

## Сравнительное изучение влияния режимов криоконсервирования на свободные и иммобилизованные клетки пробиотика *Saccharomyces boulardii*

UDC 57.043:579.61

I.P. VYSEKANTSEV\*, O.M. BABINETS, V.F. MARTSENYUK, T.M. GURINA

### Comparative Study of Influence of Cryopreservation Regimens on Free and Immobilized Cells of *Saccharomyces boulardii* Probiotic

Проведено сравнительное изучение влияния режимов охлаждения и состава консервирующих сред на свободные и иммобилизованные на энтеросорбентах клетки пробиотика *Saccharomyces boulardii*. Установлено более высокую жизнеспособность свободных клеток дрожжей при всех режимах криоконсервирования. Сохранность комплексов «носитель-клетки» была значительно ниже. Охлаждение со скоростью 1 град/мин обеспечивает максимальную жизнеспособность свободных и иммобилизованных клеток.

**Ключевые слова:** пробиотики, криоконсервирование, иммобилизация на энтеросорбентах.

Проведено порівняльне вивчення впливу режимів охолодження і складу консервуючих середовищ на вільні та іммобілізовані на ентеросорбентах клітини пробіотика *Saccharomyces boulardii*. Встановлено більш висока життєздатність вільних клітин дріжджів при всіх режимах криоконсервування. Збереженість комплексів «носії-клітини» була значно нижчою. Охолодження зі швидкістю 1 град/хв забезпечує максимальну життєздатність вільних і іммобілізованих клітин.

**Ключові слова:** пробіотики, криоконсервування, іммобілізація на ентеросорбентах.

The influence of cooling regimens and preserving media composition on *Saccharomyces boulardii* probiotic free cells and those immobilized on enterosorbents, was comparatively studied. The preservation of higher viability of free yeast cells was established after application of all the cryopreservation regimens. The viability of 'carrier-cells' complexes was much lower. Cooling with 1 degree/min rate provided the maximum viability for free and immobilized cells.

**Key words:** probiotics, cryopreservation, immobilization on enterosorbents.

Вследствие современного ритма и условий жизни человека развиваются так называемые болезни цивилизации, одной из которых является дисбиоз кишечника – клинико-лабораторный синдром, связанный с изменением качественного и/или количественного состава микробиоценоза, транслокацией различных его представителей в несвойственные биотопы, метаболическими и иммунными нарушениями, сопровождающимися у части пациентов клиническими симптомами [10].

Важным звеном в лечении дисбиоза является использование пробиотиков и энтеросорбентов [8]. Применение пробиотиков обусловлено их защитным действием по отношению к чужеродной патогенной и условно-патогенной микрофлоре за счет различных механизмов. Они прямо конкурируют с ней за питательные субстраты и сайты адгезии, продуцируют соединения, подавляющие ее рост (перекись водорода, короткоцепочечные жирные кислоты, молочную кислоту, пироглютамат). Многие штаммы пробиотиков вырабатывают бактериоцины – антибактериальные вещества, которые

Due to an contemporary life rhythm and conditions the human suffers from so-called civilization diseases, one of which is intestinal dysbiosis, representing a clinical and laboratory syndrome, associated to a changed qualitative and/or quantitative composition of microbiocenosis, translocation of its different representatives into unusual biotopes, metabolic and immune disorders, accompanied by clinical symptoms in some patients [10].

An important link in dysbiosis treatment is the use of probiotics and enterosorbents [8]. The application of probiotics is stipulated by their protective effect against the foreign pathogenic and opportunistic pathogenic microflora by involving different mechanisms. They are in a direct competition for nutrient substrates and adhesive sites, produce substances, which suppress pathogenic development (oxygen peroxide, short-chain fatty acids, lactic acid, pyroglutamate). Many probiotic strains produce bacteriocins, *i. e.* antibacterial substances, suppressing growth of other microbes as well. This ability is highly inherent to representatives of *Enterococcus* and *Lactobacterium* genera. Probiotics cau-

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-31-26, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:  
vysekantsev49@mail.ru

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 31 26, fax: +380 57 373 3084, e-mail: vysekantsev49@mail.ru

также угнетают рост других микробов. Этой способностью в высокой степени обладают представители родов *Enterococcus* и *Lactobacterium*. Пробиотики оказывают также прямое антитоксическое действие – нейтрализуют цито- и энтеротоксины вирусов и бактерий. Так, в исследовании D. Czerucka [14] было показано уменьшение секреции натрия и воды, а также снижение образования цАМФ в кишечнике больных острой инфекционной диареей после приема *S. boulardii*. Наиболее сильное прямое антимикробное и антитоксическое действие было выявлено у конкурентных пробиотиков *S. boulardii* и *Bacillus subtilis* [19]. Адгезия к кишечному эпителию – одно из важнейших свойств пробиотиков. Они присоединяются к эпителию с помощью гликоконъюгированных рецепторов, обеспечивают колонизационную резистентность, препятствуют адгезии и инвазии патогенов. На культуре колоноцитов Caco2 [13] было показано, что живые штаммы пробиотиков адгезируют к эпителию и тем самым: укрепляют цитоскелет интестинальных эпителиоцитов (усиливаются экспрессия тропомиозина ТМ-5, синтез актина и окклюзина); уменьшают проницаемость (повышается фосфорилирование белков межклеточных соединений); повышают синтез муцина (стимуляция гена *muc-3*); стимулируют синтез и активацию рецептора эпителиального фактора роста и увеличивают синтез гормоноподобных веществ – полиаминов, которые усиливают процесс регенерации эпителия.

Вышеописанные механизмы способствуют повышению защитных свойств кишечного эпителия. Помимо защитных свойств пробиотики выполняют дигестивную функцию [10].

На современном фармацевтическом рынке представлены различные коммерческие формы препаратов пробиотиков: сухие, изготовленные способом тепловой сушки или лиофилизации, а также жидкие – в ростовой или защитной среде [11, 12, 18].

При разработке новых форм иммунобиологических препаратов и биологически активных добавок особое внимание уделяется иммобилизованным на/в различных носителях препаратам микроорганизмов и их метаболитов. Поскольку пробиотики и энтеросорбенты являются важным звеном в терапии дисбиоза, мы провели исследования по созданию препаратов пробиотиков, иммобилизованных на углеродсодержащих энтеросорбентах [4, 5].

