

ВЛИЯНИЕ ГЕЛИЯ НА КРИОКОНСЕРВАЦИЮ КЛЕТОК ЛИНИЙ HeLa И L929

© 2018 г. С.В. Уграйская, Н.В. Шишова, Е.Л. Гагаринский, Н.Э. Швирст,
С.А. Каурова, М.В. Гольгяев, Л.В. Заломова, А.Л. Ковтун*, Е.Е. Фесенко (мл.)

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

**Фонд перспективных исследований, 121059, Москва, Бережковская наб., 22/3*

E-mail: eugeny.ef@gmail.com

Поступила в редакцию 10.04.18 г.

Изучено влияния гелия на выживаемость клеточных тест-объектов (клетки линий HeLa и L929) в процессе криоконсервации. Суспензию клеток инкубировали в атмосфере гелия, азота или воздуха и замораживали в присутствии глицерина или без применения криопротектора. После оттаивания оценивали жизнеспособность клеток по окраске трипановым синим и развитию в культуре в течение 18 ч. Показано, что гелий способствует лучшей сохранности клеточной суспензии по сравнению с азотом и воздухом. Наиболее сильно положительное влияние гелия проявлялось при замораживании без криопротекторов (выживаемость клеток линии HeLa повышалась в полтора–два раза) и в меньшей степени в условиях сниженной концентрации глицерина (выживаемость клеток линии L929 при использовании 3% глицерина повышалась в 1,2–1,5 раза). Обработка клеточных суспензий гелием может быть использована для совершенствования методов криоконсервации, требующих снижения концентрации традиционных криопротекторов, которые, как правило, обладают высокой токсичностью и нежелательны для криоконсервации биологического материала медицинского назначения.

Ключевые слова: криоконсервация, клеточная культура, гелий, газы, криопротектор.

Криоконсервация – низкотемпературное замораживание биологического материала, которое широко применяется в различных отраслях медицины, сельского хозяйства, пищевой промышленности. Разработка современных методов криоконсервации, обеспечивающих высокую жизнеспособность биологического материала и особенно его функциональную полноценность, невозможна без понимания биологических и физико-химических процессов, сопутствующих охлаждению, замораживанию и последующему разогреву клеток и тканей. В процессе замораживания–оттаивания биологические структуры могут подвергаться механическому воздействию со стороны растущих кристаллов льда, осмотическому стрессу, связанному с вымораживанием воды из растворов или таянием кристаллов льда при размораживании объекта [1–3]. При понижении температуры в липидном бислое клеточных мембран происходят латеральное разделение липидов и фазовые перестройки, в результате чего резко возрастает проницаемость мембран, нарушается липид/белковое взаимодействие и теряются мембранные белки [4,5]. Нарушения мембранных структур и хроматина в процессе криоконсервации могут происходить в результате

ассоциированного с охлаждением окислительного стресса [6,7]. Воздействие холодом может инициировать апоптоз и приводить к гибели клеток даже при отсутствии летальных повреждений [7,8].

Несмотря на обширные исследования механизмов криоповреждений и способов уменьшения негативного влияния низких температур на биологический материал, в литературе крайне мало работ, посвященных влиянию газов на процессы замораживания–оттаивания. Между тем газы оказывают существенное влияние на физические процессы при охлаждении и замораживании растворов: инициируется рост кристаллов льда в водном растворе; растворенные газы вытесняются из образующихся кристаллов и прераспределяются в оставшемся растворе, концентрируясь на границе раздела жидкой и твердой фазы. В результате жидкость вдоль границы раздела фаз обогащается газом [9]. При дальнейшем охлаждении и увеличении массовой доли твердой фазы в системе жидкость становится перенасыщенной газом, который выделяется в виде микропузырьков вдоль границы раздела фаз. Микропузырьки газа впоследствии захватываются отвердевающей жидкостью, при этом их распределение в отвердев-

