

УДК 557.18.04:34.17.23

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОНСЕРВАЦИИ В ЖИДКОМ АЗОТЕ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА КРИОЗАЩИТНОЙ СРЕДЫ

© 2020 г. Л.В. Заломова*, Д.А. Решетников*, С.В. Уграицкая*, Л.М. Межевикина*, А.В. Загайнова**, В.В. Макаров**, С.М. Юдин**, Е.Е. Фесенко (мл.)*

*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

**Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью МЗ РФ, 119435, Москва, ул. Погодинская, 10/1

E-mail: zalomova.91@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2020 г.

После доработки 23.07.2020 г.

Принята к публикации 24.07.2020 г.

Проведен сравнительный анализ выживаемости микробиоты кишечника человека после низкотемпературной консервации под защитой проникающих (диметилсульфоксида и глицерина), непроникающих (желатин) и газовых (гелий) протекторов. Выявлена повышенная устойчивость кишечных бактерий к действию низких температур. Значительная часть бактерий ($50.0 \pm 3.0\%$) сохраняет жизнеспособность после замораживания в жидком азоте без криопротектора(ов). Наибольшая сохранность достигается под защитой 5% диметилсульфоксида ($86.0 \pm 4.0\%$), 5% глицерина ($82.0 \pm 5.2\%$) или 10% желатина ($75.0 \pm 5.0\%$). Сочетание проникающих в клетку (диметилсульфоксид, глицерин) и непроникающего (желатин) протекторов не приводит к синергическому эффекту. Применение атмосферного гелия для криозащиты гетерогенной микробиоты кишечника человека не повышает ее сохранность даже в сочетании с такими мощными протекторами, как диметилсульфоксид и глицерин, что указывает на необходимость оптимизации криозащитных сред, в частности, для строгих анаэробов.

Ключевые слова: микробиота кишечника, криоконсервация, криопротекторы, жизнеспособность микробных клеток, флуоресцентный анализ.

DOI: 10.31857/S0006302920050117

Кишечная микробиота как сложное симбиотическое сообщество имеет важное значение для здоровья, продолжительности и качества жизни человека. Многие болезни тесно связаны с изменением баланса микробиоты кишечника [1, 2]. Современный образ жизни включает развитие урбанизации, стрессы, изменение качества продуктов питания, прием антибиотиков и многое другое, что оказывает негативное влияние на бактериальные сообщества, заставляя их изменять свою численность, состав, биохимические свойства в организме человека [3, 4]. В настоящее время встает вопрос о необходимости сохранения эволюционно сложившихся представителей кишечной микрофлоры для восстановления состава и функций микробиоты путем ауто- либо аллопересадок [5, 6].

Сокращение: ДМСО – диметилсульфоксид.

В этой связи особую актуальность приобретает возможность сохранения микробиоты кишечника человека на длительное время (годы, десятилетия), что достижимо только при температуре жидкого азота (-196°C). Подробные сведения о потенциальном применении микробиоты кишечника в медицине и биотехнологии, а также анализ используемых методов консервации микробиоты были представлены в нашей обзорной работе [7]. На сегодняшний день проблема длительного хранения сложных микробных сообществ, населяющих желудочно-кишечный тракт человека, еще не решена.

Исследования проводятся в основном на микробиоте кишечника человека, замороженной до температуры -20°C и/или -80°C [8–13]. Срок хранения биоматериала при таких температурах ограничен несколькими месяцами, в течение которых осуществляется мониторинг генотипической и фенотипической изменчивости микроор-

ганизмов. Очевидно, что для более пролонгированного хранения кишечной микрофлоры требуется температура жидкого азота [5, 13, 14]. Исследований по низкотемпературной консервации сложных бактериальных сообществ не так много. Тем не менее есть сообщение о сохранности анаэробных и аэробных представителей микрофлоры кишечника человека после криоконсервации в жидком азоте [15]. Для защиты микробных клеток были использованы такие природные вещества, как желатин, муцин, леван или агароза. Для индивидуальных штаммов бактерий применяют в основном проникающие (диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, этиленгликоль и др.) и/или не проникающие (сахароза, желатин, трегалоза, инулин, полиэтиленгликоль и др.) протекторы [12, 13, 16, 17].