Иммобилизация на энтеросорбентах показана прежде всего для пробиотиков, обладающих слабой способностью к колонизации кишечника человека, например дрожжей *S. boulardii*, на основе которых создан препарат «Энтерол». Установлено, что при экспериментальном антибиотико-ассоциированном и иммуносупрессивном дисбиозе иммобилизо-

se also a direct antitoxic effect: they neutralize the viral and bacterial cyto- and enterotoxins. For example, Czerucka D. [14] demonstrated the reduction of potassium and water secretion, as well as a decrease in cAMP formation in intestine of patients with acute inflectional diarrhea after *S. boulardii* intake. The strongest direct anti-microbial and antitoxic effect was revealed in competitive probiotics *S. boulardii* and *Bacillus subtilis* [19]. One of the most important properties of probiotics is their adhesion to intestinal epithelium. They attach to epithelium by means of glycoconjugated receptors, provide a colonizational resistance, and prevent the adhesion and invasion of pathogens. In the Caco2 colonocyte culture [13] the alive probiotic strains were shown as adhering to epithelium, thereby strengthening the cytoskeleton of intestinal epithelial cells (intensified expression of tropomyosin TM-5, actin and occlusin synthesis); reducing the permeability (increased protein phosphorylation of intercellular substances); increasing mucin synthesis (*muc-3* gene stimulation); stimulating synthesis and activation of epithelial growth factor receptor and augmenting synthesis of hormone-like substances, polyamines, which strengthen epithelial regeneration.

The described above mechanisms contribute to an increase in protective properties of intestinal epithelium. In addition to protective properties the probiotics accomplish a digestive function as well [10].

At the current pharmaceutical market there are presented different commercial forms of probiotic preparations: dry, made with heat dehydration or freeze-drying, as well as liquid ones – produced in growth or protective media [11, 12, 18].

When developing the novel forms for immunobiological preparations and dietary supplements a special attention is focused to the microorganism preparations, immobilized on/in different carriers and their metabolites. Since the probiotics and enterosorbents are an important link in dysbiosis therapy, we performed the studies on designing probiotic preparations, immobilized on carbon-containing enterosorbents [4, 5].

The immobilization on enterosorbents is administered primarily for probiotics with a poor ability to colonize human intestine, such as *S. boulardii* yeast, on which basis the Enterol preparation was designed. It was established, that under experimental antibiotic-associated and immune suppressive dysbiosis the *S. boulardii* probiotic, immobilized on enterosorbents caused more pronounced therapeutic effect, with noted more prolonged persistence of *S. boulardii* in animal intestine [1, 2].

Immobilized on carriers probiotics may be used to design the novel preparations, comprising additional components, which may be immobilized on carrier as well. Most existing methods for storing cultures of microorganisms and microbial products occurred to be

ванный на энтеросорбентах пробиотик *S. boulardii* оказывал более выраженный терапевтический эффект, при этом наблюдалась более длительная персистенция *S. boulardii* в кишечнике животных [1, 2].

Иммобилизованные на носителях пробиотики могут использоваться для создания новых препаратов, включающих дополнительные компоненты, которые также могут быть иммобилизованы на носителе. Большинство существующих методов хранения культур микроорганизмов и микробных препаратов оказались малопригодными для хранения иммобилизованных дрожжей *S. boulardii*. Показано, что дрожжевые клетки значительно утрачивают жизнеспособность при субнулевых и умеренно низких температурах, а также в процессе тепловой сушки и лиофилизации [3, 16]. Использование промышленной холодильной техники с температурой хранения  $-80^{\circ}\text{C}$  и криогенного оборудования позволяет хранить препарат при температуре  $-80$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Поскольку технологии криоконсервирования иммобилизованных препаратов находятся в стадии разработки, целью настоящего исследования было сравнительное изучение влияния режимов охлаждения и состава консервирующих сред на жизнеспособность свободных и иммобилизованных на энтеросорбентах клеток *S. boulardii*.

### Материалы и методы

Эксперименты проводили с клетками *S. boulardii*. Культура дрожжей была выделена из коммерческого препарата «Энтерол-Т» («Biocodex», Франция). Клетки иммобилизовали на энтеросорбентах «Сорбекс» («Экосорб», Украина) и «СУМС-1» («Новосибхимфарм», Россия) по разработанному нами методу [5].

Энтеросорбент «СУМС-1» представляет собой гранулы из окиси алюминия диаметром около 0,1 мм. На поверхность гранул нанесена пленка из углерода (Инструкция по применению энтеросорбента «СУМС-1». Регистрационный № 93/174/7, утверждена Фармакологическим государственным комитетом Министерства здравоохранения РФ 12.03.1998). Препарат «Сорбекс» – гранулированный активированный уголь с размером гранул 0,20–0,63 мм (Инструкция для медичного застосування препарату «Сорбекс». Реєстраційне посвідчення №UA/10156/01/01, затверджено наказом МОЗ України №762 від 22.10.2009). Для иммобилизации к сорбенту добавляли суспензию клеток с концентрацией  $5 \times 10^7$  кл/мл. При этом с сорбентом связывалось 20% клеток. Свободные и иммобилизованные клетки суспендировали в дистиллированной воде, физиологическом растворе, пивном сусле ( $8^{\circ}\text{B}$ ), 5 и 10%-х растворах сахарозы, а также 5%-м водном растворе ДМСО. Образцы охлаждали в криопробирках объемом 2,0 мл со скоростями 1;

unsuitable for storage of *S. boulardii* immobilized yeast. The yeast cells were shown as significantly losing their viability under subzero and moderately low temperatures, as well as during heat drying and lyophilization [3, 16]. The use of industrial refrigerators with storage temperature of  $-80^{\circ}\text{C}$  and cryogenic equipment enables its storage at  $-80$  and  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Since the cryopreservation techniques for immobilized preparations are under development, this research aim was a to perform a comparative study of influence caused by cooling regimens and composition of preservation media on the viability of *S. boulardii* free cells and those, immobilized on enterosorbents.

### Materials and methods

Experiments were carried-out with *S. boulardii* cells. Yeast culture was isolated from a commercial preparation Enterol-T (Biocodex, France). Cells were immobilized on enterosorbents Sorbex (Ekosorb, Ukraine) and SUMS-1 (Novosibchimfarm, Russia) according to the developed by us method [5].