шем растворе оказывается крайне неравномерным [9]. Так как при медленном замораживании клеточной суспензии клетки так же вытесняются растущими кристаллами льда в остаточный незамерзший раствор [3], можно предположить, что появление микропузырьков происходит вблизи скоплений клеток. Микропузырьки нарушают структуру отвердевшего раствора и способствуют растрескиванию материала при дальнейшем охлаждении [10], что может приводить к повреждению части клеток. Кроме того, микропузырьки обладают низкой теплопроводностью и оказывают влияние на тепловые потоки во время замораживания или оттаивания [10], замедляя охлаждение и повышая вероятность образования термомеханических напряжений в растворе и биоматериале. Различное содержание газов в теплой и холодной воде считают одним из факторов, объясняющих эффект Мпембы, заключающийся в том, что в идентичных условиях охлаждения теплая вода замерзает быстрее холодной [11].

В отличие от большинства газов, молекулы которых вытесняются из растущих кристаллов льда, молекулы легких газов, таких как водород, гелий и неон, за счет малого размера легко встраиваются в пустоты, существующие в кристаллической решетке льда I_h , без нарушения его структуры [12]. За счет этого растворимость этих газов во льду не только не уступает растворимости в воде, но даже превосходит ее [13]. Следовательно, при замораживании растворов эти газы не будут вытесняться из образующихся кристаллов льда в окружающий раствор и образовывать микропузырьки. Нами было высказано предположение, что частичное замещение газов, растворенных в биологических образцах, на гелий может значительно уменьшить образование микропузырьков при замораживании и повысить выживаемость биологического материала. Кроме того, процесс обогащения клеточной суспензии гелием будет сопровождаться снижением концентрации молекулярного кислорода в растворе, что в свою очередь уменьшит образование свободных активных радикалов, играющих значительную роль в повреждении клеточных мембран и ДНК в процессе криоконсервации [14,15]. В работе исследовали влияние инкубации в атмосфере гелия на выживаемость клеток линий HeLa и L929 в процессе криоконсервации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве тест-объектов использовали культуры клеток карциномы шейки матки человека линии HeLa и фибробласты мышцы линии

L929, характеризующиеся повышенной устойчивостью к внешним воздействиям и пролиферативной активностью *in vitro* (Российская коллекция клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия).

Культивирование клеток проводили по стандартной методике [16]. Использовали среду DMEM в модификации Дюльбекко (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки телят («ПанЭко», Россия), 50 мкг/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина. Клетки выращивали в культуральных флаконах E75 (Eppendorf, Германия). Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе MCO-175 (Sanyo, Япония) при 37°C во влажной атмосфере в течение 48 ч, после чего их пассировали в расчете 30–50 тыс. кл/см². Ферментативное открепление клеток от культуральной чашки проводили с использованием 0,05% раствора трипсина в ЭДТА (Gibco, США). Перед криоконсервацией клетки, растущие в виде монослоя, переводили в суспензию. Для этого монослой три раза промывали 0,05% раствором трипсина в ЭДТА и выдерживали в течение 3 мин при 37°C, после чего раствор трипсин-ЭДТА сливали, клетки пипетировали несколько раз и переносили в среду DMEM с 10% эмбриональной сыворотки телят. Количество клеток в суспензии подсчитывали в камере Горяева. Для криоконсервации использовали суспензию из расчета 1 млн клеток на 1 мл криозащитной среды.

Эксперименты проводили в двух вариантах: (1) с добавлением криопротектора глицерина в среду DMEM с 10% эмбриональной сыворотки телят и (2) без криопротектора в той же среде. Конечная концентрация глицерина в криозащитной среде для клеток линии HeLa составляла 10%, для клеток линии L929 – 3%. Криоконсервацию проводили по специально разработанному протоколу с насыщением клеточной суспензии гелием, в качестве контроля использовали атмосферный воздух. По стандартному протоколу для криоконсервации клеточной суспензии в присутствии гелия использовали одноразовые шприцы объемом 2,5 мл. В шприцы набирали по 0,5 мл суспензии клеток, подготовленных к криоконсервации, затем поршнем набирали максимально возможный объем газа (2,5 мл) через силиконовую трубку, соединенную с газовой емкостью. После заполнения шприца газом соединительную трубку отсоединяли от шприца и кончик шприца запечатывали герметичным наконечником. Шприцы с суспензией клеток и исследуемым газом помещали на шейкер 358S (Epan, Польша) в горизонтальном положении и выдерживали 2 ч

