

БИОЛОГИЯ

© А.Ю. Артуянц, В.Ф. Марценюк, Т.М. Гурина, И.П. Высеканцев

УДК 57.043:528.282.23:579

А.Ю. Артуянц, В.Ф. Марценюк, Т.М. Гурина, И.П. Высеканцев

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ УСЛОВИЙ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

Candida albicans

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

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

Вступление. Как известно, криоконсервирование – наиболее эффективный метод хранения большинства видов микроорганизмов, а также других биологических объектов [1]. В настоящее время отработаны режимы криоконсервации для целого ряда видов и штаммов микроорганизмов, но универсальных способов криоконсервации не может быть. Наличие оптимальных условий замораживания объясняется созданной Р. Mazur двухфакторной теорией криоповреждения [10], согласно которой оптимальной на этапе кристаллизации консервируемой клеточной суспензии является настолько малая скорость охлаждения, что вероятность образования внутриклеточных кристаллов льда и повреждение этими кристаллами клеток являются пренебрежимо малыми, и в то же время, настолько большая, что время действия на клетки неблагоприятных факторов, обусловленных их обезвоживанием, является недостаточно большим, чтобы вызвать необратимое повреждение клеток. Более того, данная теория не только объясняет, почему значения оптимальной скорости существенно различаются для разных клеток, но и позволяет, зная геометрические и транспортные характеристики клеточных мембран, предсказать, с какой скоростью необходимо охлаждать те или иные клетки, чтобы добиться их максимальной сохранности в процессе криоконсервирования [13, 14]. Подбор эффективных условий замораживания, в соответствии с этой теорией, требует экспериментального определения режимов охлаждения и состава криозащитных сред, включая вид и концентрацию криопротекторов, т.к. влияние этих факторов в значительной мере зависит от видовых особенностей строения и биологических свойств клеток.

Целью работы являлась разработка эффективных условий криоконсервирования дрожжеподобных грибов *Candida albicans*. Для достижения поставленной цели необходимо было теоретически оценить эффективную с точки зрения двухфакторной теории криоповреждения скорость охлаждения,

экспериментально изучить влияние скоростей охлаждения при замораживании клеток *C. albicans* на их жизнеспособность и сопоставить теоретические и экспериментальные результаты для оценки порогов применимости используемых теорией математических моделей.

Объект и методы исследования.

Объектом исследования являлись дрожжеподобные грибы *Candida albicans* ATCC 885 (штамм из коллекции ГП «НИИ дерматологии и венерологии АМН Украины» г. Харьков).

Грибы выращивали на скошенном сусле-агаре при температуре 30°C в течение 48 часов, затем переводили в жидкую среду на основе сусле пивного (8% сухих веществ по Балингу [2]) и культивировали с аэрацией в термостате при 30°C в течение 24 часов (до стационарной фазы роста) [3].

Теоретическую оценку эффективной скорости охлаждения замораживаемой клеточной суспензии проводили с использованием алгоритма, описанного в [4, 7, 8, 13]. Для этого экспериментально определяли геометрические размеры клеток, коэффициент проницаемости клеточных мембран для молекул воды, долю осмотически неактивных внутриклеточных веществ, величину энергии активации процесса переноса молекул воды через клеточную мембрану и использовали известную диаграмму плавления водного раствора ДМСО.

Форму клеток аппроксимировали растянутым эллипсоидом вращения. Линейные размеры эллипсоидов (длина большой оси и длина малой оси) определяли с помощью программы AxioVision Rel. 4.6 по микрофотографиям клеток *C. albicans* (рис. 1), полученным на микроскопе LSM 510 meta в оптическом режиме. Площадь поверхности клеток, их объем и поверхностно-объемное отношение клеток вычисляли по следующим формулам, которые связывают эти параметры с линейными размерами клеток:

$$S = \frac{\pi b}{2} \left[b + \frac{a^2}{\sqrt{a^2 - b^2}} \arcsin \left(\frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{a} \right) \right] \quad V = \frac{1}{6} \pi a b^2 \quad \gamma = \frac{S}{V}$$

Коэффициент фильтрации мембран дрожжеподобных грибов определяли вольюмометрическим методом [7]. Искомое значение коэффициента фильтрации мембран *C. albicans* определялось как значение, соответствующее максимальному отклонению

теоретических данных от экспериментально определенной зависимости объема клетки от времени ее контакта с гипертоническим раствором [11, 12].

