

ИЗУЧЕНИЕ КРИОПОВРЕЖДЕНИЙ СВОБОДНЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В ГЕЛЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Целью данного исследования было выявление особенностей повреждений клеток *Saccharomyces cerevisiae*, свободных и иммобилизованных в геле альгината натрия, в результате их криоконсервирования. *Методы.* Объектом исследования были клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. С помощью флуоресцентных красителей *AnnexinV* и *7AAD* методом проточной цитометрии проведена оценка повреждений деконсервированных клеток *S. cerevisiae*. *Результаты.* Характерными признаками негативного воздействия низких температур было нарушение целостности и липидной асимметрии цитоплазматических мембран (ЦПМ), фрагментация ДНК. Проведенный анализ асимметричного распределения фосфолипидов в мембране клеток дрожжей *S. cerevisiae* показал, что перестройки в липидной организации мембраны в процессе криоконсервирования могут происходить не только под воздействием физико-химических факторов, но и под влиянием криопротекторов. Выход фосфатидилсерина в наружный монослой ЦПМ наблюдали у 2,5% иммобилизованных клеток (2 группа). Количество *AnnexinV* – меченых клеток в группе 4 было в 2 раза больше относительно количества сохранных клеток после замораживания. Подобная динамика наблюдалась и в отношении такого рода повреждений в образцах свободных клеток. Однако, следует отметить, что количество *AnnexinV* – меченых клеток в группе 1 было значительно меньше и сопоставимо с контрольными образцами. Мы полагаем, что снижение клеток с нарушением асимметричного распределения фосфолипидов в этой группе происходило за счет увеличения количества полностью разрушенных (не подвергшихся анализу) клеток в этих образцах. Установлено, что во всех исследуемых образцах, включая контрольные, присутствуют клетки, находящиеся на различных стадиях апоптоза. Разница в образцах заключается в значении процента клеток элиминированных из процесса анализа проточной цитометрии. Количество полностью разрушенных клеток в иммобилизованных образцах было значимо меньше, чем в группах свободных в суспензии клеток. *Выводы.* Установлено, что под влиянием повреждающих факторов процесса криоконсервирования в части свободных и иммобилизованных в геле альгината натрия клеток *Saccharomyces cerevisiae* развиваются нарушения целостности и липидной асимметрии цитоплазматических мембран, фрагментация ДНК. Показано, что наличие криопротектора ДМСО в консервирующей среде приводит к увеличению числа криоконсервированных клеток с асимметричным распределением фосфолипидов в клеточных мембранах. Количество клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза после замораживания под защитой ДМСО, в 2–2,5 раза превышало количество аналогичных клеток, замороженных без криопротектора. Криоконсервирование дрожжей в полисахаридном геле



альгината натрия может являться альтернативным способом консервации биообъектов под защитой традиционных криозащитных средств, позволяющим достичь высокой степени жизнеспособности и сохранности клеток без использования криопротекторов.

Ключевые слова: дрожжи, криоповреждения, иммобилизация, проточная цитофлуориметрия.

Перевод биологических объектов в состояние глубокого холодого анабиоза с целью их долгосрочного хранения является многоэтапным процессом, на всех этапах которого биологические объекты попадают в экстремальные условия. Снижение температуры окружающей среды ниже физиологических значений, образование кристаллов льда с последующим концентрированием солей в клетках и в окружающей среде, изменение рН среды являются повреждающими факторами, оказывающими отрицательное воздействие на биологические объекты. В ответ на действие указанных повреждающих факторов клетки реагируют изменением ряда физико-химических свойств, обеспечивающих их адаптацию к замораживанию и максимальное сохранение функциональной активности. В случае превышения адаптационных возможностей клеток в них возникают повреждения, в том числе и необратимые, степень выраженности которых может зависеть от исходных генетически детерминированных морфофункциональных свойств клеток.

В современных биотехнологических производствах большое внимание уделяют иммобилизации микробных клеток в различных гелевых носителях. На разных этапах биотехнологического производства возникает необходимость хранения их при низких температурах. Учитывая то, что иммобилизованные в гелевых матрицах микробные клетки используют в качестве продуцентов в биореакторах, в виде медицинских и ветеринарных препаратов перспективным следует считать исследования по возможности консервации их без применения криопротекторов [1]. Работы в этом направлении только начинаются. Более того особое внимание исследователей привлекает возможность криоконсервирования иммобилизованных клеток микроорганизмов для создания коллекций с целью долгосрочного хранения

[2–5]. Ведущей тенденцией криобиологии является отказ от эмпирических принципов исследований, а глубокое изучение механизмов криоповреждений и криозащиты, разработка на этой основе необходимых и достаточных условий эффективного низкотемпературного консервирования биологических объектов [6]. Эти разработки открывают новые перспективы консервации биоматериалов, как для научных исследований, так и для практического использования без утраты ими важнейших генетических признаков. Влияние условий криоконсервирования на иммобилизованные в гелевых носителях клетки микроорганизмов изучено недостаточно. Существующие в настоящее время исследования в этом направлении единичны и фрагментарны.