при комнатной температуре (20°C) и мягком покачивании для насыщения суспензии газом. После насыщения суспензии газом шприцы переносили в морозильную камеру на -130°C (скорость охлаждения составляла $\approx 2^\circ/\text{мин}$ в рамках медленного классического способа замораживания) и оставляли на 24 ч при данной температуре. Интенсивный протокол отличался от стандартного тем, что клетки, предназначенные для криоконсервации, суспендировали в среде, предварительно насыщенной гелием. Насыщение среды (DMEM с 10% эмбриональной сыворотки телят, 5 мл) гелием проводили барботажем со скоростью ≈ 100 мл/мин в течение 30 мин при температуре 20°C. Клетки, подготовленные для криоконсервации, суспендировали в среде, преднасыщенной гелием, и далее дополнительно инкубировали в атмосфере гелия согласно стандартному протоколу.

Размораживание образцов проводили на водяной бане при 37°C в течение 2 мин (скорость размораживания $\approx 60^\circ/\text{мин}$). Определение жизнеспособности клеток после размораживания проводили двумя способами: 1) подсчитывали количество живых клеток в суспензии с помощью витального красителя трипанового синего; 2) выявляли функциональное состояние клеток методом их культивирования *in vitro*. Для окрашивания использовали 0,4%-й раствор трипанового синего, приготовленный на основе фосфатного солевого буфера (Sigma, США). Для окрашивания к 20 мкл клеточной суспензии добавляли 20 мкл раствора красителя и выдерживали 1 мин при комнатной температуре. Подсчет окрашенных (нежизнеспособных) и неокрашенных (живых) клеток проводили с помощью автоматического счетчика клеток Countess II FL (Life Technologies, США). Жизнеспособность клеток рассчитывали как соотношение неокрашенных живых клеток к общему их количеству в суспензии и выражали в процентах.

Для оценки адгезивной способности и способности клеток к росту 0,45 мл суспензии клеток высевали в лунки шестилуночного планшета (Costar, США), добавляли 2 мл среды DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят. Через 5 ч проводили полную замену среды. Клетки инкубировали в течение 18 ч при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂ в инкубаторе MCO-18AC (Sanyo, Япония). Через 18 ч культивирования проводили фотосъемку культуры клеток (не менее четырех полей на лунку) на микроскопе Observer Z1 (Zeiss, Германия).

Статистический анализ проводили с помощью программы SigmaPlot 12.5. Данные на диаграммах представлены в виде средних и

стандартной ошибки. Статистический анализ значимости различий между группами сравнения определяли методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия между данными считали значимыми при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние гелия на выживаемость клеток линии HeLa в процессе криоконсервации. В процессе экспериментов было показано, что клетки линии HeLa обладают высокой устойчивостью к воздействию холодом (выживаемость клеток на уровне $\approx 30\%$ по данным, полученным при окрашивании трипановым синим). Это позволило нам исследовать влияние гелия на выживаемость этой линии не только в присутствии проникающего криопротектора (10%-й глицерин), но и в условиях замораживания без применения криопротектора. Анализ исходной незамороженной культуры показывает по результатам окрашивания трипановым синим $98 \pm 2\%$ живых клеток, которые при культивировании в течение 18 ч формируют слой плотностью 630 ± 29 тыс. кл./см². Замораживание существенно снижало выживаемость клеток, их способность к адгезии и скорость роста. Для исследования влияния гелия суспензию клеток инкубировали в атмосфере гелия и затем замораживали. Замораживание проводили медленным способом со скоростью $\approx 2^\circ/\text{мин}$. В качестве контроля проводили замораживание в атмосфере азота и воздуха в тех же условиях. Поскольку азот является основным составляющим газом воздуха, сравнение атмосферы гелия, азота и воздуха позволило дифференцировать влияние непосредственно гелия и влияние пониженной концентрации кислорода на выживаемость клеток при замораживании. Результаты эксперимента приведены на рис. 1.

