

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КЛЕТОК HeLa ПОД ВЫСОКИМ ГИДРОСТАТИЧЕСКИМ ДАВЛЕНИЕМ 1.0–1.5 КБАР

© 2021 г. С.В. Уграйская, Н.В. Шишова, Э.Р. Валеева, С.А. Каурова,
Н.Э. Швирст, Е.Е. Фесенко (мл.)

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

E-mail: eugeny.ef@gmail.com

Поступила в редакцию 15.07.2020 г.

После доработки 20.09.2020 г.

Принята к публикации 30.10.2020 г.

Идея использовать высокое давление для снижения криоповреждений имеет проработанное теоретическое обоснование, однако экспериментальных данных по замораживанию живых объектов под давлением крайне мало. Мы исследовали выживаемость клеток линии HeLa под давлением 1.0–2.0 кбар, токсические эффекты пяти классических криопротекторов в этих условиях, а также выживаемость клеток HeLa в процессе медленной криоконсервации под давлением 1.0 и 1.5 кбар. Экспериментально показана высокая устойчивость клеток HeLa к гидростатическому давлению: 100%-я выживаемость при 1.0 кбар и 60-минутной инкубации. Токсическое воздействие криопротекторов под давлением можно расположить в следующем ряду: глицерин < этиленгликоль < 1,2-пропандиол = ДМСО < ДМСО + формамид. Наименьшую токсичность проявили глицерин и этиленгликоль, для которых также показаны выраженные баропротекторные эффекты. При криоконсервации под давлением 1.0 кбар высокая выживаемость – $83 \pm 16\%$ по данным флуоресцентного окрашивания – была достигнута при использовании 10%-го глицерина, однако она не превысила показателей выживаемости, полученных в контрольных нормобарических экспериментах. Замораживание проводили по методу медленной классической криоконсервации. Использование давления для замораживания биоматериала методом витрификации может привести к другим результатам.

Ключевые слова: криоконсервация, гидростатическое давление, криопротекторы, баропротекторы, глицерин, формамид.

DOI: 10.31857/S0006302921010130

Криоконсервация является важным элементом современных биотехнологий, так как это единственный метод, обеспечивающий длительное – на месяцы и годы – хранение жизнеспособного биологического материала. С помощью криоконсервации осуществляется хранение самого разного биологического материала – клеток крови, гамет, клеточных культур, эмбрионов и др. Несмотря на то что для многих объектов процедуры замораживания и хранения разработаны и широко используются (например, для крови, спермы и т.п.), продолжается поиск повышения эффективности методов криоконсервации. Изучение новых подходов в дополнение к существующим традиционным методам замораживания необходимо также в связи с тем, что пока не разработаны протоколы криоконсервации для зна-

чительного числа биологических объектов (яйцеклеток, эмбрионов и личинок рыб, эмбрионов птиц, массивов тканей и органов животных и человека и др.).

Большинство криоповреждений биологического материала при криоконсервации прямо либо косвенно связано с образованием кристаллов льда в процессе замораживания. Такие параметры, как количество кристаллов льда, их размер, форма, локализация, соотношение кристаллического льда и остеклованного остаточного раствора, оказывают значительное влияние на жизнеспособность и качество замороженно-оттаянного биологического материала. Перечисленные параметры существенно зависят прежде всего от состава криозащитной среды и от скорости замораживания в различных температурных диапазонах, однако и другие факторы могут влиять на формирование структуры замороженного раствора.

Сокращения: ДМСО – диметилсульфоксид, ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка.

Известно, что гидростатическое давление воздействует на процесс кристаллизации льда [1, 2]. В связи с тем, что вода обладает аномальными свойствами, при повышении давления в диапазоне до 2.1 кбар температура кристаллизации воды и водных растворов понижается [1, 2]. Каждые дополнительные 100 бар давления понижают точку кристаллизации воды примерно на 1°C, а температуру образования зародышей кристаллической фазы в отсутствие примесей (точку гомогенной нуклеации) — на 2.0–2.5°C [1, 2]. Одновременно с этим под воздействием высокого гидростатического давления увеличивается вязкость растворов и несколько повышается температура перехода раствора из жидкого в стеклообразное состояние [3].

Идея об использовании высокого гидростатического давления для снижения криоповреждений в процессе замораживания биологических объектов появилась достаточно давно и обсуждалась еще в семидесятые годы прошлого века [4, 5]. Впоследствии было несколько исследований поведения растворов криопротекторов при охлаждении под давлением [3, 6]. Ряд специалистов полагает, что криоконсервация под высоким гидростатическим давлением может быть перспективным направлением криобиологии применительно к объектам, плохо поддающимся процедуре обратимого замораживания [6–9].

Концепция замораживания биологических объектов в условиях высокого гидростатического давления нашла применение в технологии фиксации биологических образцов для исследования клеточных структур. Замораживание под давлением 2.0–2.1 кбар является рутинным методом фиксации образцов для исследований методами электронной микроскопии [10, 11]. Отмечается, что замораживание под давлением позволяет хорошо сохранить клеточные структуры без искажений и возникновения артефактов.

Несмотря на перечисленное, экспериментальные данные по замораживанию живых объектов под высоким гидростатическим давлением крайне малочисленны. В 1976 г. А. Воротилин с соавторами [5] замораживали красные кровяные клетки под высоким гидростатическим давлением, для достижения которого применялась технология «ледяной бомбы». Точные значения давления не были указаны, но очевидно, что оно достигало приблизительно 1.5–2.0 кбара. Авторы отмечали, что в случае криоконсервации эритроцитов в присутствии непроникающих криопротекторов (ПЭО-400, сахароза, поливинилпирролидон) замораживание под высоким давлением позволяло уменьшить повреждения замороженно-оттаянных клеток, снижая гемолиз в полтора-три раза. Однако при применении проникающих криопротекторов (диметилсульфоксид (ДМСО),

глицерин, ацетамид, пропиленгликоль) использование давления в процессе замораживания, напротив, проявляло негативный эффект, значительно ухудшая сохранность эритроцитов.