Целью данного исследования было выявление особенностей повреждений клеток *Saccharomyces cerevisiae*, свободных и иммобилизованных в геле альгината натрия, в результате их криоконсервирования.

Материалы и методы

Объектом исследования были дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*, раса ЛЮ-2 (раса получена из РНИИ хлебопекарной промышленности, г. Санкт-Петербург, Россия). Дрожжи культивировали по стандартной методике в неохмеленном пивном сусле (8°Б) при 30 °С с аэрацией до начала стационарной фазы роста [7]. В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (ДМСО) [8]. Конечная концентрация ДМСО составляла 5%. Все опытные образцы были разделены на 4 группы: 1 группа – суспензия клеток в дистиллированной воде; 2 группа – суспензия клеток в дистиллированной воде с последующей иммобилизацией; 3 группа – суспензия клеток в 5% водном растворе криопротектора ДМСО; 4 группа – суспензия клеток в 5% водном растворе ДМСО с последующей иммобилизацией. Исходная концентрация клеток во всех образцах составляла 25×10^7 кл/мл. Клетки опытных образцов были заморожены со скоростью охлаждения 1 °/мин до –40 °С с последующим погружением в жидкий азот (ранее установленный нами оптимальный режим охлаждения). Размораживали образцы на водяной бане, при температуре 37 °С [9]. Контролем служили образцы с нативными клетками (без замораживания). Для иммобилизации клеток в геле альгината натрия к суспензии клеток добавляли в соотношении 1:1 2% раствор альгината натрия (FarmaSino, Китай). После тщательного перемешивания суспензию клеток с альгинатом натрия набирали в шприц объемом 2 мл с выходным отверстием иглы диаметром 0,3 мм. Затем суспензию вносили по каплям с высоты 5–10 см в 0,1 М водный раствор CaCl_2 , где происходила сшивка альгината катионами кальция в результате реакции полимеризации. Образующиеся гранулы выдерживали в течение 15–20 мин в этом растворе для упрочнения геля. Затем промывали стерильной дистиллированной водой [1]. Деполимеризацию гранул проводили в 4% водном растворе этилендиаминтетраацетата (ЭДТА). Концентрация ЭДТА определена экспериментальным путем с учетом скорости растворения гранул и сохранности жизнеспособности клеток *S. cerevisiae*. Жизнеспособность дрожжей *S. cerevisiae* оценивали по способности образовывать макроколонии на поверхности агаризованных сред («чашечный» метод Коха). Сохранность клеток дрожжей определяли методом исключения мертвых клеток после инкубации с 0,4% раствором трипанового синего. Общее количество клеток, сохранивших морфологическую целостность, подсчитывали в камере Горяева по стандартной методике. Оценку повреждений деконсервированных клеток дрожжей проводили методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD, USA) с помощью флуоресцентных красителей AnnexinV и 7AAD [10–13]. Результаты измерения оценивали с помощью программного обеспечения фирмы BD – CELLQuestPro. Статистическую обработку данных проводили



по методу Стьюдента – Фишера с использованием программного обеспечения «Excel». Количество проб в каждой составляющей эксперимента $n=6$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования для оценки эффективности различных условий криоконсервирования определили жизнеспособность и сохранность клеток дрожжей *S. cerevisiae* после использования разных скоростей охлаждения, криозащитных сред и иммобилизации. В ходе исследования был установлен оптимальный режим охлаждения со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ для всех экспериментальных групп. Наиболее высокие показатели жизнеспособности и сохранности при данном режиме охлаждения были в группах иммобилизованных клеток, соответственно $96,6\pm 0,4$ и $98\pm 1,3\%$ – во второй, $90,3\pm 2,3$ и $94,8\pm 4,6\%$ – в четвертой экспериментальной группе. Анализируя полученные в данном исследовании результаты, мы пришли к заключению о том, что иммобилизация и экспериментально подобранный оптимальный режим охлаждения это те условия, которые позволяют сохранить жизнеспособность дрожжевых клеток почти на исходном уровне [9, 14, 15]. Этот показатель был в 2–3 раза ниже в образцах свободных клеток в суспензии (рис. 1).