При замораживании клеток без криопротектора в присутствии гелия, по результатам окрашивания трипановым синим, выживало $53 \pm 6\%$ клеток линии HeLa (рис. 1а). Данный показатель более чем в полтора раза превышал количество клеток, выживших при замораживании в атмосфере воздуха (контроль $32 \pm 5\%$, $P \leq 0,05$) и в 1,3 раза – в атмосфере азота ($39 \pm 7\%$). При этом клетки сохраняли высокую способность к адгезии и делению в культуре *in vitro* (рис. 1б). После культивирования в течение 18 ч они формировали монослой с плотностью до 120 ± 20 тыс. кл./см², в то время как клетки, замороженные в атмосфере воздуха и азота, формировали слой плотностью 61 ± 10 ($P \leq 0,05$) и 93 ± 24 тыс. кл./см² соответственно.

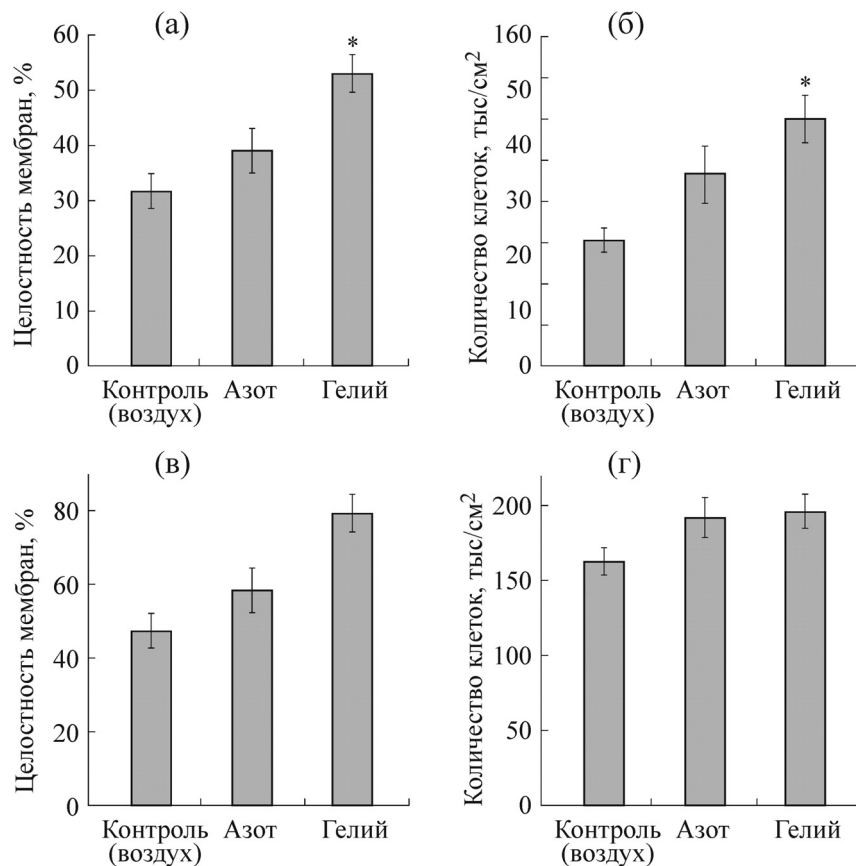


Рис. 1. Жизнеспособность клеток HeLa после криоконсервации без применения криопротектора (а, б) и в присутствии 10% глицерина (в, г) в атмосфере азота и гелия: (а) и (в) – количество жизнеспособных клеток сразу после размораживания, протестированное окрашиванием витальным красителем трипановым синим (0,4%); (б) и (г) – количество адгезивных клеток через 18 ч культивирования в среде ДМЕМ с 10%-м фосфатно-солевым буфером. Контроль – контрольные образцы, замороженные в атмосфере воздуха. Данные представлены в виде средних и стандартной ошибки; * – достоверность различий между группами сравнения при $P \leq 0,05$ ($n = 7$).