Н. Грир [12] также замораживал эритроциты под высоким гидростатическим давлением. В этих экспериментах замораживание осуществлялось в условиях давления от 0.7 до 2.0 кбар, в то время как оттаивание проводили при атмосферном давлении. В отличие от предыдущих авторов в данной работе была отмечена высокая эффективность сочетания давления и проникающих криопротекторов (ДМСО, глицерин). Было найдено, что оптимальное давление для замораживания эритроцитов составляет 1.2 кбар. В экспериментах с наиболее удачным сочетанием давления (1.2 кбар), скорости охлаждения (35°C/мин) и криопротектора (7%-й глицерин) гемолиз эритроцитов не превышал 5%.

Дж. Хубингер с соавторами [13] сделали попытку получить жизнеспособные замороженно-оттаянные культуры, используя технологию криофиксации биообъектов под давлением, разработанную для электронной микроскопии. Они замораживали культуру *Escherichia coli*, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и культуру клеток HeLa. Были использованы две технологии, применяемые в электронной микроскопии: система быстрой заморозки под давлением (SPRF) и замораживание под высоким давлением (HPF). Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* выживали приблизительно одинаково как в контроле (замораживание при атмосферном давлении), так и в экспериментальных группах с использованием указанных методов. Клетки HeLa при замораживании в системе SPRF продемонстрировали выживаемость 75–90% (в зависимости от применяемых криопротекторов и конкретной модели камеры SPRF), однако при замораживании в системе HPF выживало не более 2–4% клеток. Нужно отметить, что система SPRF обеспечивает давление внутри камеры только в случае частичной кристаллизации воды, однако применяемые авторами криозащитные растворы и скорости замораживания были близки к витрифицирующим. Если образцы полностью витрифицировались, давление в камере SPRF оставалось близким к значениям атмосферного, так что наличие высокого гидростатического давления при указанных условиях замораживания клеток HeLa в системе SPRF остается спорным.

Также необходимо упомянуть серию работ по изохорическому (с сохранением постоянного объема) сохранению биологических объектов при отрицательной температуре (Isochoric preservation at subfreezing temperatures) [14–17]. Метод предполагает использование принципа Ле Шателье для минимизации льдообразования ниже точки кри-

сталлизации раствора. Вода обладает свойством увеличивать объем при замерзании. За счет этого свойства при кристаллизации воды в замкнутой системе с жестко фиксированным объемом, образующийся лед вызывает повышение давления, что в свою очередь сдвигает равновесную точку льдообразования и препятствует дальнейшему росту кристаллов льда. Хранение биологических образцов осуществляют при небольшой отрицательной температуре, в условиях частичного замораживания раствора, окружающего биологический объект. Авторы данного метода сообщают о высокой выживаемости в описываемых условиях нематод [14], сохранения жизнеспособности и функциональных свойств панкреатических островков [15] и сердца крысы [16, 17].

Для понимания перспектив использования высокого гидростатического давления для совершенствования методов криоконсервации необходимо значительно расширить экспериментальную базу в этой области. Также необходимы исследования по воздействию криопротекторов на живые клетки под высоким гидростатическим давлением.

В нашей работе мы исследовали токсичность и баропротекторные свойства ряда криопротекторов в условиях гидростатического давления 1.0, 1.5 и 2.0 кбар в отношении клеток линии HeLa и проводили криоконсервацию этих клеток под давлением 1.0–1.5 кбар по методу медленной (классической) криоконсервации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В качестве тест-объектов для криоконсервации использовали клетки линии HeLa, полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Культивирование клеток проводили по стандартной методике [18]. Использовали среду ДМЕМ в модификации Дульбекко (Gibco, Великобритания) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «ПанЭко», Россия), 50 мкг/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина. Клетки выращивали в культуральных флаконах E75 (Eppendorf, США). Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе MCO-175 (SANYO, Япония) при 37°C во влажной атмосфере в течение 48 ч, после чего пассировали их в расчете 30–50 тыс. кл./см². Ферментативное открепление клеток от культуральной чашки проводили с использованием 0.05%-го раствора трипсина–ЭДТА (Gibco, Великобритания).

Применяемые криозащитные растворы. Растворы криопротекторов готовили на среде ДМЕМ в модификации Дульбекко с добавлением 10% ЭТС. В экспериментах использовали глицерин,

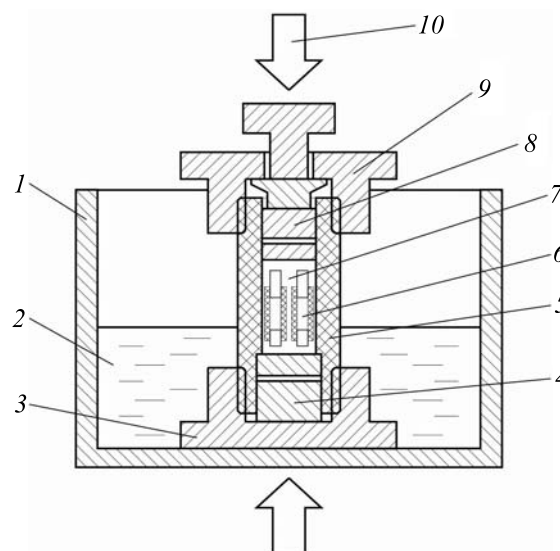


Рис. 1. Камера высокого давления для исследования поведения растворов при замораживании-оттаивании: 1 – металлическая емкость с внешней термоизоляцией, 2 – охлаждающая (жидкий азот) или разогревающая (теплая вода) жидкость, 3 – гайка обтюратора, 4 – обтюратор, 5 – тело камеры, 6 – капсулы с биологическим материалом, 7 – рабочее пространство камеры, заполненное 50%-м раствором глицерина, 8 – поршень Бриджмена, 9 – гайка-фиксатор поршня, 10 – приложение давления с помощью децимального пресса.