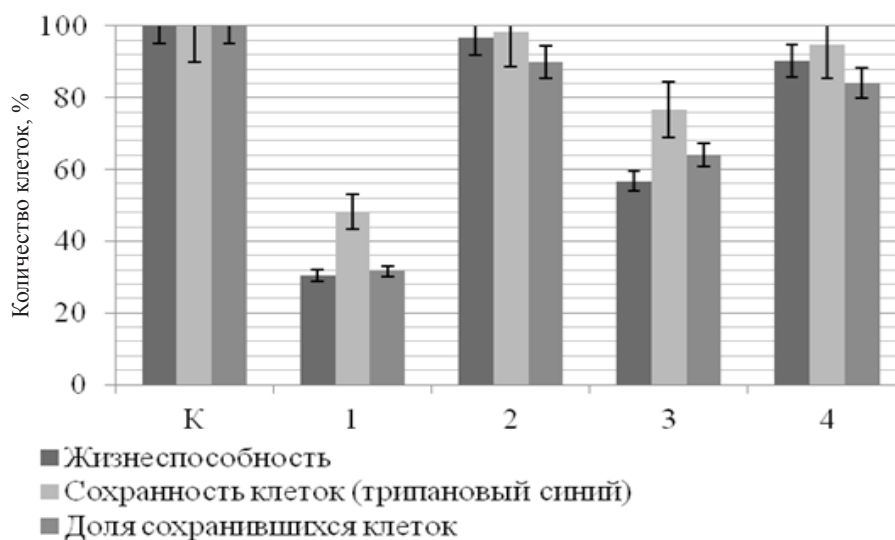


Рис. 1. Влияние различных условий криоконсервирования на культуру клеток *S. cerevisiae*.

Примечание: ■ – жизнеспособность; ■ – сохранность (трипановый синий); ■ – доля клеток, сохранивших морфологическую целостность; цифрами обозначены опытные группы

Fig. 1. Effect of different cryopreservation conditions on *S. cerevisiae* cell culture.

Notes: ■ – viability; ■ – integrity (trypan blue); ■ – a part of cells, kept their morphological integrity; experimental groups are numerated.



Использование медленного замораживания при криоконсервировании дрожжей *S. cerevisiae* под защитой 5% ДМСО также позволяет в значительной степени сохранить жизнеспособность клеток ($56,8 \pm 2,0\%$). Однако, использование его нецелесообразно по двум причинам: во-первых, этот показатель достоверно ниже, чем в группах иммобилизованных клеток, во-вторых, присутствие классических криопротекторов нежелательно при использовании микроорганизмов в пищевой, фармацевтической и биотехнологической промышленности.

Следующим этапом исследования было выявление особенностей повреждений свободных и иммобилизованных клеток *S. cerevisiae* в результате их криоконсервирования. Предварительно, с помощью камеры Горяева было подсчитано общее количество клеток, сохранивших морфологическую целостность после процесса криоконсервирования. Исходная концентрация клеток во всех образцах была равна $(25 \pm 1,3) \times 10^7$ кл/мл. После замораживания в первой группе происходило снижение этого показателя до $(7,9 \pm 0,84) \times 10^7$ кл/мл, что составляло 31,6% от исходной концентрации клеток в образцах (рис. 2). Данные второй и четвертой групп были сопоставимы с контрольными образцами и составляли соответственно $(22,5 \pm 1,48) \times 10^7$ и $(21 \pm 1,74) \times 10^7$ кл/мл. В третьей группе количество клеток, сохранивших морфологическую целостность, уменьшилось почти в 1,5 раза.

Анализ с использованием флуоресцентных красителей показал, что под влиянием повреждающих факторов процесса криоконсервирования в клетках дрожжей *S. cerevisiae* развиваются нарушения фосфолипидной асимметрии (AnnexinV) и целостности цитоплазматической мембраны, фрагментация ДНК в ядре клеток (7AAD). На диаграмме, представленной на рис. 2, показано процентное соотношение 7AAD- и AnnexinV-меченых клеток в анализируемых пробах. Подвергшиеся охлаждению клетки испытывали огромный комплекс воздействий, в результате которых происходили, прежде всего, специфические нарушения в состоянии цитоплазматических мембран.

Одним из них было нарушение липидной асимметрии, являющейся основой для нормального функционирования мембраны и клетки в целом. Особенное внимание при оценке степени нарушения асимметрии мембран мы уделяли анионному фосфолипиду фосфатидилсерину (ФС). ФС, локализующийся на внутренней поверхности ЦПМ, при инициации апоптоза утрачивал асимметричность распределения в липидном бислое и перемещался на внешнюю сторону мембраны. Экспонированный на поверхности ЦПМ он легко обнаруживался с помощью флуоресцентно-меченного AnnexinV на поверхности клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза.