Наибольшее распространение получили протоколы консервации для большинства бактерий с использованием 10–15% ДМСО или глицерина [18, 19]. Непроницающие высокомолекулярные полимеры природного и синтетического происхождения (сахара, полиэлектролиты, мукополисахариды) считаются менее эффективными и реже используются для криозащиты микроорганизмов. Однако недавно в исследовании, проведенном с целью разработки метода сохранения кишечной микробиоты, было установлено, что наибольшая выживаемость бактериальных клеток достигается при совместном использовании полиэтиленгликоля и поливинилового спирта [20]. Важными факторами помимо подбора криопротекторов, которые необходимо учитывать при разработке протоколов криоконсервации, являются скорости замораживания и оттаивания, состав базовых растворов, используемых в криозащитных средах, индивидуальные морфологические и физиологические свойства самих клеток [17, 21, 22].

Целью данного исследования была оценка эффективности криоконсервации микробиоты кишечника человека в жидком азоте под защитой универсальных проникающих протекторов ДМСО и глицерина, непроницающего протектора желатина, а также газовой атмосферы гелия. Исследуемые протекторы использовали в разных концентрациях и сочетаниях, полагая, что симбиотические бактерии желудочно-кишечного тракта могут существенно различаться по чувствительности/устойчивости к действию низких температур и молекулярным механизмам криопротекции. Выбор гелия в качестве защитного агента для микробиоты человека был обусловлен тем, что этот газ, во-первых, не оказывает цитотоксических эффектов [23], что актуально для любого биоматериала медицинского назначения. Во-вторых, потенциальное преимущество применения гелия заключается в снижении концентрации (и, следовательно, токсичности) класси-

ческих протекторов в составе криозащитной среды [23].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – микробиота кишечника человека в виде бактериальной суспензии. В экспериментах использованы образцы микробиоты (просветная микробиота) от взрослых доноров.

Выделение бактериальных клеток. Клеточную суспензию готовили из расчета 0.1 г фекальной массы в 0.9 мл стерильного солевого изотонического раствора 0.9% NaCl (1 мл), тщательно перемешивали до гомогенной консистенции. Для отделения бактерий от посторонних примесей использовали двукратное центрифугирование: сначала в 0.9% NaCl при 1200 об/мин в течение 5 мин, затем в 0.9% NaCl при 10000 об/мин в течение 10 мин; далее подсчитывали общее количество клеток в суспензии для каждого образца микробиоты.

Определение количества бактериальных клеток в суспензии. Подсчет клеток проводили по методу Виноградского–Брида для определения численности микроорганизмов в естественных микробиоценозах [24]. Общее количество клеток подсчитывали в 1 мл бактериальной суспензии под микроскопом с иммерсионным объективом (Axioscop 40, Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива 40х.

В экспериментах использовали клеточные суспензии в концентрации $(2.0–2.5) \cdot 10^8$ клеток в 1 мл среды. Образцы индивидуальной микробиоты человека различались между собой по общему содержанию клеток в пределах от 0 до $2 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл.

Криоконсервация микробиоты в жидком азоте. Бактериальные суспензии переносили в криопробирки в объеме 1 мл среды с добавлением криопротектора(ов), после чего образцы замораживали путем прямого погружения криопробирок в жидкий азот. Охлаждение суспензии в таких условиях происходит со средней скоростью $88 \pm 1.5^\circ\text{C}/\text{мин}$. Время между добавлением криопротекторов в пробирки и их погружением в жидкий азот составляло примерно 5–10 мин. Длительность хранения образцов в жидком азоте продолжалась от двух до семи суток. По истечении этого времени образцы размораживали на водяной бане 37°C . После размораживания клетки бактерий осаждали путем центрифугирования при 10000 об/мин в течение 10 мин, затем ресуспендировали в 0.9% NaCl для определения их жизнеспособности.

Криопротекторы. Для криопротекции использовали 5% и 10% растворы ДМСО, глицерина (Sigma, США) и желатина (PanReas AppliChem,

Китай), как по отдельности, так и в различных сочетаниях. Криозащитные среды готовили на 0.9% NaCl. Этот же раствор применяли для приготовления бактериальных суспензий и для их замораживания (отрицательный контроль без использования криопротекторов). Для изучения влияния газовой атмосферы на выживаемость микробиоты кишечника в процессе замораживания-оттаивания использовали гелий. Бактериальные суспензии, содержащие классические протекторы, а также контрольные образцы выдерживали в атмосфере гелия в специальных пластиковых шприцах на шейкере при температуре 20°C, как это описано в нашей работе [23]. В первой серии экспериментов образцы микробиоты насыщали в атмосфере воздуха и гелия в течение 1 ч. Во второй серии экспериментов продолжительность насыщения в газах при постоянном покачивании составила 3 ч.

Исследование токсических эффектов криопротекторов. Исследование цитотоксичности защитных агентов (ДМСО и глицерин) проводили при помощи эквilibрации бактериальных суспензий с 5% и 10% ДМСО и глицерина без замораживания в жидком азоте. Экспозиция образцов длилась от 30 до 60 мин. После этого определяли количество живых клеток с помощью флуоресцентного теста.