этиленгликоль, 1,2-пропандиол, ДМСО (конечная концентрация в суспензии клеток – 10%) и смесь ДМСО/формаид в соотношении 2 : 1 (конечная концентрация 6.6% ДМСО, 3.4% формаида). Все криопротекторы были приобретены у фирмы Sigma-Aldrich (США).

Подготовка клеток к экспериментам. Перед экспериментом клетки, растущие в виде монослоя, переводили в суспензию. Для этого монослой трижды промывали 0.05%-м раствором трипсина–ЭДТА и выдерживали в течение 3 мин при 37°C, после чего раствор сливали, клетки пипетировали несколько раз и переносили в среду ДМЕМ с 10% ЭТС. Количество клеток в суспензии подсчитывали в камере Горяева. Криопротекторы к суспензии клеток добавляли в два этапа с интервалом 30 с. Концентрация клеток в экспериментах по определению токсичности и баропротекторных свойств криопротекторов составляла 2 млн/мл, в экспериментах по криоконсервации клеточной культуры – 5 млн/мл.

Воздействие гидростатического давления на клетки, определение токсичности криопротекторов под давлением. Для экспериментов по определению устойчивости клеток к давлению и изменению токсичности криопротекторов под давлением использовали специализированную камеру (рис. 1). Суспензию клеток помещали в силико-

новые капсулы объемом 70 мкл с закрывающимися подвижными поршнями, изготовленными из фторопласта по системе «цилиндр плюс два поршня» (см. позицию 6 на рис. 1). Данные поршни использовали с целью предотвращения возможного повреждения капсул из-за изменения объема суспензии в процессе подачи давления или кристаллизации воды. При заполнении капсул следили, чтобы в них отсутствовали пузырьки воздуха во избежание повреждения капсул под высоким давлением.

Капсулы с подготовленным биологическим материалом помещали во внутреннее пространство частично собранной камеры высокого давления, заполненное 50%-м раствором глицерина при комнатной температуре или при температуре 4°C (в зависимости от схемы эксперимента). Камеру собирали в рабочее положение и помещали под поршень децимального пресса (рис. 1, позиция 10). Давление нагнетали со скоростью 150 бар/мин до уровня, указанного в эксперименте, выдерживали пробы при максимальном давлении 10 или 30 мин, после чего начинали снижение давления. До 100 бар скорость снижения давления составляла 150 бар/мин, последующее снижение давления вплоть до атмосферного давления осуществляли со скоростью 60 бар/мин. После этого доставали капсулы из камеры, извлекали из них клеточную суспензию и проводили анализ клеток на жизнеспособность.

Криоконсервация под давлением. Для криоконсервации образцы клеточной суспензии помещали в капсулы, затем капсулы переносили в камеру высокого давления, как описано в предыдущем разделе. После достижения необходимого давления фиксировали поршень 8 фиксирующей гайкой 9 и переносили камеру либо непосредственно в низкотемпературный холодильник с температурой –130°C (охлаждение со средней скоростью 2°C/мин), либо сначала помещали камеру в термоизолирующий пенопластовый контейнер, в котором переносили ее в низкотемпературный холодильник (охлаждение со средней скоростью 0.5°C/мин). Скорость охлаждения замеряли в пробных экспериментах в диапазоне от 20°C до –100°C с помощью термометра АТТ-2004 («АКТАКОМ», Россия). Хранение при температуре –130°C проходило в течение 20 ч.

Оттаивание. Процедуру оттаивания проводили в двух модификациях. В первом варианте оттаивание, как и замораживание, проводили под высоким давлением. Камеру с зафиксированным поршнем (рис. 1, позиция 8) помещали в водяную баню 30°C. После разогрева камеру перемещали под пресс, нагнетали давление, соответствующее давлению замораживания, и отпускали фиксирующую гайку 9. С помощью пресса плавно снимали давление до 100 бар со скоростью 150 бар/мин

и далее до атмосферного давления со скоростью 60 бар/мин. Извлекали поршень 8 и доставали капсулы с биологическим материалом. Во втором варианте оттаивание проводили при атмосферном давлении, для этого отпускали фиксирующую гайку 9 на охлажденной камере, после чего помещали камеру в водяную баню 30°C для оттаивания. Скорость оттаивания биоматериала составляла 20°C/мин.

Определение жизнеспособности клеток проводили двумя способами: 1) подсчитывали количество живых клеток в суспензии с помощью витального красителя трипанового синего, 2) анализировали функциональное состояние клеток методом их культивирования *in vitro*.

Краситель трипановый синий использовали в виде 0.4%-го раствора, приготовленного на основе фосфатного солевого буфера (Sigma Aldrich, 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, Великобритания). Жизнеспособность рассчитывали как соотношение неокрашенных (живых) клеток к общему количеству клеток в суспензии и выражали в процентах.