Из приведенных данных следует, что гелий существенно улучшал жизнеспособность и функциональное состояние клеток HeLa, подвергнутых криоконсервации, в то время как азот оказал умеренное положительное действие на сохранность клеток. Таким образом, понижение концентрации кислорода за счет инкубации в бескислородной атмосфере оказывает положительный эффект, однако в действии гелия выявляется дополнительная защитная компонента, повышающая выживаемость клеток. Мы полагаем, что результаты эксперимента подтверждают высказанное предположение о том, что гелий в силу повышенной растворимости во льду в меньшей степени нарушает структуру замороженного раствора, что способствует лучшей сохранности клеток.

Добавление в среду для замораживания 10 вес. % глицерина повышало выживаемость HeLa с 53 ± 6 до $79 \pm 4\%$. При этом влияние газовой атмосферы при замораживании в присутствии 10% глицерина было слабо выражено

и недостоверным (рис. 1в,г). После криоконсервации в атмосфере гелия ($79 \pm 4\%$) выживаемость клеток HeLa, согласно тесту с трипановым синим, была на 15% выше, чем в контроле ($68 \pm 7\%$) ($P \geq 0,1$) и практически не отличалось от выживаемости клеток, замороженных в атмосфере азота ($78 \pm 4\%$). Данные по плотности клеточного монослоя через 18 ч культивирования подтверждают данные, полученные по окрашиванию трипановым синим.

Известно, что при замораживании физиологического раствора с добавлением 10% глицерина со скоростью 1 градус в минуту кристаллизуется около 80% воды, в то время как остаточный раствор стеклется [17]. По-видимому, концентрация газов в остаточном растворе в присутствии 10% глицерина не превышает пределы растворимости газов, поэтому газовая атмосфера не оказывает такого влияния на структуру замерзшего раствора, как при замораживании без криопротектора. Некото-

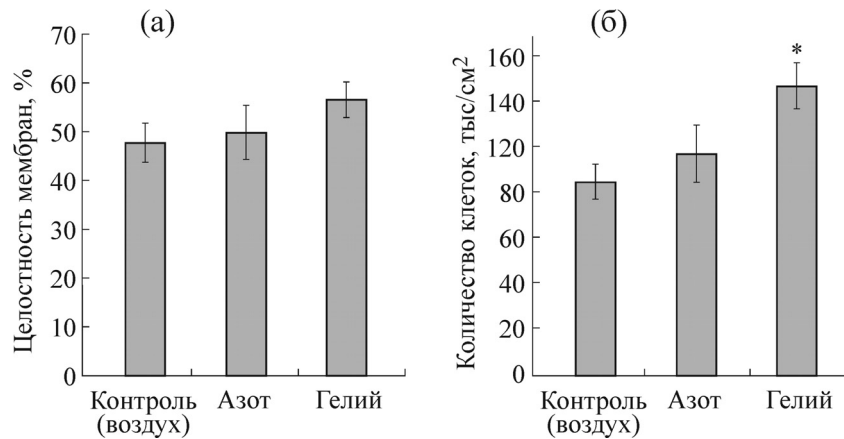


Рис. 2. Жизнеспособность клеток линии L929 после криоконсервации в атмосфере азота и гелия с добавлением 3% глицерина: (а) – количество живых клеток сразу после размораживания, протестированное окрашиванием витальным красителем трипановым синим (0,4%); (б) – количество адгезивных клеток через 18 ч культивирования в среде ДМЕМ с 10%-м фосфатно-солевым буфером. Контроль – контрольные образцы, замороженные в атмосфере воздуха. Данные представлены в виде средних и стандартной ошибки. * – Достоверность различий между группами сравнения при $P \leq 0,05$ ($n = 8$).

рую тенденцию к более высокой выживаемости при использовании атмосферы азота и гелия можно объяснить понижением концентрации кислорода в суспензии клеток перед замораживанием, что снижает окислительный стресс при криоконсервации.

