

# Криоконсервирование дрожжеподобных грибов *Candida albicans* в условиях воздействия полиенового антимикотика “Нистатина” на цитоплазматическую мембрану

А.Ю. АРТУЯНЦ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Cryopreservation of *Candida albicans* Yeast-Like Fungi Under Effect of Polyene Antimycotics Nystatin on Cytoplasm Membrane

A.YU. ARTUYANTS

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

В связи с большим значением грибов рода *Candida* в инфекционной и иммунной патологии человека создаются коллекции как различных видов данных микроорганизмов, так и клинических изолятов. Наиболее эффективным методом долгосрочного хранения этих грибов является криоконсервирование. Дрожжеподобные грибы – удобная модель для изучения механизмов криоповреждения, криозащиты и репарации криоповреждения биологических объектов.

Ранее нами было показано, что на сохранность грибов рода *Candida* в процессе криоконсервирования влияют режимы охлаждения и состав среды консервирования.

Характерной особенностью строения цитоплазматической мембраны (ЦПМ) дрожжеподобных грибов является значительное (до 10%) содержание различных стиролов.

Цель работы – изучение влияния блокирования стироловых компонентов ЦПМ на криочувствительность дрожжеподобных грибов *C. albicans*.

В эксперименте использовали двухсуточную культуру клеток *C. albicans*, выращенную на сусло-агаре (8°B) при температуре 30°С. Исходная концентрация клеток составляла  $2 \times 10^7$  кл/мл. Опыты по замораживанию состояли из двух серий. В первой серии к клеткам, замороженным без предварительной обработки “Нистатином”, добавляли “Нистатин” или сусло-бульон, образцы инкубировали при 30°С в течение 1 ч. После этого отмывали с помощью серийных разведений и высевали. Во второй серии эксперимента клетки инкубировали перед замораживанием с “Нистатином”. После отогрева клетки также отмывали с помощью серийных разведений и высевали. Жизнеспособность определяли “чашечным” методом Коха по колониеобразованию.

Установлено, что штамм *C. albicans* устойчив к “Кетоконазолу”, “Флюконазолу”, “Клотримазолу” и чувствителен к “Амфотерицину В” и “Нистатину”.

Минимальная ингибирующая концентрация “Нистатина” составляла 250 Ед/мл. В экспериментах использовали концентрацию “Нистатина” 200 Ед/мл. В этой концентрации “Нистатин” не вызывал гибели клеток.

Установлено, что обратимое связывание стиролов ЦПМ грибов с дополнительным образованием пор как до замораживания, так и после отогрева замороженных образцов не приводили к дополнительной гибели клеток. Это свидетельствует о незначительном количестве условно-летальных повреждений ЦПМ, нарушение репарации которых может привести к дополнительной гибели клеток.

In connection with a significant specific place in infection and human immune pathology there have been established the collections of both different species and clinical isolates of *Candida* fungi. Cryopreservation is the most effective method of long-term storage of these fungi. Yeast-like fungi are suitable model to study the mechanisms of cryodamage, cryoprotection and reparation of cryodamage of biological objects.

Previously we have demonstrated that the integrity of *Candida* fungi during cryopreservation is affected by cooling regimens and composition of cryopreservation medium.

The feature of the cytoplasm membrane (CM) structure of yeast-like fungi is significant (up to 10%) content of different styrols.

Due to the above mentioned the research aim of this study was to investigate the effect of blocking the styrol components of MCP on cryosensitivity of *C. albicans* yeast-like fungi.

In the experiments there was used 48 hrs *C. albicans* cell culture, grown with wort agar (8°B) at 30°С. Initial concentration of cells was  $2 \times 10^7$  cells/ml. The experiments on freezing comprised two series. In the first one to the cells frozen with no preliminary treatment with Nystatin was added either Nystatin or wort broth, the samples were incubated at 30°С for 1 hr. Afterwards they were washed by means of serial dilutions and plated. In the second series of experiment the cells were incubated prior to freezing with Nystatin. After thawing the cells were also washed by means of serial dilutions and plated. Viability was examined by Koch's plate method on colony formation.

It has been established that *C. albicans* strain was resistant to Ketokonazol, Fluconazol, Clotrimazol and sensitive to Amphotericinum B and Nystatin.

Minimal inhibiting concentration of Nystatin was 250 U/ml. In the experiments there was used the concentration of Nystatin of 200 U/ml. Under this concentration Nystatin did not cause the cell death.

It has been established that reversible binding of styrols of fungi CM with additional formation of pores both prior to freezing and after thawing of frozen samples did not result in additional death of the cells. This confirms insignificant amount of relatively lethal impairments of CM, the disorder of reparation of those may lead to additional death of cells.