Для культивирования размороженных клеток использовали шестилуночные планшеты (Costar, США). В каждую лунку вносили по 50 мкл клеточной суспензии в 2 мл среды ДМЕМ с 10% ЭТС. Клетки инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 5 ч, затем проводили полную смену инкубационной среды для удаления не прикрепившихся мертвых клеток. Далее через 11 ч оценивали количество клеток в каждой лунке с помощью CloneSelect Imager (Genetix, Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние высокого гидростатического давления 1.0, 1.5 и 2.0 кбар на жизнеспособность клеток HeLa. Прежде чем приступить к экспериментам по криоконсервации, мы оценили чувствительность клеточной культуры HeLa к воздействию высокого гидростатического давления в пределах 1.0–2.0 кбар. Результаты эксперимента представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, давление в 1.0 кбар не только не оказывало негативного воздействия на клетки, а, напротив, стимулировало их развитие в культуре. Экспозиция клеток под более высоким давлением (1.5 кбар) приводила к увеличению количества клеток с поврежденными мембранами и снижению показателей развития клеток в процессе культивирования. При этом негативное

Таблица 1. Жизнеспособность клеток линий HeLa после воздействия гидростатического давления

Параметры воздействия давлением		Жизнеспособность клеток	
Давление, кбар	Длительность экспозиции под давлением, мин	Окрашивание трипановым синим, % живых клеток $\pm SD$	Количество развивающихся клеток в культуре через 16 ч после воздействия, тыс.кл/см ² $\pm SD$
Атмосферное (контроль)	—	98 $\pm$ 2	254 $\pm$ 22
1.0	60	95 $\pm$ 5	318 $\pm$ 9
1.5	60	40 $\pm$ 17	70 $\pm$ 6
	10	87 $\pm$ 12	98 $\pm$ 13
2.0	10	5 $\pm$ 5	0

Примечание. Гидростатическое давление 1.0–2.0 кбар, температура 22°C ($n = 5$).

воздействие давления усиливалось как при увеличении давления, так и при увеличении длительности экспозиции клеток под давлением. После воздействия гидростатического давления 2.0 кбар даже в течение относительно короткого промежутка времени (10 мин) клетки в культуре не развивались, а небольшое количество клеток, оставшихся морфологически нормальными, деградировали и разрушались в течение нескольких часов.

Токсичность криопротекторов при давлении 1 кбар. Давление оказывает воздействие не только на кристаллизацию воды, но и на взаимодействие различных веществ между собой. Соответственно, давление может оказывать влияние на взаимодействие криопротекторов с клеточной мембраной, белками и другими структурами клетки и усиливать токсичность криопротекторов. Воздействие глице-

рина мы проверяли при комнатной температуре, так как для данного криопротектора токсичность слабо зависит от температуры, в то время как проницаемость глицерина через клеточные мембраны кардинально снижается при охлаждении растворов [19, 20], и в действие могут вступать негативные осмотические эффекты. Токсичность этиленгликоля оценивали как при комнатной температуре, так и при температуре 0°C в связи с тем, что в соответствии с разными методиками криоконсервации добавление и отмывание этого криопротектора может происходить как при комнатной, так и при пониженной температуре [21]. Остальные криопротекторы добавляли и отмывали при 0°C, как это принято в практике криоконсервации. В табл. 2 представлены результаты воздействия криопротекторов на клетки HeLa при нормобарии и под давлением 1 кбар, не оказывающим негативного влияния на

Таблица 2. Жизнеспособность клеток линий HeLa при нормобарии и после воздействия гидростатического давления

Криопротектор и температура экспозиции, °C	Жизнеспособность клеток после экспозиции под давлением 1.0 кбар (Опыт)		Жизнеспособность клеток после экспозиции при нормобарии (Контроль)	
	Окрашивание трипановым синим, % живых клеток $\pm SD$	Количество развивающихся в культуре клеток через 16 ч после тыс.кл/см ² $\pm SD$	Окрашивание трипановым синим, % живых клеток $\pm SD$	Количество развивающихся в культуре клеток через 16 ч после тыс.кл/см ² $\pm SD$
Контроль без криопротекторов	96 $\pm$ 4	299 $\pm$ 12	98 $\pm$ 2	260 $\pm$ 25
Глицерин 10%, 22°C	95 $\pm$ 3	168 $\pm$ 19	99 $\pm$ 1	191 $\pm$ 20
Этиленгликоль 10%, 22°C	99 $\pm$ 1	88 $\pm$ 32	98 $\pm$ 1	180 $\pm$ 26
Этиленгликоль 10%, 0°C	89 $\pm$ 5	72,5 $\pm$ 16	99 $\pm$ 1	195 $\pm$ 17
1,2-Пропандиол 10%, 0°C	98 $\pm$ 1	40 $\pm$ 17	99 $\pm$ 1	152 $\pm$ 22
ДМСО 10%, 0°C	99 $\pm$ 1	44 $\pm$ 18	99 $\pm$ 1	203 $\pm$ 25
ДМСО 6.6% + формамид 3.4%, 0°C	81 $\pm$ 8	11 $\pm$ 3	95 $\pm$ 2	217 $\pm$ 22

Примечание. Гидростатическое давление 1.0 кбар в течение 10 мин при 22°C или 0°C в присутствии криопротекторов ($n = 5$).

Таблица 3. Жизнеспособность клеток линий HeLa после воздействия гидростатического давления в присутствии криопротекторов глицерина и этиленгликоля

Криопротектор	Давление, кбар	Жизнеспособность клеток после экспозиции под давлением	
		Окрашивание трипановым синим, % живых клеток $\pm SD$	Количество развивающихся в культуре клеток через 16 ч после воздействия, тыс.кл/см ² $\pm SD$
Контроль (без криопротекторов)	Нормобария	98 $\pm$ 2	224 $\pm$ 41
Контроль (без криопротекторов)	1,5	90 $\pm$ 10	102 $\pm$ 14
Глицерин 10%		95 $\pm$ 4	168 $\pm$ 39
Этиленгликоль 10%		90 $\pm$ 9	87 $\pm$ 30
Контроль (без криопротекторов)	2,0	7 $\pm$ 6	0
Глицерин 10%		88 $\pm$ 5	51 $\pm$ 12
Этиленгликоль 10%		90 $\pm$ 6	47 $\pm$ 9

Примечание. Время воздействия 10 мин при температуре 22°C ($n = 5$).