Для изучения влияния различных скоростей охлаждения на жизнеспособность дрожжеподобных грибов, суспензию клеток (объемом 1,8мл) *S.albicans* помещали в криобирки фирмы «Nunc» цилиндрической формы с рабочим объемом 2мл. В качестве среды консервирования использовали среду на основе суслу пивного с добавлением до конечной концентрации 5% и 10% ДМСО, глицерина и этанола. Суспензию грибов *S.albicans* замораживали со скоростями 0,25, 1, 3,5, 7, 10, 20 и 35°С/мин до -40°С в программном замораживателе «Cryoson» (Германия) с дальнейшим погружением в жидкий азот. Часть образцов замораживали путем погружения в жидкий азот. Образцы хранили в течение четырех лет в низкотемпературном банке ИПК и К НАН Украины.

Контролем служили клетки, которые не подвергали криоконсервированию. Размораживание образцов проводили на водяной бане при температуре 30°С.

Изучение жизнеспособности *S.albicans* проводили «чашечным методом» Коха [5], подсчитывая количество колоний, которые выросли на соответствующей питательной среде.

Статистическую обработку экспериментальных результатов осуществляли стандартным методом с использованием t-критерия Стьюдента при вероятности попадания в доверительный интервал $p \geq 0,05$, а также с помощью пакета прикладной компьютерной программы «Statistica v6.0».

Количество проб в каждой группе эксперимента составляло не менее восьми.

Результаты исследований и их обсуждение.

Линейные размеры клеток (длина большой и малой осей эллипсоида) а также объем, и площадь поверхности клеток представлены на **рис. 1**.

Для определения осмотически неактивного объема клеток *S.albicans* аппроксимировали экспериментально полученные данные о линейной зависимости объема клеток в водных растворах хлорида натрия с концентрациями 0,15, 0,3, 0,6 и 1,2М:

$$\frac{V}{V_0} = \alpha + \frac{\pi_0^{in}(1-\alpha)}{\pi^{out}},$$

где V – текущее значение клеточного объема,
 V_0 – начальное значение клеточного объема,
 α – объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ,
 π_0^{out} – осмотическое давление растворенного вне клетки вещества,
 π_0^{in} – исходное (до начала кристаллизации клеточной суспензии) осмотическое давление внутриклеточного раствора.

Значение осмотически неактивного объема для клеток получали как координату пересечения оси ординат с указанной линейной зависимостью (**рис.2**).

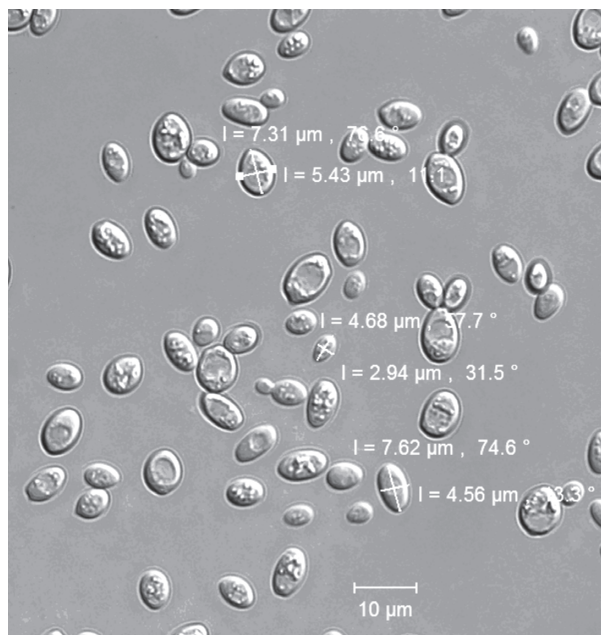


Рис. 1. Определение линейных размеров клеток *S.albicans*.

