

Влияние режимов замораживания на адгезивные свойства криоконсервированных грибов *Candida albicans*

UDC 57.043.085.23:579

A.YU. SIRENKO*, V.F. MARTSENYUK, T.F. PETRENKO

Effect of Freezing Regimens on Adhesive Properties of Cryopreserved Fungi *Candida albicans*

Дрожжеподобные грибы *Candida albicans* являются условно-патогенными микроорганизмами, которые вызывают местные и системные заболевания у людей с ослабленным иммунитетом. Одним из основных факторов вирулентности на ранних стадиях колонизации и инфицирования тканей является адгезия к ткани хозяина.

Адгезия дрожжеподобных грибов достигается при комбинации специфического и неспецифического механизмов. Специфический механизм включает лиганд-рецепторное взаимодействие, неспецифический механизм обусловлен электростатическими силами, агрегацией и гидрофобностью клеточной поверхности и является первичным и обратимым. Этиотропное лечение заболеваний, вызванных *C. albicans*, основано на использовании противогрибковых препаратов, вызывающих гибель или задерживающих рост грибов. В настоящее время разрабатывается альтернативный подход, нацеленный на блокирование адгезии дрожжей к ткани хозяина, что особенно эффективно при местных инфекциях, когда неадгезированные клетки грибов можно удалить из пораженного участка [4]. Влияние криоконсервирования на адгезивные свойства микроорганизмов, в том числе дрожжеподобных грибов, ранее не изучалось.

Цель работы – изучение адгезивной активности клеток *C. albicans* после криоконсервирования.

Материалы и методы

В экспериментах оценивали адгезию клеток *C. albicans* ATCC 885, криоконсервированных по разным режимам, к культуре клеток фибробластов человека.

Грибы *C. albicans* выращивали на сусло-агаре в течение 24 ч, инокулировали в жидкую среду на основе сусла пивного [2] и культивировали 18 ч при температуре 30°C. Клетки замораживали со скоростями 7 и 200°C/мин до –70°C в программном

Yeast-like fungi *Candida albicans* being opportunistic pathogenic microorganisms are able to cause some local and systemic diseases in immunocompromised humans. Among a great variety of virulence factors the ability for adhesion on the tissues of host is extremely important at early stages of colonization and infectioning of tissues. Adhesion in yeast-like fungi is achieved by combination of specific and non-specific mechanisms enabling them to be adhered to numerous types of tissues. Specific mechanism includes ligand-receptor interaction. Non-specific one does electrostatic forces, aggregation and hydrophobicity of cell surface. Non-specific interactions are primary mechanism (acting on longer distances) involved into the adhesion process and is reversible one. Etiotropic treatment of diseases caused by *C. albicans* is based on use of anti-fungal preparations causing either lethal damages of fungi or inhibiting their growth. Recently an alternative approach aimed to blocking the adhesion of yeast in host tissues, that will be more effective at local infections, in particular in the situations when non-adhered cells of fungi may be removed from the damaged site [4]. Cryopreservation effect on adhesive properties of microorganisms, including yeast-like fungi has not been studied.

The research aim was to study the adhesive activity of *C. albicans* cells after cryopreservation.

Materials and methods

In experiments the adhesion of *C. albicans* ATCC 885 cells was studied in human fibroblast culture after freezing with various rates.

The *C. albicans* fungi were grown on wort agar for 24 hrs, inoculated into liquid media based on beer wort and cultured for 18 hrs at 30°C [2]. The cells were frozen with the rates of 7 and 200°C/min down to –70°C with programmable freezer with following plunging into liquid nitrogen. As cryopreservation medium culture medium, distilled water with adding or

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-11, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4111, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

замораживателе, затем погружали в жидкий азот. В качестве среды консервирования использовали среду культивирования или дистиллированную воду с или без добавления 5% ДМСО. Криоконсервированные образцы размораживали на водяной бане при 30°C. Жизнеспособность клеток определяли «чашечным» методом Коха [1]. Для изучения адгезии клетки *C. albicans* отмывали от среды криоконсервирования двукратным центрифугированием (7 мин при 1500 об/мин) в стерильном фосфатно-солевом буфере и готовили суспензию в растворе Хенкса с концентрацией 10⁷кл/мл. Клетки фибробластов человека культивировали в среде 199 с добавлением 10%-й эмбриональной сыворотки при 37°C. Для перевода клеток в суспензию монослой обрабатывали смесью Версена (0,2%) с трипсином (0,25%). Культуру клеток фибробластов человека отмывали фосфатно-солевым буфером от ростовой среды и суспендировали в растворе Хенкса до концентрации 10⁵ кл/мл. Полученные суспензии клеток *C. albicans* и фибробластов смешивали в соотношении 1:1, инкубировали 1,5 ч при 37°C, встряхивая каждые 5 мин, делали мазки на покровных стеклах, окрашивали кристаллическим фиолетовым [3] и исследовали под микроскопом. В каждом опыте подсчитывали количество адгезированных клеток *C. albicans* на 500 фибробластах и определяли показатель адгезии – среднее количество клеток, прикрепившихся к одному фибробласту (рис. 1).