жизнеспособность интактных клеток. Глицерин, известный как ма-лотоксичный криопротектор, не проявил токсичности и в условиях давления 1.0 кбар. Экспозиция клеток в растворе прочих криопротекторов под давлением приводила к заметному угнетению последующего роста клеток в культуре. В целом токсическое воздействие криопротекторов под давлением можно расположить в следующем ряду: глицерин < этиленгликоль < 1,2-пропандиол = ДМСО < ДМСО + формамид.

Баропротекторные свойства глицерина и этиленгликоля при давлении 1.5 и 2.0 кбар. Для оценки баропротекторных свойств криопротекторов мы оценивали влияние 10%-го глицерина и 10%-го этиленгликоля на состояние клеток HeLa после экспозиции под давлением 1.5 и 2.0 кбар в течение 10 мин при комнатной температуре (без охлаждения и замораживания). Результаты представлены в табл. 3.

Глицерин существенно повышал выживаемость клеток, подвергшихся воздействию давления, при этом достоверно улучшалось как состояние клеточных мембран, так и развитие клеток в культуре после экспозиции под давлением. Баропротекторное действие глицерина отмечалось при разном уровне давления.

Проявление баропротекторных свойств этиленгликоля зависело от уровня приложенного давления. Добавление этиленгликоля при критическом давлении 2.0 кбар, которое вызывало гибель клеток без криопротекторов, приводило к повышению выживаемости клеток. Так после экспозиции клеток под давлением 2.0 кбар в при-

сутствии этиленгликоля суспензия содержала 90% живых клеток, при этом в культуре часть клеток прикреплялась к субстрату, в то время как в контроле при приложении аналогичного давления в отсутствие криопротекторов наблюдали только 7% живых клеток, а при помещении их в культуру через 16 ч культивирования живых клеток в культуре не обнаруживали. Однако при экспозиции клеток под давлением 1.5 кбар этиленгликоль не оказывал какого-либо влияния на жизнеспособность клеток (см. табл. 3).

Криоконсервация клеток под давлением. Для экспериментов по криоконсервации клеток под давлением были отобраны криопротекторы глицерин и этиленгликоль в связи с тем, что эти вещества проявили наиболее низкую токсичность в условиях высокого гидростатического давления 1 кбар и проявляли баропротекторные свойства при 1.5 и 2.0 кбар. Мы тестировали два режима замораживания под давлением со скоростью замораживания 0.5°C/мин и 2°C/мин и два режима оттаивания — под высоким гидростатическим давлением и в условиях нормального атмосферного давления. Последний вариант криоконсервации (замораживание под давлением, оттаивание при нормобарии) был включен в схему экспериментов на основании работы [12], так как именно при такой схеме авторы получили наиболее высокую сохранность замороженно-оттаянных эритроцитов. Однако скорость замораживания в нашей работе отличалась, так как для клеточных культур оптимальными являются более медленные скорости замораживания, чем для эритроцитов [22,

Таблица 4. Жизнеспособность клеток HeLa после криоконсервации под гидростатическим давлением

Криопротектор	Скорость охлаждения при замораживании, °C/мин	Давление при замораживании, кбар	Давление при размораживании, кбар	Выживаемость культуры клеток экспериментальной группы		Выживаемость клеток контрольной группы (замораживание и размораживание при нормобарии по идентичному температурному протоколу)	
				Окрашивание трипановым синим, % живых клеток $\pm SD$	Количество развивающихся клеток через 16 ч культивирования, тыс.кл/см ² $\pm SD$	Тест на окрашивание трипановым синим, % живых клеток	Количество развивающихся клеток через 16 ч культивирования, тыс.кл/см ² $\pm SD$
Контроль без криопротектора	2	1.0	1.0	0	0	53 $\pm$ 15	26 $\pm$ 20
Этиленгликоль, 10%	0.5	1.0	1.0	0	0	99 $\pm$ 1	185 $\pm$ 40
		1.5	1.5	0	0		
Этиленгликоль, 10%	2	1.0	1.0	0	0	99 $\pm$ 1	162 $\pm$ 10
Глицерин, 10%	0.5	1.0	1.0	30 $\pm$ 10	41 $\pm$ 30	99 $\pm$ 1	174 $\pm$ 27
		1.5	1.5	78 $\pm$ 6	20 $\pm$ 18		
Глицерин, 10%	2	1.0	1.0	28 $\pm$ 25	10 $\pm$ 10	90 $\pm$ 5	181 $\pm$ 30
Глицерин, 10%	0.5	1.0	Нормобария	80 $\pm$ 20	60 $\pm$ 19	99 $\pm$ 1	169 $\pm$ 37
		1.5	Нормобария	10 $\pm$ 9	0		
Глицерин, 10%	2	1.0	Нормобария	83 $\pm$ 16	165 $\pm$ 27	99 $\pm$ 1	147 $\pm$ 60

Примечание: $n = 5$.

23]. Результаты экспериментов по криоконсервации клеточной культуры представлены в табл. 4.

Криоконсервация клеток линии HeLa по медленному протоколу замораживания под давлением 1.0 и 1.5 кбар не привела к повышению выживаемости клеток HeLa по сравнению с классической криоконсервацией при атмосферном давлении. При испытании режимов, предусматривающих как замораживание, так и размораживание под давлением, наиболее высокую степень жизнеспособности демонстрировали клетки, замороженные в присутствии 10%-го глицерина со

скоростью замораживания 0.5°C/мин. После криоконсервации под давлением 1.5 кбар тест с трипановым синим выявлял 70–80% живых клеток, при этом клетки частично сохраняли способность прикрепляться к субстрату и пролиферировать — через 16 ч культивирования замороженно-оттаянных проб наблюдали морфологически нормальную развивающуюся культуру с плотностью 20 $\pm$ 18 тыс. кл./см². Тем не менее эти показатели были значительно ниже в сравнении с развитием клеток, криоконсервированных по аналогичному протоколу под атмосферным давлением.