Оценка жизнеспособности микробиоты. Сравнительный анализ жизнеспособности бактерий до и после криоконсервации проводили флуоресцентным методом с использованием LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit 7007 (Molecular Probe, США), обеспечивающим высокий уровень корреляции результатов с данными микробиологического культивирования [15, 25, 26]. Оценку проводили по соотношению живых и мертвых клеток по интенсивности флуоресценции красителей SITO9 и пропидиум йодида, дающих зеленый и красный спектры при длине волны 480–500 и 490–635 нм соответственно. Бактериальные суспензии перед анализом центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 мин для удаления белков и нуклеиновых кислот, которые могут связывать флуоресцентные красители SYTO9 и пропидиум йодид и влиять на результаты тестирования. После центрифугирования супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в 1 мл 0.9% NaCl. Перед тестированием бактериальные клетки инкубировали с флуоресцентными красителями при комнатной температуре 20°C в течение 15 мин, затем анализировали с помощью микропланшетного фотометра FilterMax F5 (Molecular Devices, США).

Количественное определение живых и мертвых бактерий по интенсивности флуоресценции. Перед проведением флуоресцентного анализа снимали контрольные показатели интенсивности флюо-

ресценции при разных разведениях бактериальных суспензий по соотношению живых и мертвых бактерий: 0:100, 10:90, 50:50, 90:10 и 100:0. Для получения суспензии мертвых клеток использовали 96% этиловый спирт (30–40 мин экспозиции при комнатной температуре). Все варианты разведений раскапывали по 100 мкл на 96-луночный планшет, затем в каждую заполненную лунку добавляли по 100 мкл флуоресцентных красителей LIVE/DEAD BacLight и через 15 мин измеряли интенсивность флуоресценции на фотометре FilterMax F5 для построения калибровочной кривой с целью определения процента живых бактерий по следующей формуле:

$$\text{Ratio}_{G/R} = \frac{F_{\text{cell, em}_1}}{F_{\text{cell, em}_2}}. \quad (1)$$

Это соотношение отражает зависимость интенсивности флуоресцентного излучения от содержания активного флуоресцентного красителя в бактериальных клетках и позволяет определить процент жизнеспособных бактерий до и после криоконсервации.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли при помощи программы SigmaPlot 14.0, вычисляя общее значение флуоресценции клеток, среднее значение и стандартную ошибку. Достоверность различий между разными группами сравнения проводили с применением непараметрического критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сохранность микробных сообществ при низкотемпературной консервации под защитой классических криопротекторов. Исследование цитотоксических эффектов диметилсульфоксида и глицерина на бактериальные клетки. В ходе проведения экспериментов было показано (рис. 1), что $50.0 \pm 3.0\%$ бактерий, составляющих микробиоту кишечника человека, сохраняют жизнеспособность при быстром замораживании в растворе 0.9% NaCl без добавления каких-либо криопротекторов при сроках хранения образцов до семи суток.

Сравнительный анализ результатов флуоресцентного тестирования на жизнеспособность образцов микробиоты, замороженных в растворах проникающих (ДМСО и глицерин) и непроникающих (желатин) криопротекторов показал, что максимальный процент жизнеспособных клеток кишечной микрофлоры достигается в случае использования 5% и 10% растворов ДМСО, 5% раствора глицерина или 10% раствора желатина (рис. 1). Данные протекторы обеспечивали сохранность бактериальных клеток после замораживания и трехсуточного хранения в жидком азоте на уровне 86.0 ± 4.0 , $76.0 \pm 4.0\%$, 82.0 ± 5.2 и

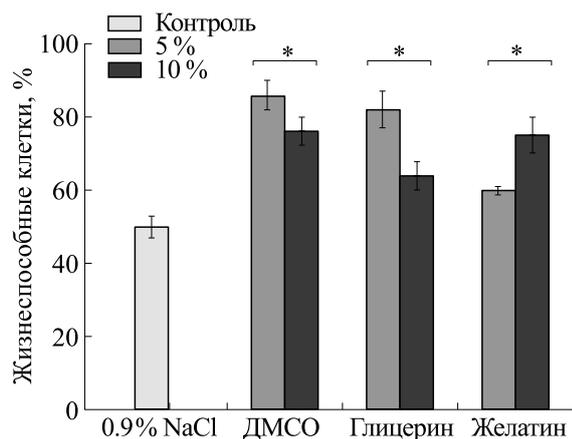


Рис. 1. Жизнеспособность микробиоты кишечника человека после криоконсервации в жидком азоте (температура -196°C , срок хранения 72 ч) в 0.9% NaCl (отрицательный контроль), 5% и 10% криозащитных растворах ДМСО, глицерина и желатина ($n = 25$). * – Достоверность различий жизнеспособности ($P < 0.05$) микробиоты кишечника при использовании криозащитных растворов в различных концентрациях согласно непараметрическому критерию оценки достоверности результатов Манна–Уитни.