Влияние гелия на выживаемость клеток линии L929 в процессе криоконсервации. Для того чтобы удостовериться, что данные, полученные при замораживании клеточной культуры HeLa не являются специфической реакцией данной культуры на присутствие гелия, а отражают общую биофизическую закономерность, дополнительно были проведены эксперименты с использованием другой клеточной культуры – фибробластов мыши линии L929. Данная культура отличается по своим физиологическим свойствам от клеток HeLa. Кроме того, известно, что эксперименты *in vitro*, проведенные на этой клеточной линии, имеют высокий коэффициент согласованности с исследованиями *in vivo* [18], следовательно, по результатам экспериментов на данном тест-объекте можно прогнозировать влияние гелия на результативность криоконсервации большинства клеток организма млекопитающих.

Поскольку в предыдущих экспериментах было выявлено, что влияние гелия на результаты криоконсервации более выражено при замораживании без криопротекторов, на первом этапе мы провели криоконсервацию фибробластов без криопротектора. Однако эксперименты показали, что фибробласты L929 более чувствительны к воздействию низких температур по сравнению с клетками линии HeLa и не вы-

держивает криоконсервацию до -130°C в таких условиях. После замораживания без криопротектора во всех экспериментальных группах наблюдали только единичные выжившие клетки (данные не показаны). Так как 10%-я концентрация глицерина нивелирует влияние гелия на результаты криоконсервации (см. выше), для дальнейшего исследования влияния гелия на выживаемость фибробластов L929 мы определили минимальную концентрацию глицерина, позволяющую получить жизнеспособную культуру. Она составила 3% глицерина. Криоконсервация фибробластов с 3%-м глицерином снижала количество жизнеспособных клеток по окрашиванию трипановым синим с $99 \pm 2\%$ (нативные клетки) до $48 \pm 7\%$ при замораживании без использования гелия или азота. Плотность сформированного за 18 ч монослоя снижалась с 380 ± 20 тыс. кл./см² (нативные клетки) до 97 ± 15 тыс. кл./см² (размороженные клетки). Данные по жизнеспособности фибробластов после криоконсервации в атмосфере гелия, воздуха и азота в присутствии 3% глицерина показаны на рис. 2.

Оценка жизнеспособности клеток L929 по окрашиванию трипановым синим сразу после размораживания не выявила достоверного положительного влияния гелия по сравнению с контролем (рис. 2а): в условиях насыщения гелием выжило $57 \pm 6\%$ клеток, в контроле этот показатель составил $48 \pm 7\%$. Однако развитие клеточной культуры, замороженной после инкубирования в атмосфере гелия (145 ± 20 тыс. кл./см²), было в полтора раза лучше по срав-

нению с контролем (97 ± 15 тыс. кл./см²) (рис. 26). Инкубирование в атмосфере азота (111 ± 25 тыс. кл./см²) не приводило к достоверному улучшению развития культуры по сравнению с контролем. Данные экспериментов по криоконсервации фибробластов L929 с 3% глицерином и клеток HeLa без криопротектора согласуются и свидетельствуют о способности гелия повышать выживаемость клеточных культур в процессе криоконсервации. В то же время следует обратить внимание, что атмосфера гелия в большей степени влияет на развитие культуры *in vitro*, чем на целостность клеточных мембран сразу после криоконсервации. Казалось бы, механическое повреждение клеток при растрескивании отвердевшего раствора должно приводить к грубым разрывам клеточной мембраны, а не к тонким нарушениям, оказывающим влияние на последующее развитие. Возможно, положительное влияние гелия связано не только с влиянием на структуру водных растворов при замораживании. Известно, что гелий, несмотря на низкую растворимость в липидах, способен оказывать влияние на организацию липидного бислоя мембран и взаимодействие липидов с примембранной водой [19], что так же может играть роль в повышении жизнеспособности клеток.

