

Исследование криоповреждений дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* флуоресцентными методами

И.А. БУРЯК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Fluorescent Studies of *Saccharomyces cerevisiae* Cryodamage

I.A. BURYAK

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

Развитие техники флуоресцентного анализа и появление новых флуоресцентных зондов расширяют возможности применения флуоресцентных методов в биологии.

Цель данной работы – исследование возможностей применения флуоресцентного красителя K8-3010, синтезированного в ГНУ “Институт монокристаллов”, для выявления повреждений клеток после холодовых воздействий.

Объектом исследования являлись грибы *Saccharomyces cerevisiae*. Штамм получали в ГНИИ “Генетика” (Москва). Дрожжи для исследований выращивали на скошенном сусло-агаре в течение 48 ч при 30°C и смывали с питательной среды физиологическим раствором. Суспензии клеток замораживали в криопробирках фирмы Corning двумя способами: быстрое замораживание (погружение в жидкий азот) и медленное (помещение пробирок в морозильную камеру при температуре –20°C). Образцы отогревали на водяной бане при 30°C. После замораживания-отогревания в суспензию клеток дрожжей вводили краситель K8-3010 и исследовали на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur и на флуоресцентном микроскопе Olympus IX - 70. Оценивали жизнеспособность клеток после замораживания-отогревания чашечным методом Коха по количеству образовавшихся макроколоний, используя для контроля показатели жизнеспособности для незамороженных клеток. Аналогичные исследования проводили на клетках, обработанных различными дозами озона. Зонд K8-3010 окрашивает оболочки неповрежденных клеток в ярко-зеленый цвет и имеет ограниченную проницаемость внутрь них, о чем свидетельствует менее яркое свечение цитоплазмы. Нарушение проницаемости оболочки клеток для красителя проявляется в окрашивании цитоплазмы и внутриклеточных органелл в ярко-зеленый цвет. Было установлено, что по степени повреждения клеток замораживанием выявляются две субпопуляции с разной интенсивностью окрашивания клеток красителем K8-3010, причем данный метод позволяет выявить влияние способа замораживания на степень повреждения. Результаты исследования повреждений клеток флуоресцентными методами коррелируют с результатами оценки жизнеспособности клеток методом Коха.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования красителя K8-3010 в криобиологии для выявления повреждений клеток после криоконсервирования, однако разработка конкретных протоколов его использования для обнаружения повреждений клеток различных видов является предметом дальнейших исследований.

Development of fluorescent analysis techniques and appearance of new fluorescent probes have extended the possibilities for fluorescent method application in biology.

This research was aimed to investigate the possibilities for K8-3010 fluorescent dye application, synthesised at the Scientific and Technological Corporation “Institute for Single Crystals” in order to reveal cell damages after cold effects.

Saccharomyces cerevisiae fungi served as the research object. Strain was obtained at the State R&D Institute “Genetics” (Moscow). Yeast for research was grown at a slant wort agar-agar within 48 hours at 30°C and washed-out from nutrient medium with physiological solution. Cell suspensions were frozen in Corning cryovials using two ways: rapid freezing (immersion into liquid nitrogen) and a slow one (vial placing into freezing chamber at –20°C). Samples were thawed on water bath at 30°C. After freeze-thawing the K8-3010 dye was added into yeast cell suspension, studied with BD FACS Calibur flow cytometer and with Olympus IX-70 fluorescent microscope. Cell viability was estimated after freeze-thawing with dish Koch method by the number of formed macrocolonies using the viability indices for unfrozen cells as the control. The same research was carried-out in the cells, treated with different ozone doses. K8-3010 probe stains the membranes of undamaged cells in a bright green colour and has a limited permeability inside of them, that is testified by a less bright cytoplasm fluorescence. Disorder in cell membrane permeability for a dye is manifested in cytoplasm and intracellular organelle staining in bright green colour. There was established that according to the cell damage extent by freezing the two subpopulations with various intensity rates of K8-3010 cell staining were revealed, moreover this method enabled to reveal the freezing effect on a damage extent. Results of cell damage study using fluorescence methods correlate with those of cell viability estimation using Koch method.

The results obtained testify to the perceptiveness of K8-3010 dye use in cryobiology in order to reveal cell damages after cryopreservation, however the elaboration of detailed protocols for the probe usage to find-out damages for different cells is the subject of further research.