$75.0 \pm 5.0\%$ соответственно. При этом исходный уровень сохранности бактериальных клеток в образцах кишечной микробиоты до криоконсервации составлял 82–90% жизнеспособных бактерий.

Исследование уровня выживаемости клеток в зависимости от использования 5%-х или 10%-х растворов проникающих и непроникающих криопротекторов показал различную картину. Так, увеличение концентрации желатина с 5 до 10% повышало процент жизнеспособных клеток с 60.0 ± 0.8 до $75.0 \pm 5.0\%$. В отличие от желатина, ДМСО и глицерин в более низкой концентрации, напротив, оказывали более выраженный криозащитный эффект (рис. 1). Повышение концентрации этих криопротекторов с 5% до 10% достоверно снижало процент жизнеспособных клеток после размораживания с 86.0 ± 4.0 до $76.0 \pm 4.0\%$ и с 82.0 ± 5.0 до $64.0 \pm 4.0\%$ для ДМСО и глицерина соответственно.

Данные различия можно объяснить разным механизмом действия рассматриваемых криозащитных агентов. Желатин относится к числу слабых по своим свойствам непроникающих криопротекторов [11]. Повышение его концентрации в среде замораживания до 10% положительно влияет на общую сохранность микробных клеток. Более низкие показатели жизнеспособности микробиоты в 10%-х растворах ДМСО и глицерина по сравнению с 5%-ми растворами, как мы полагаем, связаны с токсичностью этих проникаю-

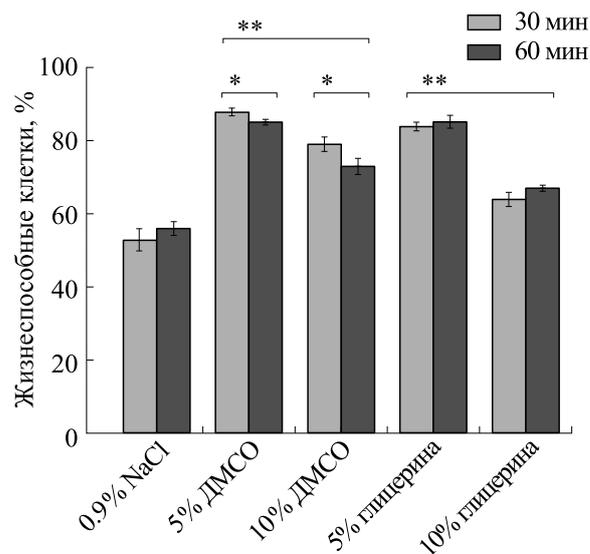


Рис. 2. Жизнеспособность микробиоты кишечника человека после эквilibрации в 5% и 10% растворах ДМСО, глицерина в течение 30 и 60 мин ($n = 20$). * – Достоверность различий жизнеспособности кишечных бактерий ($P \leq 0.05$) по времени экспозиции в ДМСО согласно критерию Манна–Уитни; ** – достоверность различий жизнеспособности кишечных бактерий ($P \leq 0.05$) после эквilibрации при сравнении разных концентраций растворов ДМСО и глицерина согласно критерию Манна–Уитни.

щих протекторов для некоторых кишечных микроорганизмов.

Исследование зависимости цитотоксического эффекта от концентрации криопротекторов и времени эквilibрации приведены на рис. 2. Повышение концентрации криопротекторов с 5% до 10% в условиях эквilibрации с бактериями при температуре 20°C достоверно снижало процент жизнеспособных бактериальных клеток с $88.0 \pm 1.0\%$ и $84.0 \pm 1.0\%$ до $79.0 \pm 2.0\%$ и $64.0 \pm 2.0\%$ для ДМСО и глицерина соответственно. Кроме того, увеличение времени экспозиции с 30 до 60 мин также снижало выживаемость бактериальных клеток как для 5%-го, так и для 10%-го ДМСО. Однако при использовании глицерина увеличение времени экспозиции при комнатной температуре не приводило к снижению процента живых клеток: $84.0 \pm 1.0\%$ и $85.0 \pm 2.0\%$ для 5%-го глицерина и 64.0 ± 2.0 и $67.0 \pm 1.0\%$ для 10%-го глицерина. Как 30-, так и 60-минутная экспозиция в 10%-м растворе глицерина при комнатной температуре снижали долю живых микробных клеток до 60%. Сравнение ДМСО и глицерина продемонстрировало большую токсичность последнего при увеличении концентрации до 10%.