Сравнительный анализ асимметричного распределения фосфолипидов в мембране клеток дрожжей *S. cerevisiae* показал высокую вероятность того, что перестройки в липидной организации мембраны, происходящие под влиянием криопротекторов, могут приводить к нарушению асимметричного распределения фосфолипидов в мембране [16, 17]. Результаты, полученные в данном исследовании в пересчете в абсолютные значения (с учетом клеток, сохранивших морфологическую целостность), приведены на рис. 3. Количество



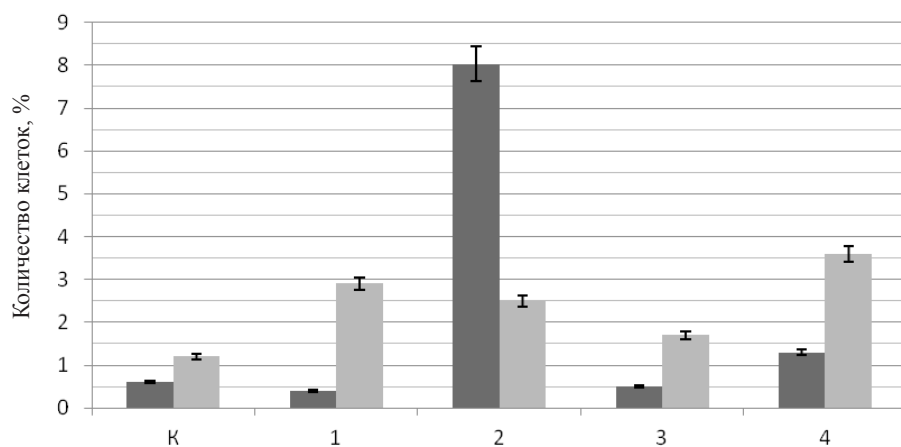


Рис. 2. Соотношение 7AAD- и AnnexinV-меченых клеток *S. cerevisiae* в контроле и опытных образцах после криоконсервирования.

Примечание: ■ – AnnexinV-меченые клетки; ■ – 7AAD-меченые клетки; цифрами обозначены опытные группы.

Fig. 2. Percentage of 7AAD- and AnnexinV-labelled *S. cerevisiae* cells in the control and experimental samples after cryopreservation.

Notes: ■ – AnnexinV-labelled cells; ■ – 7AAD-labelled ones; experimental groups are numerated.

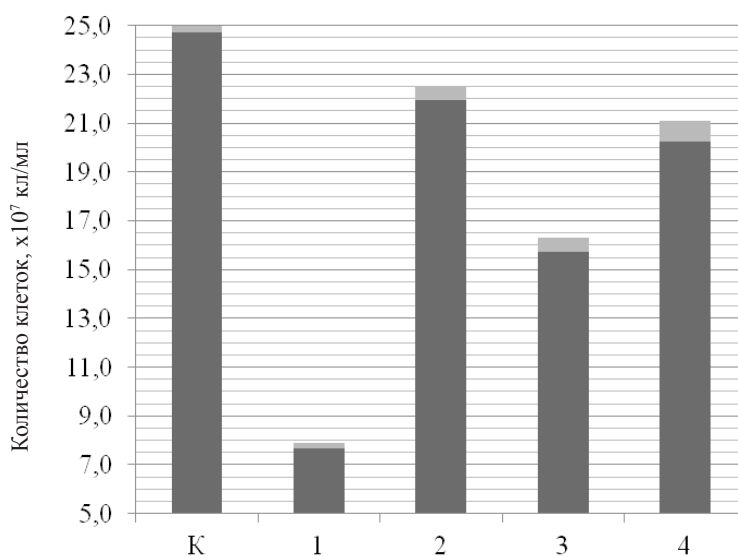


Рис. 3. Количество AnnexinV-меченых клеток *S. cerevisiae* после криоконсервирования.

Примечание: ■ – живые неповрежденные клетки; ■ – AnnexinV-меченые клетки; цифрами обозначены опытные группы.

Fig. 3. Number of AnnexinV-labelled *S. cerevisiae* cells after cryopreservation.

Notes: ■ – living undamaged cells; ■ – AnnexinV-labelled cells; experimental groups are numerated.