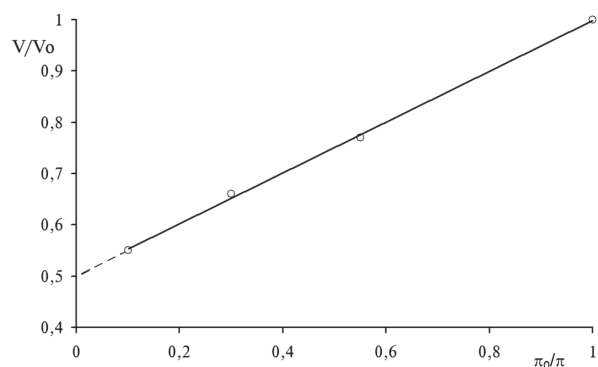


Рис. 2. Зависимость относительного объема клеток *S.albicans* от обратного приведенного осмотического давления внеклеточного водного раствора хлорида натрия.

При определении коэффициента фильтрации мембран исследуемых микроорганизмов вольюмометрическим методом клетки помещали в 1М водный раствор диметилсульфоксида, объем которого на порядок превышал начальный объем клеточной суспензии, и определяли кинетику изменения объема клеток при температурах 25°С и 10°С с помощью микроскопа Axio Observer Z1 (масляно-иммерсионный объектив х63).

Экспериментально определенные зависимости объема клеток от времени при их контакте с раствором криопротектора аппроксимировали численными решениями уравнений Кедем-Качальского, которые теоретически описывают эту зависимость [9], подбирая значение коэффициента фильтрации клеточной мембраны таким образом, чтобы достичь максимального совпадения между экспериментальными и теоретическими зависимостями (**рис. 3**) при заданных, определенных ранее средних значениях поверхностно-объемного отношения и осмотически неактивного объема клеток.

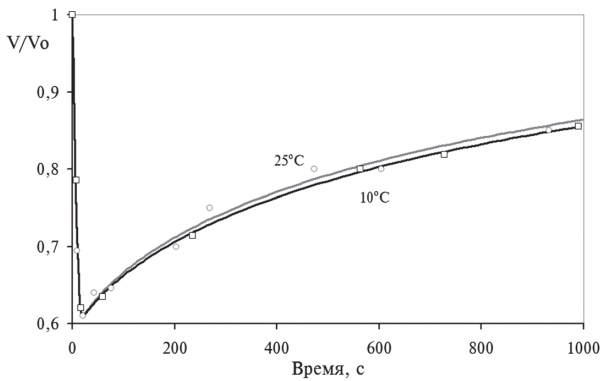


Рис. 3. Экспериментальная (точки) и теоретическая зависимость относительного объема клеток *S. albicans* от времени экспозиции в 1М растворе диметилсульфоксида.

Величину энергии активации процесса переноса молекул воды через клеточную мембрану определили по наклону линейной зависимости $\ln L_p$ от $1/T$ (график Аррениуса), где L_p – коэффициент фильтрации клеточной мембраны, T – абсолютная температура.

Определенное таким образом значение коэффициента фильтрации составило $(2,41 \pm 0,06) \cdot 10^{-14}$ м³/Нс при температуре 25°C, а энергия активации трансмембранного переноса молекул воды – $E = (25,2 \pm 1,6)$ кДж/моль.

Кривую плавления водного раствора диметилсульфоксида приближенно можно представить в виде [13]

$$\frac{c}{c_0} \left(\frac{T}{T_0} \right) = -83,595 \left(\frac{T}{T_0} \right)^2 + 125,95 \frac{T}{T_0} - 41,355$$

где T – абсолютная температура,

T_0 – температура, при которой завершается плавление внеклеточного раствора,

c – текущая концентрация замораживаемого внеклеточного раствора,

c_0 – начальная (до начала кристаллизации) концентрация криозащитного раствора.