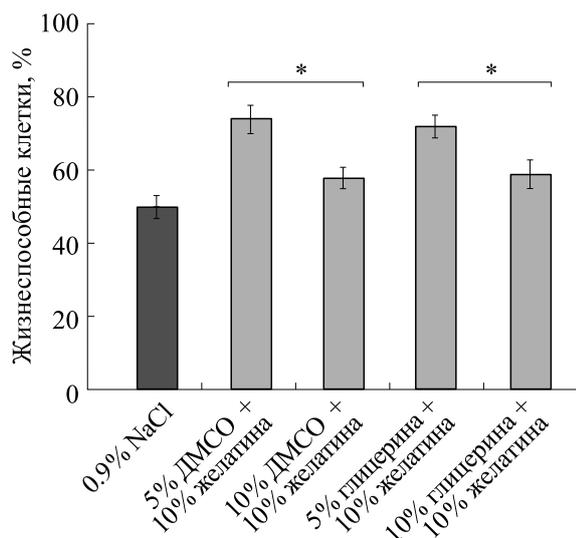


Рис. 3. Жизнеспособность микробиоты кишечника человека после криоконсервации в жидком азоте (температура -196°C , срок хранения 72 ч) в 0.9% NaCl (отрицательный контроль), 5% и 10% растворах ДМСО, глицерина в комбинации с 10%-м желатином ($n = 15$). * – Достоверное повышение жизнеспособности микробных сообществ ($P \leq 0.05$) после криоконсервации с 5% ДМСО и 10% желатина, а также с 5% глицерина и 10% желатина по сравнению с замораживанием в 10% ДМСО и 10% желатина, а также в 10%-м глицерине и 10%-м желатине.

Сохранность микробных сообществ при низкотемпературной консервации под защитой комбинации проникающих и непроникающих криопротекторов. Для надежного сохранения микробного сообщества кишечника человека, характеризующегося широким спектром разных типов бактерий в своем составе, перспективным представляется использование криозащитных смесей, состоящих из нескольких защитных агентов разного механизма действия. В поисках синергического эффекта мы оценили эффективность криоконсервации микробиоты кишечника человека при совместном использовании ДМСО с желатином и глицерина с желатином, рассчитывая достигнуть значимого подавления как внеклеточной, так и внутриклеточной кристаллизации. Результаты этих исследований представлены на рис. 3.

Как следует из рис. 3, показатели сохранности бактериальных клеток при использовании комбинации 5% ДМСО с 10%-м желатином, а также 5% глицерина с 10%-м желатином составили 74.0 ± 4.0 и $72.0 \pm 3.0\%$ соответственно и тем самым не превысили уровень жизнеспособных клеток, достигнутый при использовании этих же криопротекторов в монорежиме: $86.0 \pm 4.0\%$ в 5% ДМСО, $82.0 \pm 5.2\%$ в 5% глицерине, 75.0 ± 5.0 – в 10% желатине. При этом 10% ДМСО и 10% глицерин в сочетании с 10% желатином продемонстри-

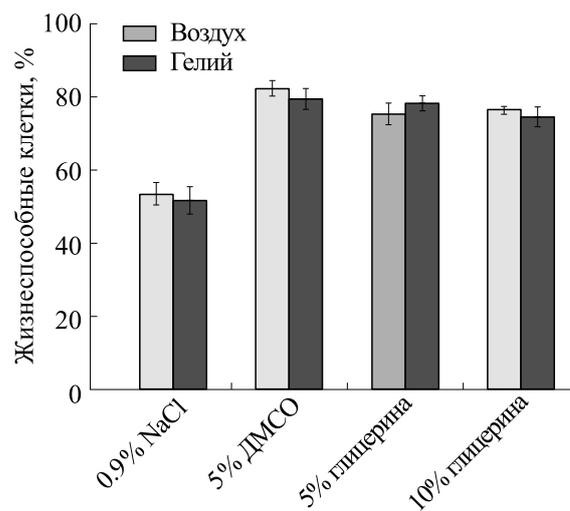


Рис. 4. Жизнеспособность микробиоты кишечника человека после криоконсервации в жидком азоте (температура -196°C , срок хранения 72 ч) в 0.9% NaCl (отрицательный контроль), 5% растворах ДМСО и глицерина и 10% растворе желатина, насыщенной в атмосфере воздуха и гелия ($n = 13$).

