целых клеток.

Таблица

Влияние условий криоконсервирования на сохранность клеток *Candida albicans* и содержание в них РФК

Вариант опыта	Число целых клеток, x106 (камера Горяева)	Число целых клеток, % от общего кол-ва	Число поврежденных клеток, % от общего кол-ва	% клеток с РФК (флуоресценция DCF)	Кол-во жизнесп. клеток, сохранивших пролиферат. свойства, КОЕ/мл
Контроль	37,6	91,2	8,8	3,38	34,30
Сусло+5% ДМСО, 7°С/мин	35,9	95	5	1,69	34,10
Сусло, 7°С/мин	34,1	80,6	19,4	14,77	27,50
Вода, 7°С/мин	30	82,1	17,9	12,82	23,80
Сусло+5% ДМСО, 200°С/мин	34,8	93	7	1,42	32,40
Сусло, 200°С/мин	27,9	74,2	25,8	19,02	20,70
Вода, 200°С/мин	15,4	84,9	15,1	11,41	13,10

ем в жидкий азот и добавлением в среду консервирования 5% ДМСО.

2. Показатели повышения содержания РФК в замороженных образцах коррелировали с потерей жизнеспособности клеток после криоконсервирования.

3. РФК накапливаются в клетках, которые потеряли способность к колониеобразованию, т.е. в клетках, получивших в процессе криоконсервирования летальные и условно-летальные повреждения.

4. Определение содержания РФК с помощью зонда DCF может быть использовано для оценки сохранности пролиферативных свойств микробных клеток после криоконсервирования.

Перспективы дальнейших исследований. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что изучение образования реактивных форм кислорода в криоконсервированных клетках перспективно в изучении механизмов криоповреждений и выборе оптимальных режимов криоконсервирования.

Авторы статьи выражают благодарность сотрудникам отдела криоцитологии и количественной морфологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины за техническую и методическую помощь при постановке экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М.О. Биргер – М. : Медицина, 1967. – 463 с.
2. Зенков Н.К. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. – М. : Наука / Интерпериодика, 2001. – 343 с.
3. Иерусалимский Н.Д. Основы физиологии микробов / Н.Д. Иерусалимский – Изд-во Академии наук СССР, М., 1963. – 242 с.
4. Криоконсервування штамів мікроорганізмів – об'єктів нових біотехнологій: методичні рекомендації / [Грищенко В.І., Висеканцев І.П., Сіренко А.Ю. та ін.]. – Харків, 2008. – 14 с.
5. Лабинская А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие / А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, А.С. Ещина. – М. : Медицина, 2004. – 576 с.
6. Луста К.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / К.А. Луста, Б.А. Фихте – Пуццино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, – 1990. – 186 с.
7. Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков [и др.] – М. : Слово, 2006. – С. 411–413.
8. Пушкарь Н.С. Актуальные проблемы криобиологии / Н.С. Пушкарь, А.М. Белоус. – К. : Наукова думка, 1981. – 608 с.
9. Lapage S.P. Preservation of microorganisms / S. Lapage, K. Redway // Handb. microbiol., Cleveland, Ohio. – 1973. - Vol. 1. – P. 713–724.
10. Lupetti A. Internal Thiols and Reactive Oxygen Species in Candidacidal Activity Exerted by an N-Terminal Peptide of Human Lactoferrin / A. Paulusma-annema, S. Senesi, M. Campa, J. T. Van Dissel, P. H. Nibbering // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2002. – Vol. 46. – № 6. – P. 1634–1639.
11. Lyng F. M. Oxidative Stress in Cells Exposed to Low Levels of Ionizing Radiation / F. M. Lyng, C. B. Seymour, C. Mothersill // Biochemical Society Transactions. – 2001. – Vol. 29. – P. 350–353.

УДК 579:570.43

СОДЕРЖАНИЕ РЕАКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ *Candida albicans* ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ПО РАЗЛИЧНЫМ ПРОГРАММАМ

Артуянц А.Ю., Марценюк В.Ф., Висеканцев И.П.

Резюме. Исследовано жизнеспособность и содержание реактивных форм кислорода в клетках дрожжеподобных грибов *Candida albicans* ATCC 885 после криоконсервирования. Показано, что максимальный уровень сохранности жизнеспособности дрожжеподобных грибов обеспечивало замораживание со скоростью 7°C/мин до -70°C с последующим погружением в жидкий азот в среде с добавлением 5% ДМСО. Установлено, что показатели повышения содержания РФК в замороженных образцах коррелировали с потерей жизнеспособности клеток после криоконсервирования. Доказано, что РФК накапливаются в клетках, которые потеряли способность к колониеобразованию, т.е. в клетках, получивших в процессе криоконсервирования летальные и условно-летальные повреждения.

Ключевые слова: криоконсервирование, дрожжеподобные грибы, криопротекторы, жизнеспособность, реактивные формы кислорода.