В случае, когда через плазматическую мембрану клетки проникают только молекулы растворителя, то есть воды, изменение концентрации растворенных внутри клетки веществ при постоянной скорости охлаждения описывается уравнением [14]

$$\frac{d \left(\frac{c_{in}}{c_0} \right)}{d \left(\frac{T}{T_0} \right)} = - \frac{T_0 \left(\frac{c_{in}}{c_0} \right)^2 \exp \left[\frac{E}{R T_0} \left(1 - \frac{T}{T_0} \right) \right]}{(1 - \alpha) \beta} \gamma L_p(T_0) \pi_0 \left[\frac{c}{c_0} \left(\frac{T}{T_0} \right) - \frac{c_{in}}{c_0} \right], \quad (1)$$

где R – универсальная газовая постоянная,

γ – поверхностно – объемное отношение клетки,

π_0 – осмотическое давление физиологического раствора,

c_{in} – текущая концентрация внутриклеточного раствора.

Вероятность повреждения клеток *S. albicans* за счет внутриклеточной кристаллизации в зависимости от скорости охлаждения клеточной суспензии на этапе кристаллизации определяется интегралом [6]

$$W = \frac{1}{\beta} \int_1^{\frac{T_e}{T_0}} d \left(\frac{T}{T_0} \right) \frac{\left[\frac{c}{c_0} \left(\frac{T}{T_0} \right) - \frac{c_{in}}{c_0} \right]^2}{A} \exp \left\{ - \frac{B}{\left(\frac{T}{T_0} \right)^3 \left[\frac{c}{c_0} \left(\frac{T}{T_0} \right) - \frac{c_{in}}{c_0} \right]^2} \right\}, \quad (2)$$

где T_e – эвтектическая температура внеклеточно-го раствора,

β – скорость охлаждения,

A, B – константы, значение которых оценено в работе [7]

На рис. 4 представлена построенная по равенству (2) с учетом определенных нами транспортных и геометрических характеристик исследуемых клеток и численных решений уравнения (1) зависимость процента поврежденных за счет внутриклеточного льдообразования клеток *S. albicans* от скорости охлаждения на этапе кристаллизации клеточной суспензии.

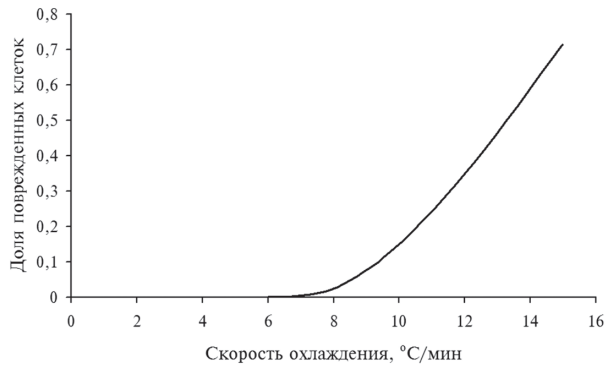


Рис. 4. Расчетная зависимость доли клеток *S. albicans*, поврежденных в результате внутриклеточной кристаллизации от скорости охлаждения при замораживании суспензии в 5%-ном водном растворе диметилсульфоксида.

В соответствии с двухфакторной теорией криоповреждения оптимальной является максимальная скорость охлаждения, при которой внутриклеточные кристаллы льда не образуются. Из расчетной зависимости, представленной на рис. 4, видно, что значение эффективной скорости охлаждения при замораживании дрожжеподобных грибов *S. albicans* составляет около 7°C/мин.