The enterosorbent SUMS-1 represents aluminum oxide granules with diameter of about 0.1 mm. The granule surface is covered with carbon film (Instructions for use of enterosorbent SUMS-1. Registration 93/174/7, approved by the State Pharmacological Committee of the Ministry of Health Care of Russia of 12.03.1998). Sorbex preparation is a granular activated carbon with 0.20–0.63 mm granule size (Instruction for medical application of Sorbex preparation. Registration Certificate UA/10156/01/01, approved by the decree of the Ministry of Health Care of Ukraine N762 of 22.10.2009). Cell suspension of  $5 \times 10^7$  cells/ml was added to sorbent for immobilization; 20% of cells were bound with sorbent after the procedure. Free and immobilized cells were suspended in distilled water, physiological saline, beer wort ( $8^{\circ}\text{B}$ ), 5 and 10% sucrose solutions, as well as 5% DMSO aqueous solution. The samples were cooled in 2.0 ml cryovials with 1, 5, 10, 15, 20, 40 degree/min rates down to  $-70^{\circ}\text{C}$  and following immersion into liquid nitrogen, as well as via direct immersion into liquid nitrogen. Freezing was performed using a programmable freezer Cryoson (Germany). Frozen samples were stored in liquid nitrogen. Thawing was done in a water bath at  $30^{\circ}\text{C}$ . The viability of free cells was evaluated with the Koch's pour-plate method as a number of macrocolonies formed on wort agar-agar [7]. The viability of immobilized cells was assessed in the following way: the preparation was released of non-immobilized cells via filtration, then the filter was placed into a centrifuge tube with a special holder, centrifuged and the resulting carrier-cells complexes were transferred from filters into 0.2% agarose gel, after serial dilutions in the gel the complexes were plated on Petri dish by embedding [7]. After culturing we calculated the macrocolonies formed by complexes of carrier and cells, immobilized on its surface (CFU).

5; 10; 15; 20; 40 град/мин до  $-70^{\circ}\text{C}$  и затем погружали в жидкий азот, а также прямым погружением в жидкий азот. Замораживание проводили в программном замораживателе «Cryoson» (Германия). Замороженные образцы хранили при температуре жидкого азота. Отогревали их на водяной бане при  $30^{\circ}\text{C}$ . Жизнеспособность свободных клеток оценивали «чашечным» методом Коха по количеству образовавшихся на сусло-агаре макроколоний [7]. Сохранность иммобилизованных клеток изучали по разработанной нами методике: препарат освобождали от неиммобилизованных клеток фильтрацией, затем фильтр переносили в центрифужную пробирку со специальным держателем, центрифугировали и полученные комплексы «носитель-клетки» переносили с фильтров в 0,2%-й агарозный гель, после серийных разведений в нем комплексы высевали на чашки Петри глубинным способом [7]. После культивирования учитывали макроколонии, которые были сформированы комплексами «носитель-клетки», иммобилизованные на его поверхности (КОЕ).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы SPSS Statistics 17.0.

### Результаты и обсуждение

В экспериментах по криоконсервированию свободных клеток *S. boulardii* было установлено, что на их жизнеспособность значительное влияние оказывают скорость охлаждения и состав среды консервирования. При этом высокие показатели жизнеспособности отмечали даже при замораживании клеток, суспендированных в физиологическом растворе без добавления криопротекторов (рис. 1, А). При замораживании образцов во всех средах консервирования охлаждение со скоростью 1 град/мин обеспечивало сохранение исходного количества жизнеспособных клеток. При увеличении скорости охлаждения показатели жизнеспособности клеток снижались и достигали минимума в образцах, замороженных погружением в жидкий азот.

При замораживании клеток, суспендированных в пивном сусле и 5%-м водном растворе ДМСО, изменение показателей жизнеспособности было однотипным – с увеличением скорости охлаждения количество жизнеспособных клеток уменьшалось (рис. 1, В, С).

Наиболее высокие показатели жизнеспособности наблюдали при замораживании в 5%-м растворе сахарозы. В этом случае сохранение исходного количества жизнеспособных клеток *S. boulardii* обеспечивало замораживание со скоростями 1; 5; 10 град/мин (рис. 1, D). С увеличением скорости охлаждения показатели жизнеспособности в этих средах также снижались, достигая минимума в об-

The obtained results were statistically processed using SPSS Statistics 17.0 Software.

### Results and discussion

During experiments on *cryopreservation of S. boulardii* free cells we established, that their viability was strongly affected by cooling rate and preservation medium composition. At the same time the high viability was observed even under freezing of cells, suspended in physiological saline without any cryoprotectant (Fig. 1A). Freezing of samples in all preservation media using cooling rate of with 1 deg/min allowed to preserve the initial amount of viable cells. The increasing of cooling rate led to a decrease in cell viability which reached the minimum in the samples, frozen by immersion into liquid nitrogen.

When freezing cells, suspended in beer wort and 5% DMSO aqueous solution, the change in viability indices was similar, *i. e.* with increasing cooling rate the number of viable cells decreased (Fig. 1B, C).

The highest viability indices were observed after freeze-thawing in 5% sucrose solution. In this case the preservation of initial viability of *S. boulardii* cells was provided by freezing with 1; 5; 10 deg/min cooling rates (Fig. 1D). Increasing of cooling rate resulted in decrease of viability indices in these media and reached the minimum in the samples, immersed into liquid nitrogen. Elevation of sucrose concentration up to 10% in had no effect in terms of viability in the samples frozen with 1 deg/min cooling rate. Statistically significant decrease in viability was observed in case of cooling with 5 and 10 deg/min rates (Fig. 1E). The established differences in the protective effect between 5 and 10% sucrose solutions were most likely due to the fact, that a selectively permeable plasmatic membrane of yeast cell is located under a rigid cell wall. Therefore, the dehydration of a cell in hypertonic solution results in deformation of plasmatic membrane areas, which are not tightly bound with cell wall. If the hypertonicity of extracellular solution rises the probability of damage in cell membrane increases. Apparently, 10% sucrose solution, being more hypertonic vs. intracellular solution comparing to 5% solution results in a more pronounced cell damage due to mentioned deformation [6].