Криоконсервация клеток линии HeLa после обработки гелием по интенсивному протоколу. Предыдущие эксперименты показали благоприятный эффект замены растворенных в суспензии газов на гелий. Но после обработки клеточной суспензии по принятой нами методике (стандартный протокол) газ, присутствующий в растворе, удаляется не полностью, в растворе остаются остаточные концентрации азота и других газов, которые оказывают влияние на жизнеспособность клеток. Поэтому мы модифицировали протокол для максимально более полной замены газов на гелий. В соответствии с новым протоколом (интенсивный протокол) клетки суспендировали в среде криоконсервирования без криопротекторов (ДМЕМ с 10% эмбриональной сыворотки телят), предварительно насыщенной гелием, и затем дополнительно инкубировали в атмосфере гелия согласно стандартному протоколу. Предварительное насыщение среды проводили барботажем 5 мл среды гелием со скоростью ≈ 100 мл/мин в течение 30 мин при температуре 20°C. Жизнеспособность клеток HeLa после криоконсервации в атмосфере гелия с использованием разных

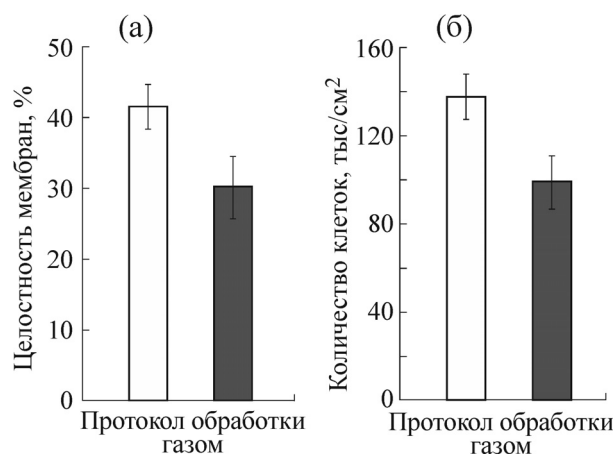


Рис. 3. Жизнеспособность клеток линии HeLa после криоконсервации без криопротектора в атмосфере гелия после насыщения газом по стандартному и интенсивному протоколам: (а) – количество живых клеток сразу после размораживания, протестированное с помощью витального красителя трипанового синего (0,4%); (б) – количество адгезивных клеток через 18 ч культивирования в среде ДМЕМ с 10%-м фосфатно-солевым буфером. Светлые столбики – стандартный протокол (инкубация в атмосфере гелия в течение 2 ч); темные столбики – интенсивный протокол (предварительное насыщение среды гелием с последующим инкубированием клеточной суспензии в атмосфере гелия по стандартному протоколу). Данные представлены в виде средних и стандартной ошибки ($n = 8$).

протоколов насыщения газом представлена на рис. 3.

Использование интенсивного протокола, обеспечивающего более полное удаление растворенных газов и замещение их на гелий, не привело к улучшению результатов криоконсервации по сравнению со стандартным протоколом (рис. 3а,б). Напротив, наблюдалась явная тенденция к снижению жизнеспособности клеток линии HeLa при использовании интенсивного протокола насыщения ($31 \pm 7\%$) клеточной суспензии гелием по сравнению со стандартным протоколом ($59 \pm 10\%$). После культивирования в течение 18 ч при использовании стандартного протокола плотность клеточной культуры составляла 138 ± 18 тыс. кл./см², в то время как клетки, замороженные с применением интенсивного протокола, формировали монослой с плотностью 99 ± 21 тыс. кл./см².

По-видимому, при интенсивном протоколе насыщения клеточной суспензии газами происходит слишком сильное снижение концентрации физиологически активных газов – кислорода и углекислого газа, что приводит к угнетению клеток и понижению их выживаемости при криоконсервации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты показали, что гелий способствует сохранности клеточной суспензии при криоконсервации классическим медленным способом в отсутствие или при низкой концентрации криопротектора. В то же время эффективность воздействия гелия зависит от способа замещения растворенных газов на гелий и, по всей видимости, от остаточных концентраций физиологических газов в растворе. Очевидно, дальнейшие работы в данном направлении должны быть связаны с поиском оптимального баланса различных газов в процессе криоконсервации.

Гелий может быть использован для разработки новых и совершенствования существующих методов криоконсервации без применения традиционных проникающих криопротекторов, которые, как правило, обладают высокой токсичностью и нежелательны для криоконсервации биологического материала медицинского назначения [20–22].