Annexin V-меченых клеток в группе 4 было почти в 2 раза больше относительно количества сохранных клеток после замораживания. Подобная динамика наблюдалась и в отношении такого рода повреждений в образцах свободных клеток. Количество клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза, в группе свободных клеток, консервированных под защитой ДМСО, было в 2–2,5 раза больше, чем в группе 1. Однако следует отметить, что количество Annexin V-меченых клеток в 1 группе было значительно меньше и сопоставимо с контрольными образцами. Мы полагаем, что снижение числа клеток с нарушением асимметричного распределения фосфолипидов в группе 1 происходило за счет большего количества полностью разрушенных клеток в этих образцах.

Сохранность, являющаяся одним из важнейших показателей состояния клетки, не может на 100% говорить о ее жизнеспособности, поскольку при сохранении структуры клетка может быть нежизнеспособной [18]. Поэтому на следующем этапе исследования с помощью ДНК-тропного красителя 7-AAD, не проникающего в живые, но свободно проникающего в клетки с поврежденной цитоплазматической мембраной нами были определены клетки, находящиеся на поздней стадии апоптоза и мертвые клетки. На рис. 4 приведены результаты в пересчете в абсолютные значения.

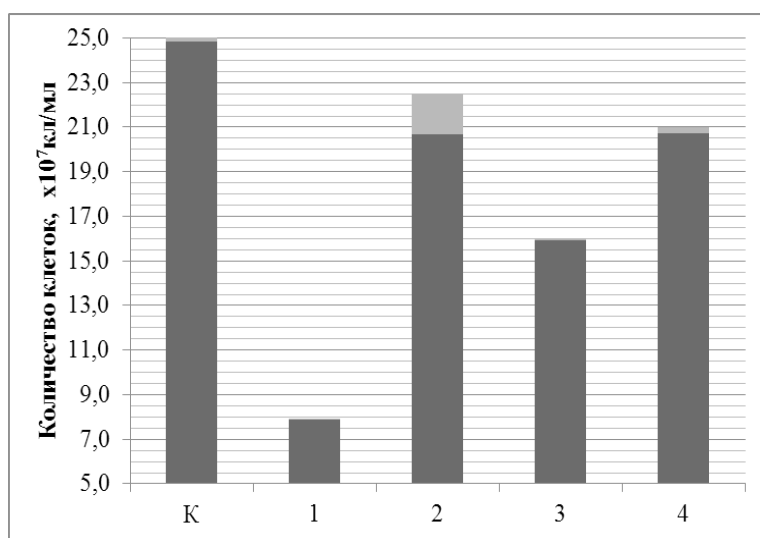


Рис. 4. Количество 7AAD-меченых клеток *S. cerevisiae* после криоконсервирования.

Примечание: ■ – живые неповрежденные клетки; ■ – 7AAD-меченые клетки; цифрами обозначены опытные группы.

Fig. 4. Number of 7AAD-labeled *S. cerevisiae* cells after cryopreservation.

Notes: ■ – living undamaged cells; ■ – 7AAD-labelled cells; experimental groups are numerated.

7AAD-меченых клеток в образцах 2 группы (иммобилизованные клетки) было в 4 раза больше, чем в группе 4 (иммобилизованные клетки + ДМСО). Однако количество 7AAD – немеченых (живых неповрежденных) клеток в этих

группах значимо не отличалось. Это свидетельствует о том, что иммобилизация клеток в альгинатном геле и оптимальные режимы охлаждения позволяют сохранить высокую степень неповрежденных живых клеток без использования традиционных криозащитных средств.

Для оценки количественного соотношения клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза мы использовали двухпараметровый анализ с окрашиванием AnnexinV FITC и 7AAD. Данная комбинация флуоресцентных красителей позволяет отследить «цикл смерти»: на ранних стадиях апоптотические клетки окрашиваются только AnnexinV, после повреждения ЦПМ начинают пропускать 7-AAD, который подавляет флуоресценцию AnnexinV. Живые клетки не окрашиваются ни AnnexinV, ни 7AAD. Используемый нами способ оценки позволяет получить реальную картину влияния условий консервирования (режимы охлаждения, состав криозащитной среды, иммобилизация) на состояние клеток. В таблице приведены результаты, полученные в данном исследовании. Показатели иммобилизованных клеток (группы 2 и 4) и группы 3 (наличие ДМСО в криозащитной среде) по многим значениям не отличались от показателей контроля. Сохранность в образцах свободных клеток (группа 1) снижалась более чем на 50% без достоверного увеличения количества 7AAD-меченых клеток за счет разрушения данных клеток и элиминации их из процесса анализа проточной цитометрии. Несмотря на то, что в образцах второй группы наблюдали значительное увеличение популяции позднеапоптотических и мертвых клеток, общее количество живых неповрежденных клеток в этой группе было сопоставимо с показателями 3 и 4 группы.