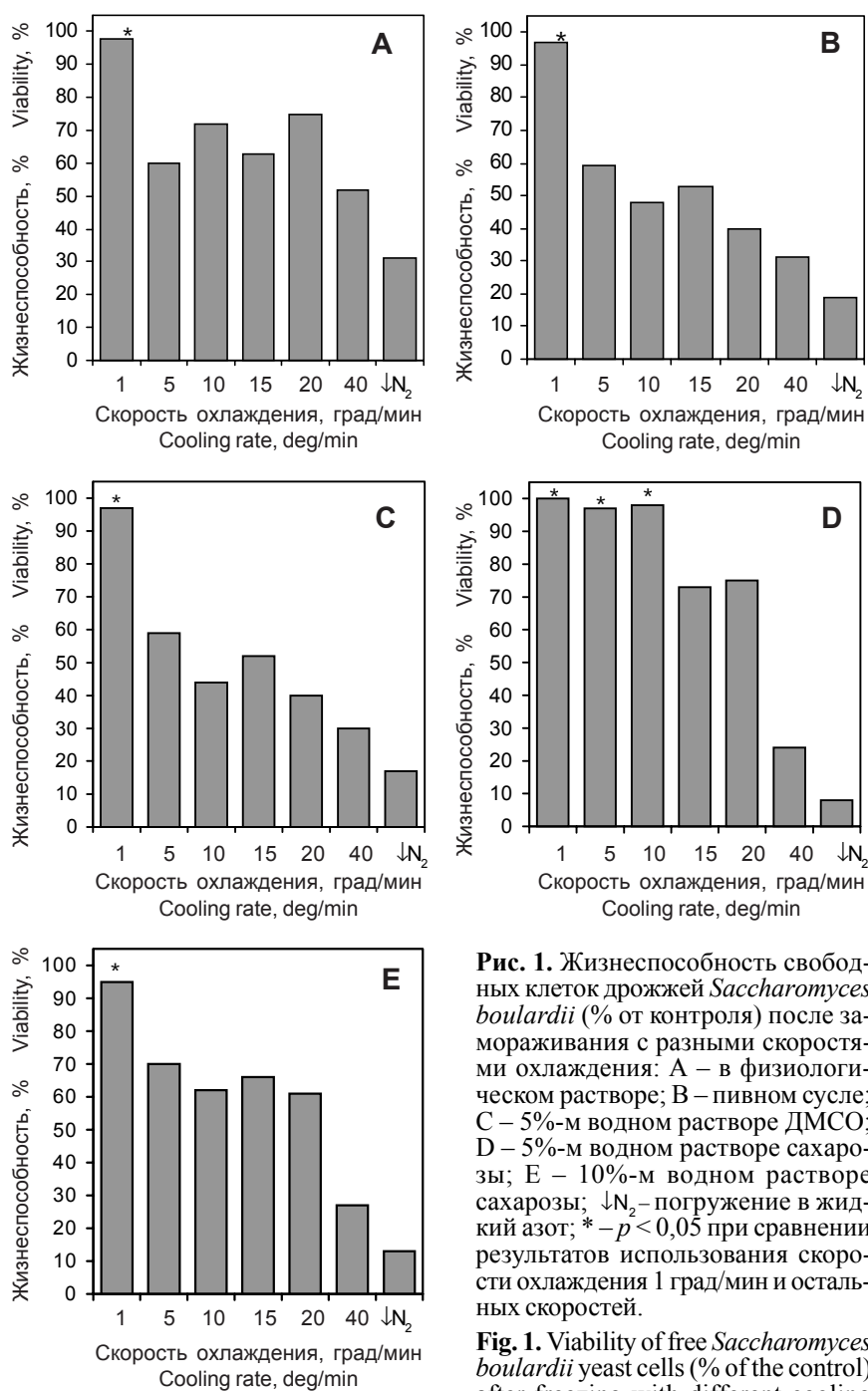
When studying the viability of immobilized cells we considered the macrocolonies, formed mainly by the ‘carrier-cells’ complexes. In different versions of this experiment a part of macrocolonies was formed by single non-adsorbed cells. However, this index varied and was independent on both cooling regimen and preservation medium composition.

The number of colony-forming complexes ‘carrier-cells’ under the whole cryopreservation regimens was established to be significantly lower, than during freezing of cell suspensions. The maximum viability of cells, immobilized on different carriers was observed if cooling

разцах, погруженных в жидкий азот. При повышении концентрации сахарозы до 10% в образцах, замороженных со скоростью 1 град/мин, количество жизнеспособных клеток не уменьшалось. При охлаждении со скоростями 5 и 10 град/мин наблюдали достоверное снижение жизнеспособности (рис. 1, E). Установленные различия в выраженности защитного действия между 5 и 10%-ми растворами сахарозы, вероятнее всего, связаны с тем, что избирательно проницаемая плазматическая мембрана дрожжевой клетки располагается под жесткой клеточной стенкой. Поэтому, когда клетка обезвоживается в гипертоническом растворе, области плазматической мембраны, не связанные плотно с клеточной стенкой, подвергаются деформации. По мере увеличения гипертоничности внеклеточного раствора вероятность повреждения клеточной мембраны повышается. По-видимому, в 10%-м растворе сахарозы, который является более гипертоничным по отношению к внутриклеточному раствору по сравнению с 5%-м раствором, указанная деформация мембраны приводит к более выраженному повреждению клеток [6].

При исследовании жизнеспособности иммобилизованных клеток мы учитывали макроколонии, образованные преимущественно комплексами «носитель-клетки». В разных вариантах этого эксперимента часть макроколоний была образована единичными десорбированными клетками. Однако этот показатель варьировал и не зависел от режима охлаждения, а также состава среды консервирования.

Установлено, что количество колониеобразующих комплексов «носитель-клетки» после использования всех режимов криоконсервирования было значительно ниже, чем при замораживании клеточ-



**Рис. 1.** Жизнеспособность свободных клеток дрожжей *Saccharomyces boulardii* (% от контроля) после замораживания с разными скоростями охлаждения: А – в физиологическом растворе; В – пивном сусле; С – 5%-м водном растворе ДМСО; D – 5%-м водном растворе сахарозы; E – 10%-м водном растворе сахарозы; ↓N<sub>2</sub> – погружение в жидкий азот; \* –  $p < 0,05$  при сравнении результатов использования скорости охлаждения 1 град/мин и остальных скоростей.