Результаты и обсуждение

Типичный вид адгезии клеток *C. albicans* к фибробластам человека под микроскопом приведен на рис. 1. В результате подсчета количества клеток *C. albicans*, прикрепившихся к одному фибробласту, и вычисления показателя адгезии установлено, что показатели адгезии *C. albicans* коррелировали с жизнеспособностью клеток после криоконсервирования. Более высокие показатели жизнеспособности и адгезивной активности грибов *C. albicans* обеспечивал режим замораживания со скоростью 7°C/мин в среде, содержащей 5% ДМСО. Наблюдалось снижение жизнеспособности в образцах, криоконсервированных в средах на основе сула или дистиллированной воды (рис. 2). Аналогичная зависимость была получена и в экспериментах по изучению адгезии (рис. 3).

Выводы

1. Адгезивные свойства криоконсервированных клеток *C. albicans* коррелировали с их жизнеспособностью клеток после криоконсервирования.
2. Наибольший показатель адгезии обеспечивал режим замораживания со скоростью 7°C/мин в среде, содержащей 5% ДМСО.

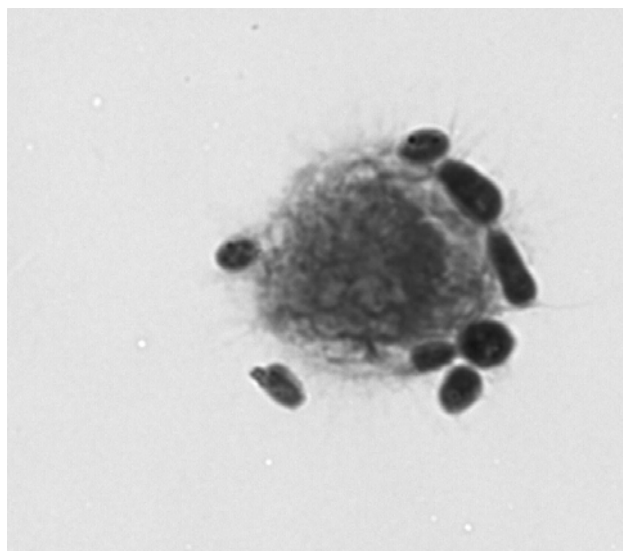


Рис. 1. Адгезия клеток *C. albicans* к фибробластам человека.

Fig. 1. Adhesion of *C. albicans* cells to human fibroblasts.

without 5% DMSO was used. Cryopreserved samples were thawed on water bath at 30°C. Viability was examined with dish Koch's method [1]. For studying the adhesion the *C. albicans* cells were washed out from the medium using 2 centrifugation cycles (7 minutes at 1,500 rot/min) in sterile phosphate saline buffer and the suspension in Hank's solution with concentration of 10⁷cells/ml was prepared. Human fibroblast cells were cultured in medium 199 with adding 10% embryonic serum at 37°C. For the transfer of the cells into the suspension the monolayer was treated with the mixture of versen (0.2%) and trypsin. Human fibroblast culture was washed-out with phosphate-saline buffer from growth medium and suspended in Hanks' solution up to the concentration of 10⁵ cells/ml. The resulted cell suspensions for *C. albicans* and fibroblasts were mixed in 1:1 ratio, incubated for 1.5 hrs at 37°C by shaking each 5 mins, the smears were prepared on cover slips, then stained with crystalline violet [3] and examined under microscope. In each experiment the number of adhered *C. albicans* on 500 fibroblasts and the adhesion index, an average number of cells adhered to a fibroblast, was examined.

Results and discussion

Typical adhesion of *C. albicans* cells to human fibroblasts under microscopy is represented in Fig. 1. In the result of counting of the number of *C. albicans* cells, adhered to one fibroblast, and calculating the adhesion index it has been found that the adhesion indices for *C. albicans* correlated to the post-thaw viability of cells. Higher indices of viability and adhesive activity of *C. albicans* fungi was provided by freezing regimen with the rate of 7°C/min in the medium, containing 5% DMSO. The reduction of viability in the samples cryopreserved in the media