Работа поддержана Фондом перспективных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Mazur and K.W. Cole, *Cryobiology* **26**, 1 (1989).
2. M. Toner, E. G. Cravalho, and M. Karel, *Appl. Phys. J.* **67**, 1582 (1990).
3. G. J. Morris, E. Acton, B. J. Murray, and F. Fonseca, *Cryobiology* **64**, 71 (2012).
4. P. J. Quinn, *Cryobiology* **22** (2), 128 (1985).
5. E. Z. Drobniš, L. M. Crowe, T. Berger, et al., *Exp. Zool. J.* **265**, 432 (1993).
6. Е. П. Четверикова, *Биофизика* **57** (2), 368 (2012).
7. M. A. Savitskaya and G. E. Onishchenko, *Biochemistry (Moscow)* **81** (5), 445 (2016).
8. A. Bissoyi and K. Pramanik, *Biopreserv. Biobank J.* **12** (4), 246 (2014).
9. S. A. Bari and J. Hallett, *Glaciol. J.* **13**, 489 (1974).
10. G. Kletetschka and J. Hrubá, in *Lessons from Tardigrades* (Biores. Open Access, 2015), pp. 209–217.
11. M. Jeng, *Phys. J.* **74**, 514 (2006).
12. А. Ю. Намиот и Л. Е. Городецкая, *Докл. АН СССР*, № 3, 604 (1970).
13. В. И. Косяков и В. А. Шестаков, *Физ. химия* **76** (5), 815 (2002).
14. F. Amidi, A. Pazhohan, M. Sh. Nashtaei, et al., *Cell Tissue Bank.* **17** (4), 745 (2016).
15. Е. П. Четверикова, *Биофизика* **57** (2), 368 (2012).
16. R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells*, 5th ed. (J. Wiley & Sons., 2005).
17. G. J. Morris, M. Goodrich, E. Acton, and F. Fonseca, *Cryobiology* **52** (3), 323 (2006).
18. *ISO 10993-5:1999, Biological evaluation of medical devices. – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods* (1999).
19. Y. Moskovitz and H. Yang, *Soft Matter J.* **11** (11), 2125 (2015).
20. K. Matsumura, J. Y. Bae, and S. H. Hyon, *Cell Transplant. J.* **19** (6), 691 (2010).
21. J. M. Seo, M. Y. Sohn, J. S. Suh, A. Atala, et al., *Cryobiology* **62** (3), 167 (2011).
22. J. D. Svalgaard, E. K. Haastrup, K. Reckzeh, et al., *Transfusion* **56** (5), 1088 (2016).

Effect of Helium on Cryopreservation of HeLa and L929 Cells

S.V. Ugraitskaya*, N.V. Shishova*, E.L. Gagarinskiy*, N.E. Shvirst*, S.A. Kaurova*,
M.V. Goltyaev*, L.V. Zalomova*, A.L. Kovtun**, and E.E. Fesenko (Jr.)*

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Advanced Research Fund, Berejkovskaya nab. 22/3., Moscow, 121059 Russia*

The aim of this work was to study the effect of helium gas on the survival of HeLa and L929 cell lines in the process of cryopreservation. The cell suspensions were incubated in an atmosphere of helium, nitrogen or air and frozen in the presence of glycerol or without the cryoprotectant. After thawing, the viability of cells was evaluated by trypan blue exclusion test and culture development within 18 hours. It is shown that helium contributes to better preservation of cell suspension compared to nitrogen and air. The greatest positive effect of helium was observed during freezing without using cryoprotectants (survival of HeLa cells increased by 1.5–2.0 times), and, to a lesser extent, in the presence of a low glycerol content (survival of L929 cells increased by 1.2–1.5 times with 3% glycerol). The use of helium in cell suspensions may improve cryopreservation methods since it is necessary to reduce the concentration of traditional cryoprotectants, which are generally highly toxic and undesirable for cryopreservation of biological material used for medical applications.

Keywords: cryopreservation, cell culture, helium, gases, cryoprotectant