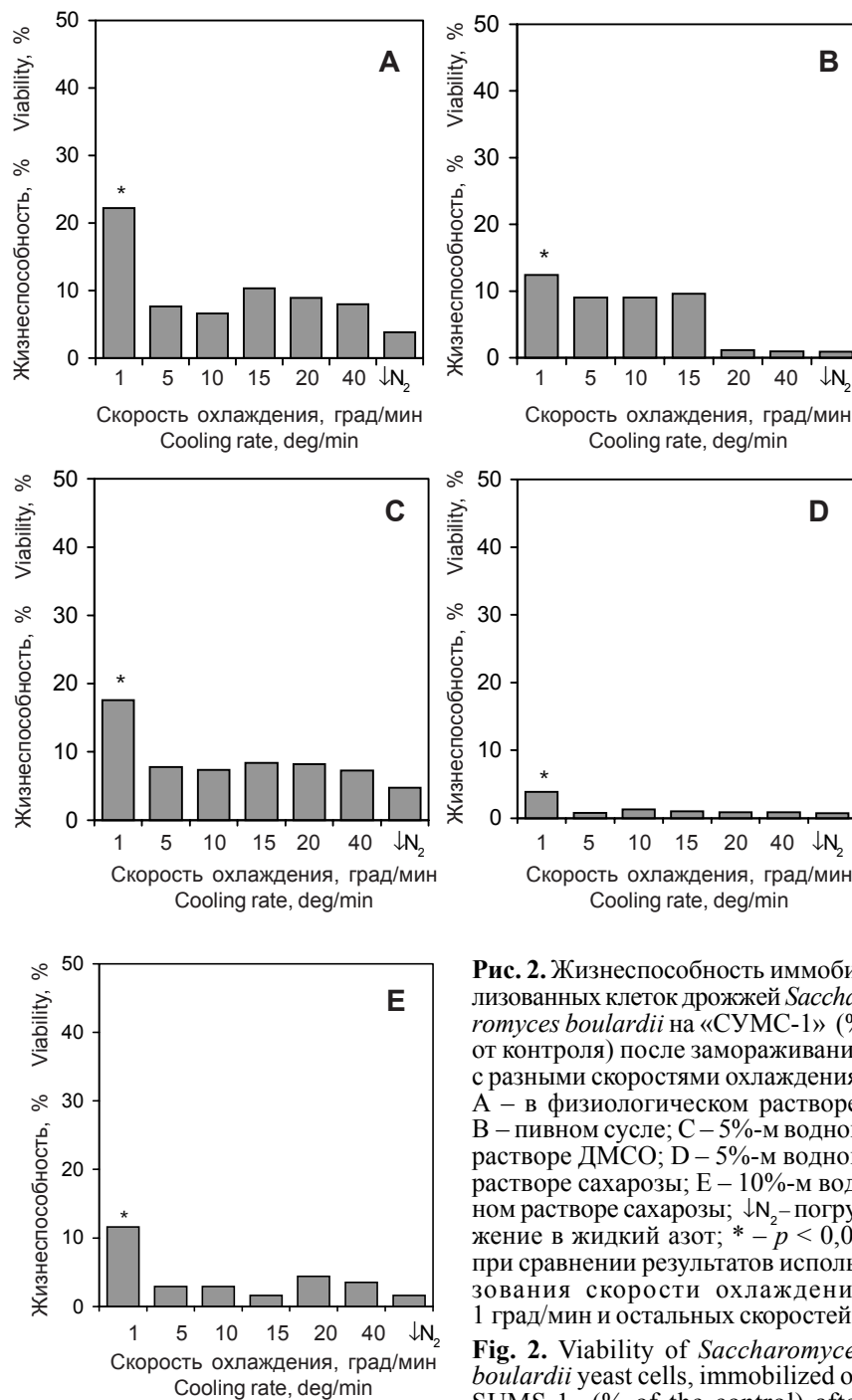
**Fig. 1.** Viability of free *Saccharomyces boulardii* yeast cells (% of the control) after freezing with different cooling rates: A – in physiological saline; B – beer wort; C – 5% DMSO aqueous solution; D – 5% sucrose aqueous solution; E – 10% sucrose aqueous solution; \* –  $p < 0.05$  when comparing the results of cooling with 1 degree/min rate and the other ones.

with 1 deg/min rate. With increasing cooling rates the number of colony-forming complexes in the samples was significantly decreased (Fig. 2, 3). For example, after cooling of cells, immobilized on enterosorbent SUMS-1 with this rate, the post-thaw numbers of CFU in the samples in physiological saline, beer wort, 5% DMSO, 5% sucrose and in 10% sucrose solutions were

ных суспензий. Максимальную сохранность клеток, иммобилизованных на разных носителях, также обеспечивало охлаждение со скоростью 1 град/мин. С повышением скоростей охлаждения количество колониеобразующих комплексов в образцах достоверно снижалось (рис. 2, 3). Так, при охлаждении с этой скоростью клеток, иммобилизованных на энтеросорбенте «СУМС-1», количество КОЕ в образцах с физиологическим раствором составляло 22,2%, с пивным сусликом – 12,43%, с 5%-м раст-вором ДМСО – 17,60%, с 5%-м раствором сахарозы – 3,90%, с 10%-м раствором сахарозы – 11,60% (рис. 2). При повышении скорости охлаждения от 5 град/мин до скорости, обеспечиваемой погружением в жидкий азот количество КОЕ снижалось в различных средах до 0,70–10,32%.

При охлаждении со скоростью 1 град/мин клеток, иммобилизованных на энтеросорбенте «Сорбекс», количество КОЕ в образцах с физиологическим раствором составляло 80,5%, с пивным сусликом – 39,5%, с 5%-м раствором ДМСО – 25,3%, с 5%-м раствором сахарозы – 48,7%, с 10%-м раствором сахарозы – 42,0% (рис.3). При повышении скорости охлаждения от 5 град/мин до скорости, обеспечиваемой погружением в жидкий азот, количество КОЕ снижалось в различных средах до 2,6–6,1%.

При замораживании иммобилизованных клеток в разных средах консервирования различия значений среднего количества КОЕ после охлаждения со скоростью 5–40 град/мин и после погружения в жидкий азот были недостоверными. Представленные результаты свидетельствуют о достаточно высокой исходной криорезистентности дрожжей *S. boulardii* по сравнению с другими микробными клетками, относящимися к низшим эукариотам [15]. При замораживании кле-