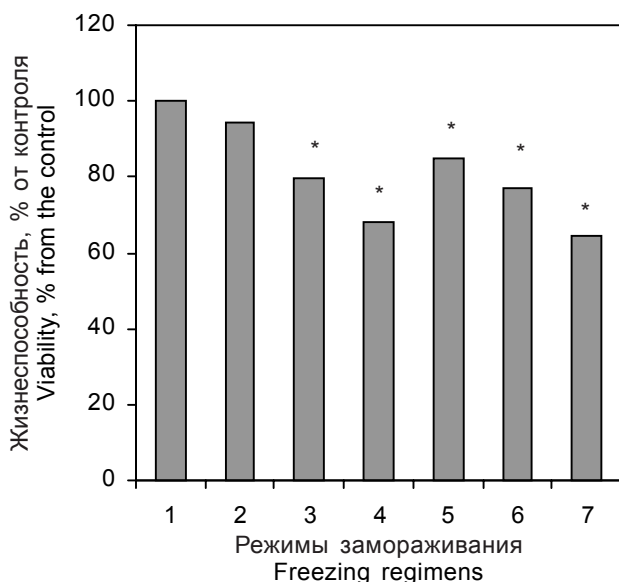


Рис. 2. Показатель жизнеспособности *C. albicans* для разных режимов криоконсервирования: 1 – контроль; 2 – 5% ДМСО в сусле, 7°C/мин; 3 – сусло, 7°C/мин; 4 – вода, 7°C/мин; 5 – 5% ДМСО в сусле, 200°C/мин; 6 – сусло, 200°C/мин; 7 – вода, 200°C/мин; * – статистически значимые различия между контролем и режимом консервирования, $p \leq 0,05$.

Fig. 2. Viability indices of *C. albicans* cells for different cryopreservation regimens: 1 – control; 2 – 5% DMSO in wort, 7°C/min; 3 – wort, 7°C/min; 4 – water, 7°C/min; 5 – 5% DMSO in wort, 200°C/min; 6 – wort, 200°C/min; 7 – water, 200°C/min; * – statistically significant differences between the control and cryopreservation regimen, $p \leq 0.05$.

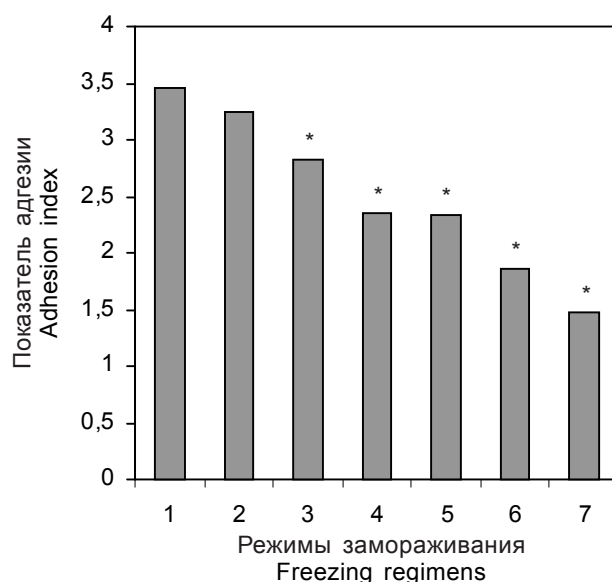


Рис. 3. Показатель адгезии *C. albicans* для разных режимов криоконсервирования: 1 – контроль; 2 – 5% ДМСО в сусле, 7°C/мин; 3 – сусло, 7°C/мин; 4 – вода, 7°C/мин; 5 – 5% ДМСО в сусле, 200°C/мин; 6 – сусло, 200°C/мин; 7 – вода, 200°C/мин; * – статистически значимые различия между контролем и режимом консервирования, $p \leq 0,05$.

Fig. 3. Adhesion indices of *C. albicans* for different cryopreservation regimens: 1 – control; 2 – 5% DMSO in wort, 7°C/min; 3 – wort, 7°C/min; 4 – water, 7°C/min; 5 – 5% DMSO in wort, 200°C/min; 6 – wort, 200°C/min; 7 – water, 200°C/min; * – statistically significant differences between the control and cryopreservation regimen, $p \leq 0.05$.

Литература

1. Луста К.А., Фикте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Под ред. В.К. Ерошина. – Пуцино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. – 186 с.
2. Микробиологический контроль хлебопекарного производства. – М.: Пищевая промышленность, 1976. – 144 с.
3. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / Под ред. В.В. Теца. – М.: Медицина, 2002. – 350 с.
4. Cotter G., Kavanagh K. Adherence mechanisms of *Candida albicans* // Br. J. Biomed. Sci. – 2000. – Vol. 57, N3. – P. 241–249.

Поступила 13.05.2008

based on either wort or distilled water (Fig. 2) was observed. The same dependence was obtained in the experiments for studying the adhesion (Fig. 3).

Conclusions

1. Adhesive properties of cryopreserved *C. albicans* correlated to viability of cells after cryopreservation.
2. The highest index of adhesion was provided by freezing regimen with the rate of 7°C/min in the medium containing 5% DMSO.

References

1. Lusta K.A., Fikhte B.A. Methods of examining viability of microorganisms/ Ed. By V.K. Eroshin. – Puschino: DSTI of the SCL I of the Academy of Sciences of the USSR, 1990. – 186 p.
2. Microbiological control of bakery production. – Moscow: Food industry, 1976. – 144 p.
3. Manual to practical works in medical microbiology, virusology and immunology / Ed. by V.V. Tets. – Moscow: Meditsina, 2002. – 350 p.
4. Cotter G., Kavanagh K. Adherence mechanisms of *Candida albicans* // Br. J. Biomed. Sci. – 2000. – Vol. 57, N3. – P. 241–249.

Accepted in 13.05.2008