Для подтверждения этих расчетов была изучена жизнеспособность клеток дрожжеподобных грибов *S. albicans* после замораживания со скоростями 0,25, 1, 3,5, 7, 10, 20, 35°C/мин и путем погружения в жидкий азот в различных криозащитных средах. Было установлено, что на жизнеспособность клеток в процессе замораживания *S. albicans* достоверно влияют два фактора – состав криозащитной среды и скорость охлаждения. Максимальную жизнеспособность обеспечивало замораживание со скоростями от 3,5°C/мин до 7°C/мин в пивном сусле с добавлением 5% ДМСО или 5% глицерина (рис.5). Жизнеспособность клеток в образцах, замороженных со скоростью 3,5°C/мин под защитой 5% ДМСО составляла 92% от контроля; с добавлением в среду

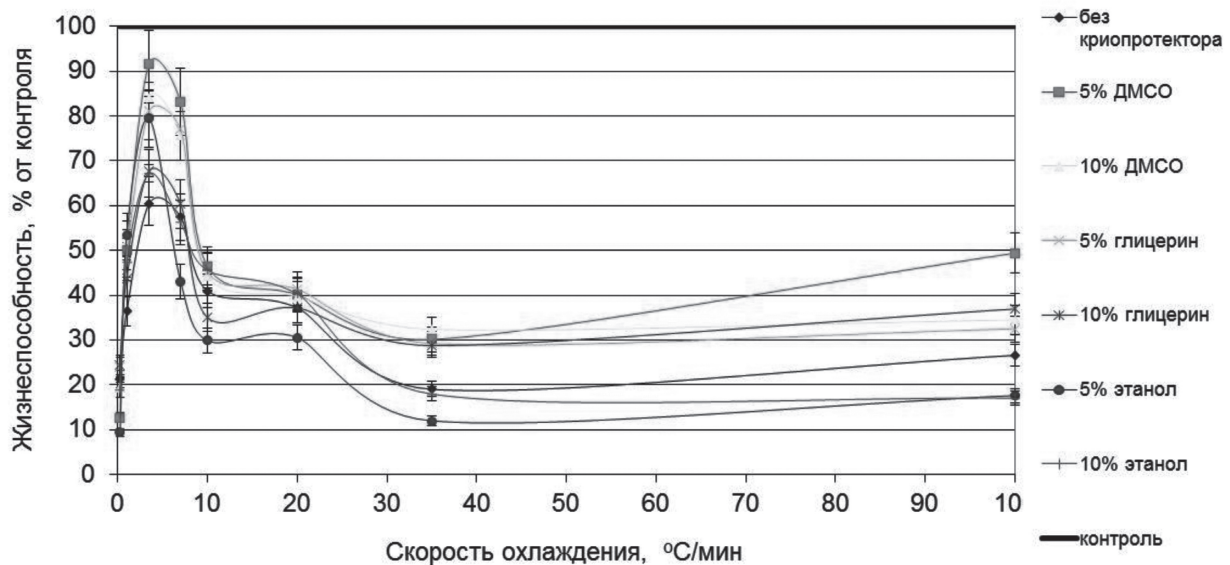


Рис. 5. Залежність життєспособності *S. albicans* від складу криозащитної середовища та швидкості охолодження.

консервування 5% глицерина вона складала 81%. Життєспособність кліток в зразках, заморожених зі швидкістю 7°C/мин з додаванням в середу консервування 5%ДМСО складала 83% від контролю; при додаванні в середу консервування 5% глицерина вона складала 77% від контролю. В діапазоні швидкостей охолодження від 0,25°C/мин до 3,5°C/мин клітки в зразках знаходяться під більш тривалим і сильним впливом небагатриятних факторів, що призвело до мінімальної життєспособності, незалежно від складу криозащитної середовища. Спад життєспособності спостерігали і при підвищенні швидкості охолодження від 20°C/мин до 35°C/мин, що пояснюється тим, що при цих швидкостях охолодження клітки вже не встигали достатньо обезводитися.

Було також встановлено, що при наступному зберіганні впродовж чотирьох років (термін спостереження) додаткова гибель кліток не відбулася.