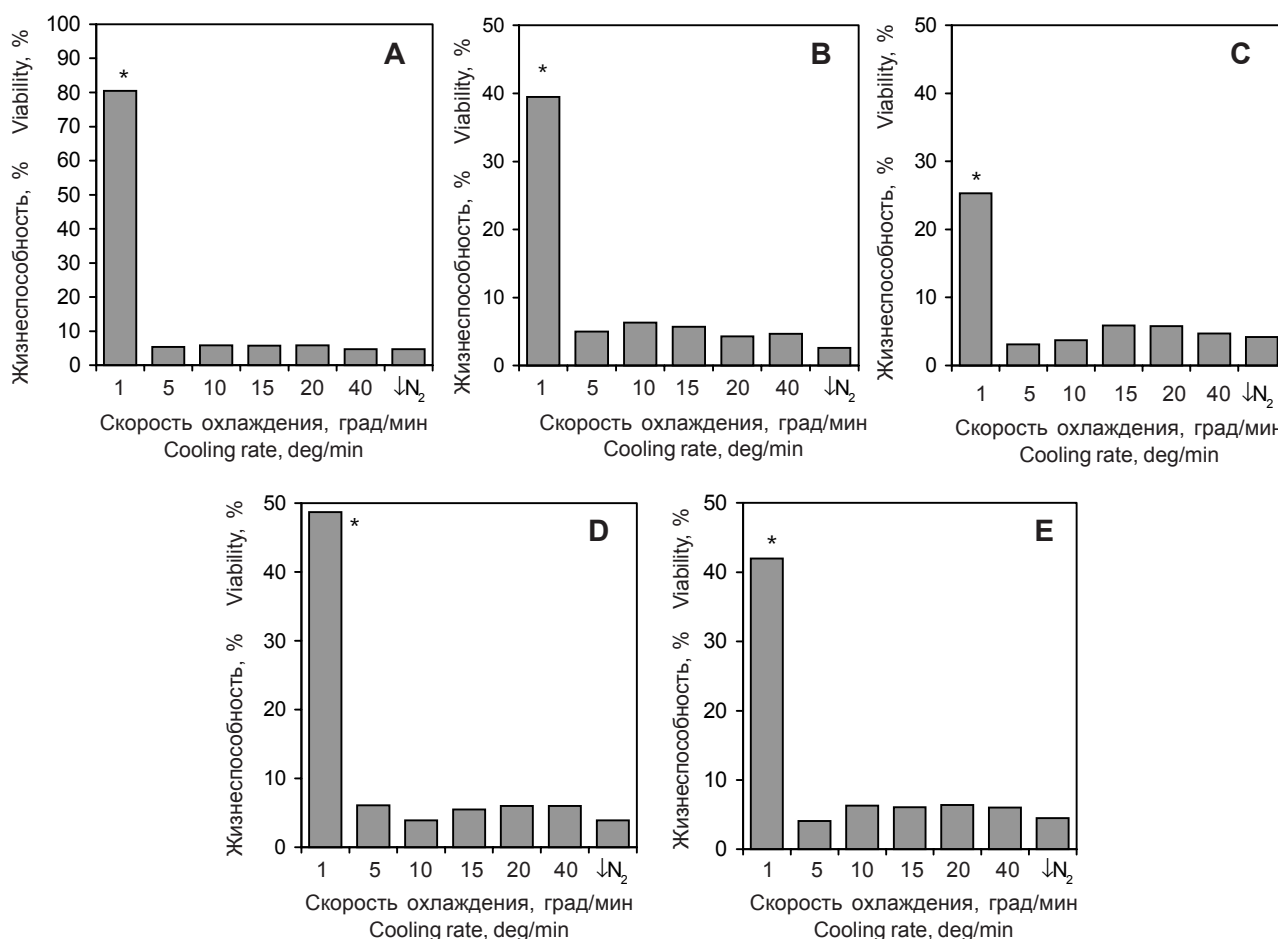


**Рис. 2.** Жизнеспособность иммобилизованных клеток дрожжей *Saccharomyces boulardii* на «СУМС-1» (% от контроля) после замораживания с разными скоростями охлаждения: А – в физиологическом растворе; В – пивном сусле; С – 5%-м водном растворе ДМСО; D – 5%-м водном растворе сахарозы; E – 10%-м водном растворе сахарозы; ↓N<sub>2</sub> – погружение в жидкий азот; \* –  $p < 0,05$  при сравнении результатов использования скорости охлаждения 1 град/мин и остальных скоростей.

**Fig. 2.** Viability of *Saccharomyces boulardii* yeast cells, immobilized on SUMS-1 (% of the control) after freezing with different cooling rates: A – in physiological saline; B – beer wort; C – 5% DMSO aqueous solution; D – 5% sucrose aqueous solution; E – 10% sucrose aqueous solution; \* –  $p < 0.05$  when comparing the results of cooling with 1 degree/min rate and the other ones.

22.2, 12.43, 17.60, 3.90 and 11.60%, correspondingly (Fig. 2). When augmenting cooling rate from 5 deg/min up to one provided by immersion into liquid nitrogen the post-thaw number of CFU decreased in various media down to 0.70–10.32%.

When freezing the Sorbex-immobilized cells with 1 deg/min cooling rate the numbers of CFU in the samples with saline, beer wort, 5% DMSO, 5% sucro-



**Рис. 3.** Жизнеспособность иммобилизованных клеток дрожжей *Saccharomyces boulardii* на «Сорбекс» (% от контроля) после замораживания с разными скоростями охлаждения: А – в физиологическом растворе; В – пивном сусле; С – 5%-м водном растворе ДМСО; D – 5%-м водном растворе сахарозы; E – 10%-м водном растворе сахарозы; ↓N<sub>2</sub> – погружение в жидкий азот; \* –  $p < 0,05$  при сравнении результатов использования скорости охлаждения 1 град/мин и остальных скоростей.

**Fig. 3.** Viability of *Saccharomyces boulardii* yeast cells, immobilized on Sorbex (% of the control) after freezing with different cooling rates: A – in physiological saline; B – beer wort; C – 5% DMSO aqueous solution; D – 5% sucrose aqueous solution; E – 10% sucrose aqueous solution; \* –  $p < 0.05$  when comparing the results of cooling with 1 degree/min rate and the other ones.

точных суспензий этого вида дрожжей факторами, влияющими на жизнеспособность клеток, являются скорость охлаждения и состав среды консервирования. При использовании всех изученных сред консервирования охлаждение со скоростью 1 град/мин обеспечивало жизнеспособность клеток на исходном уровне. По-видимому, эта скорость охлаждения оптимальна для данного вида клеток в соответствии с положениями двухфакторной теории криоповреждений [9, 17].

Комплексы «носитель-клетки» оказались более криолабильными по сравнению со свободными клетками. При этом охлаждение со скоростью 1 град/мин также обеспечивало максимальные показатели жизнеспособности клеток, иммобилизованных на «Сорбекс» и СУМС-1. Это свидетельствует о том, что видовая чувствительность клеток вида *S. boulardii* к процессам кристалли-

se and 10% sucrose solutions were 80.5, 39.5, 25.3, 48.7 and 42.0%, correspondingly (Fig. 3). When elevating cooling rate from 5 deg/min up to the one provided by immersion into liquid nitrogen the number of CFU decreased in various media down to 2.6–6.1%.