Таблица

Соотношение неповрежденных клеток и клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза после консервирования в разных условиях

Table

Percentage of undamaged cells and those being at different apoptotic stages after cryopreservation under different conditions

Клетки	Содержание, %				
	Контроль	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
AnnexinV ⁻ / 7AAD ⁻ (живые клетки)	99,42±0,05	98,78±0,16	92,47±0,21	99,26±0,07*	97,63±0,17
AnnexinV ⁺ / 7AAD ⁻ (ранний апоптоз)	0,23±0,01	0,16±0,01	0,71±0,03*	0,25±0,01*#	1,77±0,01 *#
AnnexinV ⁺ / 7AAD ⁺ (позд- ний апоптоз)	0,22±0,07	0,56±0,01*	3,81±0,04*	0,17±0,08 #	0,34±0,01*
AnnexinV ⁻ / 7AAD ⁺ (мерт- вые клетки)	0,14±0,09	0,5±0,03*	3,01±0,01 *	0,33±0,01*#	0,26±0,01*#

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контролем; # – p<0,05 по сравнению с группой 2.
Notes: * – p<0.05 if compared with the control, # – p<0.05 if compared with the group 2.



Аналізуючи якісну картину розподілу кліток *S. cerevisiae* між групами, кожна з яких визначає ступінь пошкодження кліток, встановлено, що всі зразки, включаючи контрольну групу, характеризуються певною кількістю кліток, що знаходяться на різних стадіях апоптозу. В процесі низькотемпературної консервації в клітках виникають пошкодження в результаті непрямого і опосередкованого впливу фізико-хімічних факторів, реалізуємих на етапах криоконсервації. Вплив на клітки цих факторів в процесі криоконсервування не привело до суттєвого перерозподілу між досліджуємих групами, що підтверджується показателями, представленими в табл. Різниця між групами заключається в кількості елімінованих кліток з процесу аналізу проточної цитометрії. Значення повністю знищених кліток в зразках 2 і 4 групи (імобілізовані клітки) було значимо менше, ніж в 1 і 3 групах (вільні клітки). Це ще раз підтверджує захисний ефект імобілізації в гелевому носії в процесі наступного криоконсервування кліток мікроорганізмів.

На основі проведених досліджень можна зробити висновок про те, що експериментально підібрані режими охолодження, склад криозащитних серед, імобілізація в гелевому носії дозволяють досягти високої ступеня збереженості дрожжевих кліток, звести до мінімуму кількість пошкоджених і повністю знищених кліток. Ми передбачаємо, що інтенсивність негативного впливу фізико-хімічних факторів на імобілізовані клітки в процесі заморожування зменшується за рахунок зміни в потрібному напрямку швидкості утворення кристалів льоду і характеру кристалізації. Отримані результати обумовлюють доцільність подальших досліджень в цьому напрямку і дають можливість для уточнення зроблених нами висновків.

Таким чином, можна зробити висновок, що під впливом пошкоджуючих факторів процесу криоконсервування в частині вільних і імобілізованих в гелі альгінату натрію кліток *Saccharomyces cerevisiae* відбуваються порушення цілісності і ліпідної асиметрії цитоплазматических мембран, фрагментація ДНК. Наявність криопротектора ДМСО в консервуючій середі призводить до збільшення числа криоконсервованих кліток з асиметричним розподілом фосфоліпідів в клітинних мембранах. Кількість кліток, що знаходяться на ранній стадії апоптозу після заморожування під захистом ДМСО, в 2–2,5 рази перевищувало кількість аналогічних кліток, заморожених без криопротектора. Криоконсервування дрожжей в полісахаридному гелі альгінату натрію може бути альтернативним способом консервації біооб'єктів під захистом традиційних криозащитних засобів, що дозволяють досягти високої ступеня життєспроможності і збереженості кліток без використання криопротекторів.



В.Л. Пономарьова, І.П. Висеканцев, О.С. Онасенко, П.М. Зубов

Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, 61015, Україна, тел.:+38 (057) 373 30 39, e-mail: viktoriiia-may@mail.ru

ВИВЧЕННЯ КРІОУШКОДЖЕНЬ ВІЛЬНИХ ТА ІММОБІЛІЗОВАНИХ В ГЕЛІ АЛЬГІНАТУ НАТРІЮ КЛІТИН ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Реферат