ровали более слабые криозащитные эффекты – $58.0 \pm 3.0\%$ и $59.0 \pm 4.0\%$ живых клеток соответственно, соизмеримые с показателями жизнеспособности бактерий после криоконсервации в 0.9% растворе NaCl без протекторов. Таким образом, ожидаемый синергический эффект не наблюдался.

Сохранность микробных сообществ при низкотемпературной консервации под защитой гелия. Проведенные эксперименты по исследованию влияния газовой атмосферы гелия на сохранность бактериальных клеток микробиоты кишечника человека в процессе криоконсервации выявили отсутствие положительного криозащитного эффекта инертного газа. Процесс криоконсервации в данных экспериментах предусматривал эквilibрацию в атмосфере гелия или воздуха в течение 1 ч перед погружением в жидкий азот. Ввиду того, что половина бактерий микрофлоры кишечника остается жизнеспособной после криоконсервации в 0.9% NaCl, контролем в данном эксперименте была атмосфера воздуха, несмотря на преобладание анаэробных представителей в кишечнике человека. На рис. 4 приведены усредненные данные количества живых клеток после размораживания: $54.0 \pm 3.0\%$ и $52.0 \pm 4.0\%$ для отрицательного контроля, 83.0 ± 2.0 и $80.0 \pm 3\%$ – для ДМСО, $76.0 \pm 3.0\%$ и $79.0 \pm 2\%$ – для глицерина, $77.0 \pm 1.0\%$ и $75.0 \pm 3.0\%$ – для желатина в среде воздуха и гелия соответственно. Увеличение времени эквilibрации в газовой среде с 1 до 3 ч также не выявило криозащитного эффекта гелия (данные не приведены).

В процессе работы основной целью ставился поиск криозащитных составов, обеспечивающих оптимальные условия для замораживания, подходящие для большинства представителей микрофлоры кишечника человека.

Весьма интересные результаты были получены при исследовании выживаемости клеток с помощью флуоресцентного анализа LIVE/DEAD BacLight. Они показывают, что в процессе криоконсервации микробиоты человека половина общего числа симбиотических микроорганизмов выживает без использования криопротекторов (рис. 1). Скорее всего, такая криоустойчивость бактерий связана с различиями в строении клеток по сравнению с эукариотами, а именно наличием особой клеточной стенки у бактерий. Известно, что в состав микробиоты кишечника входят как грамположительные, так и грамотрицательные виды микроорганизмов. Грамотрицательные бактерии с непроницаемой клеточной стенкой имеют меньшую устойчивость к низкотемпературной криоконсервации и лиофилизации, чем грамположительные микроорганизмы [27]. В результате этого они погибают из-за повреждения плазматических мембран. По отношению к кислороду примерно 95% приходится на анаэробную составляющую микрофлоры кишечника человека. Следовательно, эта группа бактерий является особо уязвимой при криоконсервации микробиоты. Это служит важным доводом для обязательного использования в низкотемпературном замораживании микробиоты криопротекторов с целью сохранения количественного и видового разнообразия кишечной микрофлоры при температуре жидкого азота в течение длительного периода времени.

К настоящему времени известно, что проникающие протекторы действуют на клеточные мембраны бактерий. Они способны связывать внутриклеточную воду, защищая клетки от образующихся во время криоконсервации кристаллов льда [28, 29]. Анализ многих публикаций, касающихся криоконсервации микроорганизмов, показывает, что наиболее эффективными для криозащиты бактериальных клеток являются растворы ДМСО и глицерина [23, 28]. В основном их используют в высоких концентрациях – 10–15%. Однако главным недостатком этих криопротекторов при таких концентрациях является их токсичность по отношению к клеткам. Это подтверждают наши экспериментальные данные флуоресцентного тестирования и исследования цитотоксичности, из которых следует, что под защитой 5% ДМСО и глицерина бактериальные клетки сохранялись на уровне интактных образцов. В ряде других исследований также было обнаружено, что после замораживания микробиоты кишечника человека до криогенных температур (-80°C и -196°C) в растворах 10% ДМСО жизнеспособность бактерий распределяется в порядке

убывания следующим образом: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei*, *Klebsiella pneumoniae* и *Salmonella enterica* [17]. Данная концентрация раствора ДМСО может снижать пролиферативную активность некоторых видов аэробных бактерий [18, 22]. В случае с глицерином наиболее чувствительными к его 10%-й концентрации являются *Chlamydia* spp. [30], *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* и *E. coli* [31]. К тому же показано, что глицерин в концентрации 10–25% токсичен для грамотрицательных (*Escherichia coli*) и грамположительных (*Bacillus subtilis*) бактерий и микобактерий (*Mycobacterium smegmatis*), входящих в состав микробиоты кишечника человека [15]. В отличие от ДМСО, глицерин медленно проникает через клеточные стенки и плазматические мембраны бактерий при низких значениях температур, и это также может влиять на результаты более слабого криозащитного действия глицерина по сравнению с ДМСО для некоторых видов микроорганизмов [14].