During freezing immobilized cells in different preservation media the differences of mean CFU numbers after cooling with 5–40 deg/min rates and after immersion into liquid nitrogen were statistically insignificant.

Presented results testify to quite a high initial cryoresistance of *S. boulardii* yeast as compared with other microbial cells, referring to lower eukaryotes [15]. When freezing cell suspensions of this yeast species namely such factors as cooling rate and preservation medium composition are affecting cell viability. If using all the studied preservation media the cooling with 1 deg/min rate provided cell viability at

зации, зависящим от скорости охлаждения, не изменялась после иммобилизации. Для выяснения причин более низкой жизнеспособности иммобилизованных на носителях клеток по сравнению со свободными клетками необходимо изучить процессы развития повреждающих физико-химических факторов при замораживании этих объектов. На наш взгляд, одним из возможных механизмов повреждения является внутриклеточная кристаллизация, вероятность которой повышается при заданной скорости охлаждения по мере уменьшения поверхностно-объемного отношения клетки и коэффициента проницаемости клеточной мембраны для молекул воды [6]. При замораживании комплексов энтеросорбентов с иммобилизованными на их поверхности клетками образование контактов между поверхностями сорбентов и иммобилизованных клеток эквивалентно уменьшению поверхности клеток, поэтому наиболее высокие значения жизнеспособности наблюдали при самой медленной из исследованных скоростей охлаждения.

### Выводы

1. Впервые проведено исследование жизнеспособности иммобилизованных на энтеросорбентах клеток пробиотика *S. boulardii*. Наиболее высокие показатели жизнеспособности в различных консервирующих средах обеспечивало охлаждение со скоростью 1 град/мин. Повышение скорости охлаждения до 5–40 град/мин и погружение в жидкий азот приводили к достоверному снижению количества КОЕ, образованных комплексами «носитель-клетки».

2. На жизнеспособность иммобилизованных клеток в процессе криоконсервирования влияют физико-химические свойства материала носителя. Более высокие показатели жизнеспособности отмечены в эксперименте с клетками, иммобилизованными на энтеросорбенте «Сорбекс».

3. При охлаждении иммобилизованных клеток со скоростью от 5 до 40 град/мин и погружении в жидкий азот состав исследуемых консервирующих сред не оказывает значимого влияния на колониеобразующую способность комплексов «носитель-клетки».

4. Показатели жизнеспособности свободных клеток достоверно выше, чем у комплексов «носитель-клетки» при всех режимах замораживания. Максимальную жизнеспособность свободных клеток также обеспечивает охлаждение со скоростью 1 град/мин. При данной скорости охлаждения в изучавшихся средах консервирования жизнеспособность клеток *S. boulardii* сохранялась на исходном уровне.

*Авторы выражают глубокую благодарность к.б.н. Ю.А. Петренко за ценные замечания.*

initial level. This cooling rate is apparently optimal for this cell species according to the statements of two-factor theory of cryoinjury [9, 17].

The 'carrier-cells' complexes occurred to be more cryolabile as compared to the non-adsorbed free cells. In this case, cooling with 1 deg/min rate provided the maximum viability indices for cells, immobilized on Sorbex and SUMS-1. This testifies to the fact, that a specific sensitivity of *S. boulardii* cells to crystallization processes, depending on cooling rate, remained unchanged after immobilization. To clarify the reasons for lower viability of cells, immobilized on carriers as compared to free cells it is necessary to study the development of physical and chemical factors of injury during freezing of these objects. We believe that one of the possible mechanisms of injury is intracellular crystallization, which probability increases under the particular cooling rate with decreasing of a cell surface-to-volume ratio as well as and cell membrane permeability coefficient for water molecules [6]. When freezing enterosorbent complexes with cells, immobilized on their surface, the formation of contacts between adsorbent surfaces and immobilized cells corresponds to the reduction of cell surface, that is why the highest viability indices were observed under the slowest cooling rates among the studied ones.

### Conclusions

1. For the first time there was studied the viability of *S. boulardii* probiotic cells, immobilized on enterosorbents. The highest viability in different preservation media was provided by cooling with 1 deg/min rate. The augmentation of cooling rate up to 5–40 deg/min and immersion into liquid nitrogen resulted in a statistically significant reduction in CFU number, formed by the 'carrier-cells' complexes.

2. The viability of immobilized cells during cryopreservation is affected by physical and chemical properties of carrier material. Higher indices of viability were noted in the experiments with cells, immobilized on Sorbex enterosorbent.

3. In the case of cooling of immobilized cells with the rate from 5 to 40 degree/min and immersion into liquid nitrogen the composition of the studied preservation media had no significant effect on colony forming ability of 'carrier-cells' complexes.

4. The viability indices for non-adsorbed free cells were statistically and significantly higher than in 'carrier-cells' complexes after performing all the studied freezing regimens. The maximum viability of free cells was also provided by cooling with 1 degree/min rate. Using this cooling rate in all the studied preservation media did not change the viability of *S. boulardii* cells comparing to initial one.