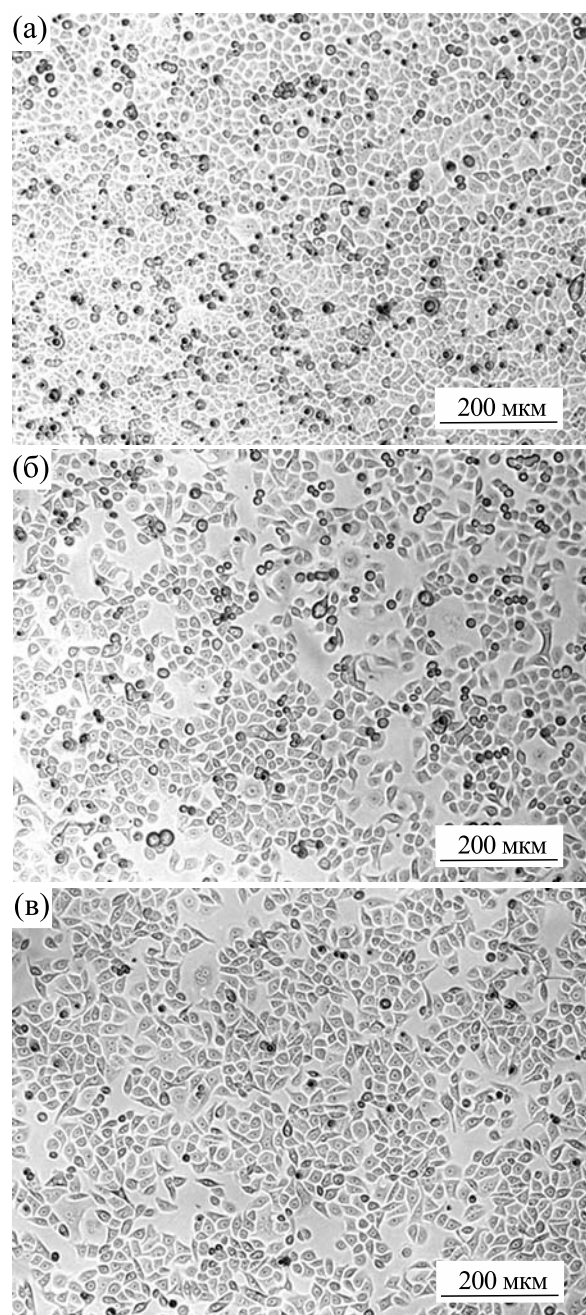


Рис. 2. Культура HeLa через 16 ч культивирования: (а) — нативная культура; (б) — после криоконсервации под давлением с 10%-м глицерином, замораживание под давлением 1 кбар со скоростью 2°С/мин, размораживание при нормобарии; (в) — после криоконсервации при нормобарии, другие параметры протокола замораживания/оттаивания аналогичны группе «б».

Наиболее высокая выживаемость клеток HeLa была выявлена при их криоконсервации под защитой 10% глицерина по гибриднему протоколу: замораживание под высоким гидростатическим давлением, размораживание при амби-

ентном давлении (рис. 2). В экспериментах мы зафиксировали, что развитие клеток линии HeLa в культуре после замораживания под давлением 1.0 кбар со скоростью 2°С/мин и оттаивании без приложения давления была несколько выше, чем в контрольной группе с аналогичным режимом замораживания/оттаивания без применения давления. Однако улучшение выживаемости клеток при применении давления было небольшим и статистически недостоверным. При этом хотя развитие клеток в культуре было сопоставимо с контролем, тест на целостность клеточных мембран по окрашиванию с трипановым синим выявил негативное влияние давления на состояние клеточных мембран.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наши эксперименты показали, что клетки линии HeLa обладают довольно высокой устойчивостью к воздействию высокого гидростатического давления. Толерантность животных клеток разного происхождения к давлению порядка 1.0 кбар может довольно существенно отличаться. Например, воздействие давлением выше 700–800 бар даже в течение нескольких минут вызывает необратимые изменения в культуре фибробластов эмбриональной ткани сердца цыпленка [24]. В то же время ряд других клеточных культур (клетки эндотелия пупочной вены, клетки гладкой мускулатуры, культура 3N1H/3T3) легко переносит давление до 1.0 кбар при условии, что экспозиция под высоким давлением длится не более 10 мин [25]. Давление 1,0 кбар может инициировать клеточный апоптоз, что приводит к угнетению или гибели клеточной культуры при дальнейшем культивировании. Такое воздействие зафиксировано для ряда клеточных линий, включая лимфоциты человека и ганглионарные клетки сетчатки [26–28].

В наших экспериментах давление 1.0 кбар не только не угнетало клетки HeLa, но и оказывало на них стимулирующее воздействие. Повышение же давления до более высоких значений (1.5 кбар) вызывало в процессе культивирования снижение скорости прикрепления клеток к субстрату и задержку роста клеточной культуры (табл. 1).