Метою цього дослідження було виявлення особливостей ушкоджень клітин *Saccharomyces cerevisiae*, вільних та іммобілізованих в гелі альгінату натрію, в наслідок їх кріоконсервування. **Методи.** Об'єктом дослідження були клітини дріжджів *S. cerevisiae*. За допомогою флуоресцентних барвників AppexinV і 7AAD методом поточної цитометрії проведено оцінку ушкоджень деконсервованих клітин *S. cerevisiae*. **Результати.** Притаманними ознаками негативного впливу низьких температур було порушення цілісності та ліпідної асиметрії цитоплазматичних мембран, фрагментація ДНК. Проведеним аналізом асиметричного розподілу фосфоліпідів у мембрані клітин дріжджів *S. cerevisiae* було показано, що перебудови у ліпідній організації мембрани можуть відбуватися не тільки під впливом фізико-хімічних факторів, але й під впливом кріопротекторів. Вихід фосфатиділсерину в зовнішній моношар ЦПМ спостерігали у 2,5% іммобілізованих клітин (2 група). Кількість AppexinV-мічених клітин у групі 4 була в 2 рази більшою відносно кількості збережених клітин після заморозування. Подібну динаміку спостерігали і щодо такого роду ушкоджень у зразках вільних клітин. Проте, слід зазначити, що кількість AppexinV-мічених клітин у групі 1 була значно меншою і відповідала рівню в контрольних зразках. Ми вважаємо, що зниження клітин з порушенням асиметричного розподілу фосфоліпідів у цій групі відбувалося за рахунок збільшення кількості повністю зруйнованих (що не зазнали аналізу) клітин у цих зразках. Встановлено, що в усіх досліджуваних зразках, включаючи контрольні, присутні клітини, які знаходяться на різних стадіях апоптозу. Різниця у зразках полягає в значенні відсотка клітин елімінованих з процесу аналізу поточної цитометрії. Кількість повністю зруйнованих клітин в іммобілізованих зразках була значимо меншою, ніж у групах вільних у суспензії клітин. **Висновки.** Встановлено, що під впливом ушкоджувальних чинників процесу кріоконсервування у частини вільних та іммобілізованих в гелі альгінату натрію клітин *Saccharomyces cerevisiae* розвиваються порушення цілісності й ліпідної асиметрії цитоплазматичних мембран, фрагментація ДНК. Показано, що наявність кріопротектора ДМСО в консервувальному середовищі призводить до збільшення числа кріоконсервованих клітин з асиметричним розподілом фосфоліпідів у клітинних мембранах. Кількість клітин, що знаходяться на ранній стадії апоптозу після заморозування під захистом ДМСО, в 2–2,5 рази перевищувала кількість подібних клітин, заморожених без кріопротектора. Кріоконсервування дріжджів у поліукридному гелі альгінату натрію може бути альтернативним способом консервації біоб'єктів під захистом традиційних кріозахисних засобів, що дозволяє досягти високого ступеня життєздатності й збереженості клітин без використання кріопротекторів

Ключові слова: дріжджи, кріоушкодження, іммобілізація, проточна цитофлуориметрія.



V.L. Ponomareva, I.P. Vysekantsev, E.S. Onasenko, P.M. Zubov

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya str., Kharkov, 61015, Ukraine, tel.: +38 (057) 373 30 39, e-mail: viktoriiia-may@mail.ru

STUDY OF CRYOINJURIES OF FREE AND IMMOBILIZED IN SODIUM ALGINATE GEL *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* YEAST CELLS

Summary

The aim of this study was the revealing of the peculiarities of cryoinjuries of free and immobilized in sodium alginate gel *Saccharomyces cerevisiae* cells after cryopreservation. **Methods.** The research object was the *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. By means of fluorescent dyes Annexin V and 7AAD with flow cytometry the injuries of frozen-thawed *Saccharomyces cerevisiae* cells were assessed. **Results.** The characteristic features of negative effect of low temperatures were impairments in the integrity and lipid asymmetry of cytoplasm membranes (CPM), DNA fragmentation. The performed analysis of asymmetric distribution of phospholipids in membrane of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells has shown that the rearrangements in lipid membrane structure during cryopreservation may occur not only under the effect of physical and chemical factors but also due to cryoprotectants. The yield of phosphatidylserine in an outer monolayer layer of CPM was observed in 2.5% of immobilized cells (group 2). The number of Annexin V–labeled cells in group 4 was twice higher relative to the amount of intact cells after freezing. A similar tendency was observed with regard to this kind of damage in the samples of free cells. However, it should be noted that the number of Annexin V–labeled cells in group 1 was significantly lower and it is comparable with the controls. We believe that the reduction in the number of cells with disordered asymmetric distribution of phospholipids in group 1 was due to increase in the number of completely destroyed (not subjected to analysis) cells in these samples. It has been found that all the tested samples, including controls, there were the cells being at different stages of apoptosis/necrosis. The difference in the samples consists in the value of the percentage of cells eliminated from the analysis of flow cytometry. The number of completely destroyed cells in immobilized samples was significantly lower than in the group of free cells in a suspension. It has been established that there are the cells being at different stages of apoptosis, in all the studied samples including the control ones. The difference in the samples consists in the value of the percentage of the cells eliminated from the process of flow cytometry analysis. The number of completely destroyed cells in immobilized samples was statistically and significantly lower than in the groups of free in suspension cells. **Conclusions.** It has been established that under the influence of cryopreservation damaging factors in a part of free and immobilized in alginate gel *S. cerevisiae* cells there were developed the disorders in an integrity and lipid asymmetry of the cytoplasmic membranes, DNA fragmentation. The presence of DMSO as a cryoprotectant in preserving medium has been shown to lead to an increase in the number of cryopreserved cells with an asymmetric distribution of phospholipids in cell membranes. The number of cells in early apoptosis after freezing with DMSO as a cryoprotectant in 2–2.5 times exceeded the number of similar cells frozen without cryoprotectant. Cryopreservation of yeasts in polysaccharide gel of sodium alginate may be an alternative way to preservation of biological objects under the protection with traditional cryoprotective agents, allowing a high degree of viability and preservation of cells with no cryoprotectants.