*The authors acknowledge Dr. Yu.A. Petrenko for his valuable comments.*



## Литература

1. Бабинец О.М., Высеканцев И.П., Марценюк В.Ф. Биологические свойства нативных и криоконсервированных пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах // Иммунология та алергологія: Наука і практика. – 2010. – №1. – С. 126.
2. Бабинец О.М., Высеканцев И.П., Марценюк В.Ф. Терапевтическое действие иммобилизованных пробиотиков *Saccharomyces boulardii* и *Bifidobacterium bifidum* при экспериментальном химиотерапевтическом дисбиозе, сопровождающемся транслокацией кишечной микрофлоры // Иммунология та алергологія: Наука і практика. – 2011. – №1. – С. 61.
3. Бекер М.Е., Дамберг Б.Э., Рапопорт А.И. Анабиоз микроорганизмов. – Рига: Зинатне, 1981. – 253 с.
4. Высеканцев И. П., Бабинец О. М., Марценюк В. Ф., Шатилова Л. Е. Сохранность биологических свойств иммобилизованных пробиотиков после криоконсервирования // Материалы VII Международной научной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии». – Минск, 2010. – С. 102–103.
5. Высеканцев И.П., Бабинец О.М., Марценюк В.Ф., Шатилова Л.Е. Сравнительное изучение адсорбции стандартных маркеров и пробиотиков *Saccharomyces boulardii* и *Bifidobacterium bifidum* на энтеросорбентах // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Вип.1. – С. 58–62.
6. Гордиенко Е.А., Пушкар Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 143 с.
7. Луста К. А., Фихте Б. А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. – Пуццино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. – 186 с.
8. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». ОСТ 91500.11.0004–2003, Приказ МЗ РФ № 231 от 09.06.2003 г.
9. Пушкар Н.С., Белоус А.М., Иткин Ю.А. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах. – Киев: Наук. думка, 1977. – 242 с.
10. Ткаченко Е. И., Суворов А. Н. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. – СПб: ИнформМед., 2009. – 276 с.
11. Патент РФ 2118535, МПК А61К 35/74, С12Н 11/14. Комплексный бактериальный препарат / Ю.И. Бородин, В.А. Бурмистров, А.А. Гуськов и др.; №97104352/13; Заявл. 20.03.1997; опубл. 10.09.1998, Бюл. № 25.
12. Патент РФ 2164801, МПК А61К 35/74. Препарат-пробиотик в сухой иммобилизованной форме / А.В. Молокеев, Л.Г. Никулин, Р.М. Ильина и др.; Заявл. 06.12.1999; Опубл. 10.04.2001, Бюл. №10.
13. Biancone L., Palmieri G., Lombardi A. et al. Cytoskeletal proteins and resident flora // Dig. Liver Dis. – 2002. – Vol. 34, Suppl. 2. – P. S34–36.
14. Czerucka D., Dahan S., Mograbi B. et al. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells // Infection and immunity. – 2000. – Vol. 68, №10. – P. 5998–6004.
15. Day J.G., Glyn N.S. Cryopreservation and freeze-drying protocols / Ed. by J.G. Day, G. Stacey: Humana Press, 2007. – 347 p.
16. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // Cryobiology. – 2003. – Vol. 46, №3. – P. 205–229.
17. Mazur P., Leibo S.P., Chu E. H. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury // Exptl. Cell. Res. – 1972. – Vol. 71. – P. 345–355.
18. McFarland L.V. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of clostridium difficile disease // Am. J. Gastroenterol. – 2006. – Vol. 101, №4. – P. 812–822.
19. Saaverda J. Probiotics and infectious diarrhea // Am. J. Gastroenterol. – 2000. – Vol. 95, Suppl. S – P. S16–S18.

## References

1. Babinets O.M., Vysekantsev I.P., Martsenyuk V.F. Biological properties of native and cryopreserved probiotics, immobilized on enterosorbents // Immunology and Allergology: Science and Practice. – 2010. – N1. – P. 126.
2. Babinets O.M., Vysekantsev I.P., Martsenyuk V.F. Therapeutic effect of immobilized probiotics *Saccharomyces boulardii* and *Bifidobacterium bifidum* under experimental chemotherapeutic dysbiosis, accompanying by gut flora translocation // Immunologiya ta Alergologiya: Nauka i Praktyka. – 2011. – N1. – P. 61.
3. Beker M.E., Damberg B.E., Rapoport A.I. Anabiosis of microorganisms. – Riga: Zinatne, 1981. – 253 p.
4. Vysekantsev I.P., Babinets O.M., Martsenyuk V.F., Shatilova L.E. Preservation of biological properties in immobilized probiotics after cryopreservation // Proc. of VII International Scientific conference “Actual State and Perspectives of Development in Microbiology and Biotechnology”. – Minsk, 2010. – P. 102–103.
5. Vysekantsev I.P., Babinets O.M., Martsenyuk V.F., Shatilova L.E. Comparative study of adsorption of the standard markers and probiotics *Saccharomyces boulardii* and *Bifidobacterium bifidum* on enterosorbents // Visnyk Problem Biologii i Meditsyny. – 2011. – Issue 1. – P. 58–62.
6. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of low temperature preservation for cell suspensions. – Kiev: Naukova dumka, 1994. – 143 p.
7. Lusta K.A., Fikhte B.A. Methods for determination of microorganism viability. – Puschino, 1990. – 186 p.
8. Industry standard “Patients management protocol. Intestinal dysbacteriosis”. Industry standard 91500.11.0004–2003, decree of the Ministry of Health Care of Russia N231 of 09.06.2003.
9. Pushkar N.S., Belous A.M., Itkin Yu.A. Low temperature crystallization in biological systems. – Kiev: Naukova dumka, 1977. – 242 p.
10. Tkachenko E.I., Suvorov A.N. Intestinal dysbiosis. Manual on diagnosis and treatment. – St. Petersburg: InformMed., 2009. – 276 p.
11. Patent of Russian Federation 2118535, IPC A61K 35/74, C12N 11/14. Combined bacterial preparation / Yu.I. Borodin, V.A. Burmistrov, A.A. Guskov et al.; N 97104352/13; Appl. 03.20.1997; publ. 10.09.1998, Bull. N 25.
12. Patent of Russian Federation 2164801, IPC7 A61K 35/74. Preparation-probiotic in dry immobilized form / A.V. Molokeyev, L.G. Nikulin, P.M. Ilyina et al.; Appl. 06.12.1999; Publ. 10.04.2001, Bull. №10.
13. Biancone L., Palmieri G., Lombardi A. et al. Cytoskeletal proteins and resident flora // Dig. Liver Dis. – 2002. – Vol. 34, Suppl. 2. – P. S34–36.
14. Czerucka D., Dahan S., Mograbi B. et al. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells // Infection and immunity. – 2000. – Vol. 68, N10. – P. 5998–6004.
15. Day J.G., Glyn N.S. Cryopreservation and freeze-drying protocols / Ed. by J.G. Day, G. Stacey: Humana Press, 2007. – 347 p.
16. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // Cryobiology. – 2003. – Vol. 46, N3. – P. 205–229.
17. Mazur P., Leibo S.P., Chu E. H. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury // Exp. Cell. Res. – 1972. – Vol. 71. – P. 345–355.
18. McFarland L.V. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of clostridium difficile disease // Am. J. Gastroenterol. – 2006. – Vol. 101, N4. – P. 812–822.
19. Saaverda J. Probiotics and infectious diarrhea // Am. J. Gastroenterol. – 2000. – Vol. 95, Suppl. S – P. S16–S18.

Accepted 06.12.2011

Поступила 06.12.2011