Исследование воздействия криопротекторов в условиях высокого гидростатического давления на клетки HeLa выявило, что высокое гидростатическое давление оказывает существенное влияние на проявление токсичности. После экспозиции клеточной культуры с криопротекторами под давлением 1.0 кбар, которое само по себе не оказывало негативного воздействия на клетки HeLa (см. эксперимент 1), выживаемость клеток в целом оказалась значительно ниже, чем при экспозиции с криопротекторами при нормобарии

(табл. 2). При этом токсичность криопротекторов под давлением изменялась в разной степени. При нормобарии такие криопротекторы, как глицерин, ДМСО и этиленгликоль, проявляли приблизительно одинаковую токсичность в отношении клеток HeLa. Однако при экспозиции под давлением 1.0 кбар выживаемость клеточной культуры в присутствии этиленгликоля была вдвое хуже, чем в присутствии глицерина, а в присутствии ДМСО и 1,2-пропандиола — почти вчетверо. Интересно, что негативное воздействие этиленгликоля на клетки практически не зависело от температуры. Экспозиция с этим криопротектором под давлением при температуре 22°C и 0°C приводила к последующему замедлению роста клеточной культуры приблизительно в равной степени (табл. 2).

Следует обратить особое внимание на смесь криопротекторов ДМСО и формамида. Считается, что эти два криопротектора обладают свойством частично нейтрализовать токсическое воздействие друг друга на клетки млекопитающих [29–31]. Такое сочетание криопротекторов часто применяют в витрифицирующих растворах, где требуется крайне высокая концентрация стеклующих агентов [30, 32, 33]. Действительно, в наших экспериментах при атмосферном давлении такое сочетание криопротекторов не оказывало токсического воздействия на клетки HeLa. Однако в условиях повышенного гидростатического давления смесь ДМСО и формамида оказала крайне негативное воздействие на жизнеспособность клеток. Выживаемость после экспозиции под давлением в присутствии смеси 6.6% ДМСО и 3.4% формамида была вчетверо хуже, чем после экспозиции под давлением в присутствии 10% ДМСО (табл. 2). В последующих работах по исследованию криоконсервации биоматериала под высоким гидростатическим давлением необходимо с особой осторожностью вводить в состав криозащитных сред формамид, а возможно, и другие карбоксамиды.

Считается, что все или большинство криопротекторов обладают баропротекторными свойствами [34] и могут повышать выживаемость биологических объектов под высоким гидростатическим давлением. В связи с высокой толерантностью клеток HeLa к высокому гидростатическому давлению мы исследовали баропротекторные свойства криопротекторов только при давлении 1.5 и 2.0 кбар. Для исследований были отобраны криопротекторы, показавшие низкую токсичность под давлением. Глицерин проявлял баропротекторные свойства и способствовал выживанию клеток после воздействия высокого

гидростатического давления, что согласуется с литературными данными [34–36]. Этиленгликоль в качестве баропротектора проявил себя неоднозначно. Этот криопротектор способствовал выживанию клеток HeLa при воздействии давления 2.0 кбар, но не оказал защитного воздействия при экспозиции клеток под давлением 1.5 кбар (табл. 3). Это говорит о том, что, вопреки мнению некоторых авторов [34], не всегда криопротекторы проявляют защитный эффект при воздействии высокого давления на животные клетки.

Для экспериментов по криоконсервации под давлением мы отобрали глицерин и этиленгликоль как самые перспективные в связи с низкой токсичностью, которую эти криопротекторы проявили под давлением без замораживания. Кроме того, глицерин обладает выраженным баропротекторным действием, что делает применение этого криопротектора для криоконсервации с использованием высокого гидростатического давления особенно привлекательным. Криоконсервацию проводили либо под давлением 1.0 кбар, т.е. применяли тот уровень давления, который в предварительных экспериментах не оказал негативного воздействия на клетки, либо под давлением 1.5 кбар. Криоконсервация под давлением по медленному протоколу в наших экспериментах не привела к повышению выживаемости биологического материала по сравнению с традиционной криоконсервацией при атмосферном давлении. Более того, замораживание под давлением чаще всего приводило к резкому ухудшению выживаемости клеток по сравнению с контролем. Исключением оказался вариант, предусматривающий смешанный протокол применения давления (замораживание под давлением 1.0 кбар, размораживание при атмосферном давлении) и глицерин в качестве криопротектора. Выживаемость клеток HeLa при криоконсервации по такому протоколу была сравнима с выживаемостью в контроле, после криоконсервации без применения высокого давления. Следует отметить, что этот режим наиболее близок к тому, что использовался в работе [12] для замораживания эритроцитов. В этой работе использование высокого гидростатического давления в технологии криоконсервации эритроцитов существенно повысило их сохранность после замораживания-оттаивания. Возможно, это объясняется тем, что эритроциты являются безъядерными клетками и по физиологии существенно отличаются от использованной нами культуры клеток HeLa. Единственная известная из литературных данных попытка замораживания клеток HeLa под давлением [13], так же как и в наших экспериментах, не

выявила положительного эффекта от применения высокого гидростатического давления в процессе криоконсервации клеток.

В целом можно заключить, что в наших экспериментах использование высокого гидростатического давления при криоконсервации не привело к повышению выживаемости биологического материала после замораживания-оттаивания. В то же время нужно отметить, что мы работали по методу медленной или классической криоконсервации. Механизмы, обеспечивающие сохранность биологического материала при медленной криоконсервации и при витрификации существенно отличаются. Использование высокого гидростатического давления для замораживания биоматериала методом витрификации практически не исследовано и может привести к другим результатам.