Желатин как непроницающий протектор имеет другой механизм криозащитного действия, направленный на стабилизацию клеточных мембран и предотвращение образования внеклеточного льда [32, 33]. Он совершенно нетоксичен для бактериальных клеток, что позволяет использовать его в концентрации 10%. Однако сочетание 5%-го и 10%-го ДМСО или глицерина с 10% желатина не дает заметного преимущества в сохранности бактериальных сообществ после криоконсервации. Комбинация 10% желатина с 10% ДМСО или глицерина приводит к нивелированию криозащитных свойств проникающих протекторов, хотя каждый из этих по отдельности обеспечивает хорошую и надежную криозащиту как симбиотических микробных сообществ кишечника (рис. 1), так и коллекций микробиологических культур [14, 22]. По-видимому, это связано с инактивацией белковых молекул желатина в результате взаимодействия с ДМСО и глицерином.

Таким образом, несмотря на различия между ДМСО, глицерином и желатином по механизмам криозащитного действия, при совместном их использовании в концентрациях 5–10% они обеспечивают примерно одинаковый уровень сохранности кишечной микрофлоры после криоконсервации в жидком азоте (60–75%). Использование газовой атмосферы гелия, как показали наши исследования, оказалось не эффективным. Об этом свидетельствуют результаты, полученные при насыщении бактериальных суспензий гелием в течение 1 ч (рис. 4). Аналогичная картина наблюдалась при обработке клеточных суспензий гелием в течение 3 ч. Вероятно, при криоконсервации бактериальных клеток гелий не оказывает заметного влияния, подобного наблюдаемому при