Key words: yeast, cryoinjury, immobilization, flow cytometry.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И. Иммуобилизованные клетки микроорганизмов. – М.: МГУ, 1994. – 288 с.
2. Mahler S., Desille M., Fremond B. Hypothermic storage and cryopreservation of hepatocytes: the protective effect of alginate gel against cell damages // Cell Transplant. – 2003. – Vol. 12, № 6. – P. 579–592.
3. Siti-Ismail N., Bishop AE., Polak JM., Mantalaris A. The benefit of human embryonic stem cell encapsulation for prolonged feeder-free maintenance // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29. – P. 3946–3952.
4. Dang S.M., Gerecht-Nir S., Chen J., Itskovitz-Eldor J., Zandstra P.W. Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture // Stem Cells. – 2004. – Vol. 22. – P. 275–282.
5. Li Z., Leung M., Hopper R., Ellenbogen R., Zhang M. Feeder-free self-renewal of human embryonic stem cells in 3D porous natural polymer scaffolds // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31. – P. 404–412.
6. Грищенко В.И. Достижения и развитие криобиологии в Украине // Проблемы криобиологии. – 2005. – № 3. – С. 232–233.
7. Егорова Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: МГУ, 1976. – 307 с.
8. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. – К.: Наукова думка, 1978. – 204 с.
9. Пономарева В.Л., Высеканцев И.П., Гурина Т.М., Онасенко Е.С. Изучение влияния режимов охлаждения и защитных сред, содержащих альгинат натрия, на жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Вип. 3, Т. 1 (87). – С. 35–37.
10. Скибо Ю.В., Абрамова З.И. Методы исследования программируемой клеточной гибели. Учебно-методическое пособие по курсу «Теория апоптоза». – Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2011. – 61 с.
11. Engeland M. Van, Nieland L.J., Ramaekers F.C. Annexin-V-affinity assay: a review based on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure // J. Cytometry. – 1998. – Vol. 31. – P. 1–9.
12. Willingham Mark C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis // J. of Histochemistry and Cytochemistry. – 1999. – Vol. 47, № 9. – P. 1101–1109.
13. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Под ред. Н. Е. Бузикашвили и Д. В. Самойлова. – М.: Практика, 1999. – 460 с.
14. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V // J. Immunol. Meth. – 1995. – Vol. 184. – P. 39–51.
15. Пономарева В.Л., Высеканцев И.П., Гурина Т.М., Онасенко Е.С., Пишкото О.М. Изучение влияния условий криоконсервирования на жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, иммуобилизованных в альгинатном геле // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – Вип. 2, Т. 1 (92). – С. 14–17.



16. *Algaier J., Himes R.H.* The effect of DMCO on the kinetics of tubulin assembly // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1988. – Vol. 954, № 3. – P. 235–243.

17. *Yamamoto N.* Effects of dimethyl sulfoxide on cytosolic ionized calcium concentration and cytoskeletal organization of hepatocytes in a primary culture // *J. Cell Struct. and Funct.* – 1989. – Vol. 14, № 14. – P. 75–85.

18. *Билич Г.Л., Крыжановский В.А.* Биология. Полный курс: В 4 т. – издание 5-е, дополненное и переработанное. – М.: Издательство Оникс, 2009. – Т. 1. – 864 с.

Стаття надійшла до редакції 04.06.2015 р.