Таким чином, отримані експериментальні дані добре узгоджуються з теоретичною оцінкою ефективної швидкості охолодження.

Висновки..

1. Проведено теоретичний розрахунок значення ефективної швидкості охолодження при заморожуванні дріжджоподібних грибів *S. albicans* (близько 7°C/мин) і отримано експериментальне підтвердження цієї оцінки.

2. Експериментально обґрунтовано ефективний протокол криоконсервування дріжджоподібних грибів *S. albicans*, відповідно до якого охолодження суспензії цих мікроорганізмів в 5%-ном

розчині ДМСО або глицерина на пивному суслі зі швидкістю 3,5-7°C/мин до -40°C з наступним зануренням в рідкий азот забезпечує збереження більш ніж 90% кліток.

3. Зберігання грибів *S. albicans* при стабільній температурі -196°C впродовж чотирьох років (термін спостереження) не призводить до додаткової гибелі кліток.

Перспективи подальших досліджень.

Теоретично і експериментально визначено ефективні режими криоконсервування дріжджоподібних грибів *S. albicans*, які можуть бути рекомендовані для застосування в практиці міжнародних, національних і ведомствених колекцій і банків мікробних культур. Хороше узгодження теоретичних і експериментальних результатів, визначення меж застосування математичних моделей дозволить, в майбутньому, суттєво зменшити витрати на натурні експерименти, які можна буде частково замінити експериментами розрахунковими.

Автори статті висловлюють подяку завідувачу відомою низкотемпературного консервування Інституту проблем криобіології і криомедицини НАН України, доктору біологічних наук, професору Гордиенку Євгенію Александровичу за технічну і методичну допомогу при постановці експериментів і зацікавлене участь в обговоренні їх результатів.

Список літератури

1. Актуальні проблеми криобіології / Під заг. ред. Н.С.Пушкаря і А.М. Белоуса. – К.: Наукова думка. – 1981. – 608 с.
2. Афанасьєва О. В. Мікробіологічний контроль хлібопекарного виробництва / О. В. Афанасьєва. – М.: Пищевая промисловість. – 1976. – 144 с.
3. Биргер М.О. Справочник по мікробіологічним і вірусологічним методам дослідження / М.О. Биргер. – М.: Медицина. – 1967. – 463 с.
4. Кулешова Л.Г. Теоретичне прогнозування оптимальних швидкостей охолодження кліткових суспензій / Л.Г. Кулешова, І.Ф. Коваленко // Біофіз. вестник. – 2008. – Вип.20, № 1. – С. 56-64.

5. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Под ред. В.К. Ерошина // ОНТИ НЦБИ АН СССР. – Пушино. – 1990. – 186 с.
6. Марущенко В.В. Зависимость вероятности внутриклеточного льдообразования от уровня пересыщения в дрожжеподобных грибах *Saccharomyces cerevisiae* / В.В. Марущенко, Е.А. Гордиенко // Биофизический вестник. – 2009. – Вып. 22, №1. – С. 65 – 70.
7. Сакун О.В. Теоретична оцінка значення оптимальної з погляду двох факторної теорії крипошкодження швидкості охолодження при лінійних режимах заморожування клітинної суспензії / О.В. Сакун, О.І. Гордієнко // Біофіз. Вісн. – 2009. – Вып. 22, №1. – С. 123– 129.
8. Curry M.R. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations / M.R. Curry, J.D. Millar, P.F. Watson // Biol. Reprod. – 1994. – Vol. 51, №5. – P. 1014– 1021.
9. Kedem O. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes / O. Kedem, A. Katchalsky // Biochim. Biophys. Acta. – 1958. – Vol. 27, №2. – P. 229– 246.
10. Mazur P. A two-factor hypothesis to freezing hamster tissue-culture cells / P. Mazur, S.P. Leibo, E.H. Chu // Experim. Cell Research. – 1972. – V. 71, № 2. – P. 345– 355.
11. Mc Grath J.J. Quantitative measurement of cell membrane transport: Technology and applications // Cryobiology. – 1997. – Vol. 34, №4 – P. 315– 334.
12. Mc Grath J.J. Experimental and analytical techniques for determining permeability parameters of individual cells and cell populations / J.J. Mc Grath, S. Nowlen, R. Ligon // Cryobiology. – 1983. – Vol. 20, №6. – P. 712.
13. Thirumala S. A simplified procedure to determine the optimal rate of freezing biological systems / S. Thirumala, R.V. Devireddy // J. Biomech. Eng. – 2005. – V. 127, №2. – P. 295– 300.
14. Woelders H. Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes / H. Woelders, A. Chaveiro // Cryobiology. – 2004. – V. 49, №3. – P. 258– 271.