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. H. Kanno, R. J. Speedy, and C. A. Angell, *Science* **189**, 880 (1975).
2. H. Kanno and C. A. Angell, *J. Phys. Chem.* **81**, 2639 (1977).
3. K. Miyata, S. Hayakawa, K. Kajiwar, and H. Kanno, *Cryobiology* **65**, 113 (2012).
4. M. D. Persidsky, *Cryobiology* **8**, 380 (1971).
5. А. М. Воротилин, С. Д. Корчиков и Л. В. Гордиенко, *Криобиология и криомедицина* **2**, 65 (1976).
6. X. Yu Zhang, Z. Chen, and G. Chen, *Cryobiology* **66**, 186 (2013).
7. G. M. Fahy, D. I. Levy, and S. E. Ali, *Cryobiology* **24**, 196 (1987).
8. A. Aertsen, F. Meersman, M. E. Hendrickx, et al., *Trends Biotechnol.* **27** (7), 434 (2009).
9. А. В. Карнаухов, Э. Н. Гахова и Е. В. Карнаухова, в кн. *Консервация генетических ресурсов. Материалы XV рабочего совещания*, под ред. Э. Н. Гаховой, В. Н. Карнаухова и В. К. Утешева. (Пушино, 1998), сс.104–111.
10. R. Dahl and L. A. Staehelin, *J. Electron. Microsc. Tech.* **13** (3), 165 (1989).
11. D. Vanhecke, W. Graber, and D. Studer, *Methods Cell Biol.* **88**, 151 (2008).
12. N. Greer, *Cryobiology* **70**, 66 (2015).
13. J. Huebinger, H. M. Han, and M. Grabenbauer, *PLoS One* **11** (10), e0164270 (2016).
14. H. Mikus, A. Miller, G. Nastase, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **477** (3), 401 (2016).
15. M. J. Powell-Palm, Y. Zhang, J. Aruda, and B. Rubinsky, *Cryobiology* **86**, 130 (2019).
16. L. Wan, M. J. Powell-Palm, C. Lee, A. Gupta, B. P. Weegman, M. G. Clemens, B. Rubinsky, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **496** (3), 852 (2018).
17. L. Wan, M. J. Powell-Palm, M. G. Clemens, and B. Rubinsky, *CryoLett.* **40** (1), 64 (2019).
18. R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (5th Ed.)*, (Hoboken, John Wiley & Sons, Inc, New York, 2005).
19. S. Jackowski, S. P. Leibo, and P. Mazur, *J. Exp. Zool.* **212** (3), 329 (1980).
20. J. Wang, K. Zhu, G. Zhao, et al., *PLoS One.* **8** (9), e72836 (2013).
21. E. C. Rivas Leonel, C. M. Lucci, and C. A. Amorim, *Transfus. Med. Hemother.* **46** (3), 173 (2019).
22. C. Philippeos, R. D. Hughes, A. Dhawan, and R. R. Mitry, *Methods Mol. Biol.* **806**, 1 (2012).
23. J. M. Baust, G. C. Buehring, L. Campbell, et al., *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **53** (8), 669 (2017).
24. J. V. Landau, *Exp. Cell Res.* **21**, 78 (1960).
25. A. Mahara, N. Morimoto, T. Sakuma, et al., *Biomed. Res. Int.* **2014**, 379607 (2014).
26. K. J. Takano, T. Takano, Y. Yamanouchi, and T. Satou, *Exp. Cell Res.* **235**, 155 (1997).
27. A. Agar, S. Li, N. Agarwal, et al., *Brain Res.* (2006) **1086**, 191 (2006).
28. T. Yamaguchi, K. Hashiguchi, S. Katsuki, et al., *Cell Mol. Biol. Lett.* **13**, 49 (2008).
29. S. Baxter and G. Lathe, *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1079 (1971).
30. G. M. Fahy, T. H. Lilley, H. Linsdell, et al., *Cryobiology* **27**, 247 (1990).
31. G. M. Fahy, *Cryobiology* **60** (Suppl. 3), S45 (2010).
32. G. M. Fahy, B. Wowk, J. Wu, and S. Paynter, *Cryobiology* **48**, 22 (2004).
33. G. M. Fahy and B. Wowk, *Methods Mol. Biol.* **1257**, 21 (2015).
34. А. Е. Крисс, *Жизненные процессы и гидростатическое давление* (Наука, М., 1973).
35. L. F. Onuchic and F. Lacaz-Vieira, *Cryobiology* **22** (5), 438 (1985).
36. A. C. Oliveira, L. P. Gaspar, A. T. Da Poian, and J. L. Silva, *J. Mol. Biol.* **240**, 184 (1994).

Cryopreservation of HeLa Cells under High Hydrostatic Pressure of 1.0–1.5 kbar

**S.V. Ugraitskaya, N.V. Shishova, E.R. Valeeva, S.A. Kaurova,
N.E. Shvirst, and E.E. Fesenko (Jr.)**

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

The idea of using high pressure to reduce the freezing damage has been thoroughly theorized thus far, but there is little experimental evidence on cryopreservation of living systems under high hydrostatic pressure. We investigated the viability of HeLa cells under pressure of 1.0–2.0 kbar, the toxic effects of five classical cryoprotectants under these conditions, as well as the viability of HeLa cells during slow (conventional) cryopreservation under pressure of 1.0 and 1.5 kbar. High resistance of HeLa cells to hydrostatic pressure was experimentally shown: 100% cell survival upon exposure to 1.0 kbar of pressure for 60 min of incubation. The toxic effects of cryoprotectants under pressure can be arranged in the following order: glycerol < ethylene glycol < 1,2-propanediol = DMSO < DMSO+formamide. Glycerol and ethylene glycol were the least toxic agents, which also exerted pronounced baroprotective effects. During cryopreservation under pressure of 1.0 kbar a high survival rate of $83 \pm 16\%$ according to fluorescent staining data was achieved using 10% glycerol, but it did not exceed the survival rates obtained in control normobaric experiments. Freezing was carried out by the method of slow conventional cryopreservation. Using high pressure to freeze biomaterial by vitrification may lead to different results.

Keywords: cryopreservation, hydrostatic pressure, cryoprotectants, baroprotectors, glycerol, formamide