УДК 579:570.43

ВМІСТ РЕАКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В КЛІТИНАХ *Candida albicans* ПІСЛЯ КРИОКОНСЕРВУВАННЯ ЗА РІЗНИМИ ПРОГРАМАМИ

Артуянц А.Ю., Марценюк В.Ф., Висеканцев И.П.

Резюме. Досліджено життєздатність клітин та вміст реактивних форм кисню в клітинах дріжджоподібних грибів *Candida albicans* ATCC 885 після криоконсервування. Показано, що максимальний рівень збереженості життєздатності дріжджоподібних грибів забезпечувало заморожування зі швидкістю 7°C/хв до -70°C з наступним зануренням у рідкий азот в середовищі з додаванням 5% ДМСО. Встановлено, що показники підвищення вмісту РФК у заморожених зразках корелюють із втратою життєздатності клітин після криоконсервування. Доведено, що РФК накопичуються в клітинах, які втратили здатність до колонієутворення, тобто в клітинах, що у процесі криоконсервування отримали летальні або умовно-летальні пошкодження.

Ключові слова: кріоконсервування, дріжджоподібні гриби, кріопротектори, життєздатність, реактивні форми кисню.

UDC 579:57.043

The CONTENT of REACTIVE OXYGEN SPECIES in *Candida albicans* cells after CRYOPRESERVATION of the VARIOUS PROGRAMS

Artuyants A.Yu., Martsenyuk V.F., Vysekantsev I.P.

Summary. The cells viability and content of reactive oxygen species in yeast-like fungi *Candida albicans* ATCC 885 were studied after cryopreservation. It has been shown that maximum level of survival of yeast-like fungi has been provided by freezing with the rate of 7°C/min down to -70°C with further plunging into liquid nitrogen and adding of 5% DMSO. It has been found that indicators of elevated ROS in frozen samples correlated with the loss of cell viability after cryopreservation. It has been proved that ROS are accumulated in cells, which lost the ability to colony formation, i.e. in cells subjected during cryopreservation to lethal and conditionally lethal damages.

Key words: cryopreservation, yeast-like fungi, cryoprotectants, viability, reactive oxygen species.

Стаття надійшла 19.11.2010 р.

УДК 616.34-002-02

Г.Ю. Підпружнікова, В.М. Кухарський, Н.В. Дзюбенко, Г.М. Толстанова

ЕФЕКТИВНІСТЬ АГОНІСТІВ D₂ ДОФАМІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ У ЛІКУВАННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м. Київ)

Робота виконана в рамках НДР біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка «Дослідження ролі дофаміну та D₂ дофамінових рецепторів в патогенезі запальних захворювань кишечника з огляду на його роль в VEGF/NPF-викликаній проникності судин товстої кишки», № держреєстрації №09ДП036-05.

Вступ. Запальні захворювання кишечника, до яких належать виразковий коліт (ВК) та хвороба Крона є одною з найбільш серйозних та невирішених проблем сучасної гастроентерології та колопроктології [1]. Ангіогенез (утворення нових кровоносних судин) є новим критичним компонентом патогенезу запальних захворювань кишечника [3, 9, 14]. Його блокада значно покращує клінічні та морфологічні ознаки хвороби [4, 6]. В наших попередніх дослідженнях нейтралізація активності фактора росту кровоносних судин (VEGF/VPF), що є найпотужнішим проангіогенним фактором та фактором проникності кровоносних судин, сприяла загоєнню виразок при йодоацетамід-викликаному ВК [11]. Аналогічні дані були отримані іншими дослідниками [14].

Нейротрансмітер дофамін через взаємодію з D₂ дофаміновими рецепторами (D₂R) справляє потужний вибірково притримуючий вплив на VEGF/VPF-викликану проникність кровоносних судин, проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин на моделях пухлин яєчників [13], раку молочної залози і товстої кишки [7] та притримчує ріст пухлин. В ендотеліальних клітинах пухлин мишей з дефіцитом D₂R та мишей з фармакологічно-зниженим рівнем дофаміну, значно підвищений рівень фосфорилування VEGF рецептора-2, що має вирішальне значення для ангіогенезу та проникності судин [8]. Більш того, клінічні та експериментальні дослідження показали зменшення рівня дофаміну, L-ДОФА (його попередника) [5, 10], а також тирозин гідроксилази (фермент, що бере участь в синтезі дофаміну) [2] при запальних захворюваннях кишечника.

Метою даної роботи було дослідити терапевтичну ефективність агоністів D₂R в патогенезі експериментального ВК у щурів.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проведені на щурах самицях лінії Вістар масою 180-230 (n=29). Йодоацетамід-викликаний ВК моделювали одноразовим ректальним введенням 0,1 мл 6%-го розчину йодоацетаміду (Sigma,