УДК 57.043:528.282.23:579

ТЕОРИТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ УСЛОВИЙ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ КЛЕТОК *CANDIDA ALBICANS*

Артуянц А.Ю., Марценюк В.Ф., Гурина Т.М., Высеканцев И.П.

Резюме. Впервые изучено влияние различных режимов замораживания, состава криозащитной среды и срока хранения при -196оС на жизнеспособность дрожжеподобных грибов *C. albicans*. Экспериментально определены диапазон скоростей охлаждения и состав сред консервирования, обеспечивающие максимальную сохранность грибов *C. albicans* в процессе криоконсервирования. Полученные результаты соответствуют теоретически спрогнозированной эффективной, с точки зрения двухфакторной теории криоповреждений, скорости охлаждения суспензии клеток *C. albicans*. Показано, что значение эффективной скорости охлаждения грибов *C. albicans* находится в интервале от 3,5 до 7оС/мин.

Ключевые слова: криоконсервирование, дрожжеподобные грибы, жизнеспособность, эффективная скорость охлаждения.

УДК 57.043:528.282.23:579

ТЕОРЕТИЧНЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЕФЕКТИВНИХ УМОВ КРИОКОНСЕРВУВАННЯ КЛІТИН *CANDIDA ALBICANS*

Артуянц А.Ю., Марценюк В.П., Гурина Т.М., Висеканцев І.П.

Резюме. Вперше вивчено вплив різних режимів заморожування, складу криозахистного середовища та терміну зберігання при -196оС на життєздатність дріжджоподібних грибів *C. albicans*. Експериментально визначені діапазон швидкостей охолодження і склад середовищ консервування, що забезпечують максимальне збереження грибів *C. albicans* в процесі криоконсервування. Отримані результати відповідають теоретично спрогнозованій ефективною, з точки зору двофакторній теорії криоушкоджень, швидкості охолодження суспензії клітин *C. albicans*. Показано, що значення ефективної швидкості охолодження грибів *C. albicans* знаходиться в інтервалі від 3,5 до 7оС/хв.

Ключові слова: криоконсервування, дріжджоподібні гриби, життєздатність, ефективна швидкість охолодження.

UDC 57.043:528.282.23:579

Theoretically And Experimental Substantiation Of The Effective Cryopreservation Conditions Of *Candida Albicans* Cells

Artuyants A. Yu., Martsenyuk V. F., Gurina T. M., Vysekantsev I. P.

Summary. First studied the effect of different modes of freezing, the composition of cryoprotective media and storage time at -196оС on the viability of yeast-like fungi *C. albicans*. Experimentally determined range of cooling rates and the composition of conservation medium, to ensure maximum safety of fungi *C. albicans* during cryopreservation. The results obtained correspond to the predicted theoretically effective, in terms of two-factor theory of cryodamage, cooling rate of the cell suspension *C. albicans*. It is shown that value of effective speed of cooling of *C. albicans* cells is in an interval from 3,5 to 7оС/min .

Key words: cryopreservation, yeast-like fungi, viability, effective cooling rate.

Стаття надійшла 5.08.2011 р.