криоконсервации клеточных культур Hela и L929, в связи с различием в механизме криоповреждений эукариотических и прокариотических клеток. На клеточных культурах теплокровных животных такой прием, наоборот, приводит к улучшению сохранности биоматериала после криоконсервации в жидком азоте [23]. Молекулярные механизмы криозащитного действия газов на сегодняшний день еще малоизучены и требуют дальнейших разработок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение хотелось еще раз отметить высокие криозащитные свойства 5%-х растворов ДМСО и глицерина, а также 10%-го желатина. Наши исследования оценивали жизнеспособность микробиоты кишечника человека в целом после криоконсервации в жидком азоте наряду со скринингом протекторов. При таком подходе неизбежны преимущественные потери определенных типов бактерий. Поэтому в дальнейших экспериментах планируется провести дополнительные исследования по выживаемости наиболее представительных видов микрофлоры кишечника, в частности строгих анаэробов, с использованием других методов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90187, а также договора № 0373100122118000037.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Possemiers, C. Grootaert, J. Vermeiren, et al., *Cur. Pharmaceut. Design* **15**, 2051 (2009).
2. Y. A. Poluektova, O. S. Lyashenko, O. S. Shifrin, et al., *Rus. J. Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology* **24**, 85 (2014).
3. M. J. Blaser and S. Falkow, *Nature Rev. Microbiol.* **7**, 887 (2009).
4. A. Barzegari, S. Eslami, Gh. Elham, and O. Yadollah, *Front. Microbiol.* **31** (5), 393 (2014). DOI: 10.3389/fmicb.2014.00393
5. A. Barzegari, N. Saeedi, and A. Saei, *Future Microbiol.* **9** (5), 639 (2014).
6. D. P. Bojanova and S. R. Bardenstein, *PLoS Biol.* **14**, e1002503 (2016).
7. D. V. Smirnova, L. V. Zalomova, A. V. Zagainova, et al., *Int. J. Med. Microbiol.* **309**, 259 (2019).
8. C. L. Lauber, N. Zhou, J. I. Gordon, et al., *FEMS Microbiol. Lett.* **307** (1), 80 (2010).
9. M. I. Bahl, A. Bergstrom, and T. R. Licht, *FEMS Microbiol. Lett.* **329**, 193 (2012).
10. I. M. Carroll, T. Ringel-Kulka, J. P. Siddle, et al., *PLoS One* **7** (10), e46953 (2012).
11. F. Fouhy, J. Deane, M. C. Rea, et al., *PLoS One* **10** (3), e0119355 (2015).
12. N. Gaci, P. P. Chaudhary, W. Tottey, et al., *Microb. Ecol. Health and Disease* **28**, 1308070 (2017). DOI: 10.1080/16512235.2017.1308070.
13. L. Bircher, C. Schwab, A. Geirnaert, and C. Ch. Lacroix, *Microb. Biotechnol.* **11** (1), 163 (2018).
14. O. Plakash, Y. Nimonkar, and Y. Shouche, *FEMS Microbiol. Lett.* **339**, 1 (2013).
15. Б. А. Шендеров, Э. Н. Гахова, М. А. Манвелова и др., Патент RU 2123044 (1998).
16. F.-M. Kerckhof, E. N. P. Courtens, A. A. Geirnaert, et al., *PLoS One* **9** (6), e99517 (2014).
17. A. Criste, M. Giuburuncă, O. Negrea, et al., *Animal Sci. Biotechnol.* **47** (2), 73 (2014).
18. B. J. Fuller, *CryoLetters* **25**, 375 (2004).
19. R. C. Chian, in *Fertility Cryopreservation*, Ed. by R.-C. Chian and R. Quinn (Cambridge University Press, Cambridge, 2010), pp. 1–9.
20. M. Hasan, A. E. R. Fayter, and M. I. Gibson, *Biomacromolecules* **19** (8), 3371 (2018). DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00660.
21. Z. Hubalek, *Cryobiology* **46**, 205 (2003).
22. D. Smith, M. J. Ryan, and E. Stackebrandt, in *Encyclopedia of Life Support Systems. Biotechnology*, Ed. by H. W. Doelle and E. J. DaSilva (EOLSS Publisher, Oxford, UK, 2012).
23. С. В. Уграйцкая, Н. В. Шишова, Е. Л. Гагаринский и др., *Биофизика* **63** (3), 510 (2018).
24. А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др., *Практикум по микробиологии* (Академия, М., 2005), сс. 103–104.
25. D. B. Roszak and R. R. Colwell, *Microbiol. Rev.* **51** (3), 365 (1987).
26. V. A. Gant, G. Warres, I. Philips, and G. F. Savidge, *J. Med. Microbiol.* **39** (2), 147 (1993).
27. T. Chen, A. Fowler, and M. Toner, *Cryobiology* **40**, 277 (2000).
28. F. W. Kleinhans, *Cryobiology* **37**, 271 (1989).
29. T. Nei, T. Araki, and T. Matsusaka, in *Freezing and Drying of Microorganisms*, Ed. by T. Nei (Tokyo: University of Tokyo Press, 1969).
30. H. T. Meryman, R. J. Williams, and M. S. J. Douglas, *Cryobiology* **14**, 287 (1977).
31. P. Mazur, in *Principles of cryobiology in Life in the Frozen State*, Ed. by B. J. Fuller, N. J. Lane and E. E. Benson (CRC Press, Boca Raton, FL, 2004), pp. 3–65.
32. M. J. Prentice and J. Farrant, *J. Clin. Microbiol.* **6**, 4 (1977).
33. H. T. Meryman, *Annu. Rev. Bioph. Bioeng.* **3**, 341 (1974).

Efficiency of Preservation of Human Gut Microbiota in Liquid Nitrogen Depending on the Composition of the Cryoprotective Medium

L.V. Zalomova*, D.A. Reshetnikov*, S.V. Ugraitskaya*, L.M. Mezhevikina*, A.V. Zagainova**, V.V. Makarov**, S.M. Yudin**, and E.E. Fesenko (Jr)*

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

***Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks, Ministry of Health of the Russian Federation, Pogodinskaya ul. 10/1, Moscow, 119435 Russia*

This paper presents a comparative analysis of the survival of the human intestinal microbiota after low-temperature conservation under protection of penetrating (dimethyl sulfoxide, glycerol), non-penetrating (gelatin) and gas (helium) cryoprotectants. Increased resistance of intestinal bacteria was revealed in response to low temperatures. A considerable part of bacteria ($50.0 \pm 3.0\%$) remain viable after freezing of liquid nitrogen temperature without cryoprotectant (s). 5% dimethyl sulfoxide ($86.0 \pm 4.0\%$), 5% glycerol ($82.0 \pm 5.2\%$), or 10% gelatin ($75.0 \pm 5.0\%$) showed highest viability of gut microbiota. No synergistic effect was observed in the cryopreservation medium combining cell-penetrating (dimethyl sulfoxide, glycerol) and non-penetrating (gelatin) protectants. Use of atmospheric helium even in combination with powerful cryoprotectants such as dimethyl sulfoxide and glycerol for protecting heterogeneous human gut microbiota did not improve cryopreservation, indicating that there is a need to optimize cryoprotective media, especially, for obligate anaerobes.

Keywords: intestinal microbiota, cryopreservation, cryoprotectants, microbial cell viability, fluorescence analysis