

## ФЕТАЛЬНАЯ СЫВОРОТКА В СОЧЕТАНИИ С 5% ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА ЭФФЕКТИВНО ЗАЩИЩАЕТ МИКРОБИОТУ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ В ЖИДКОМ АЗОТЕ

© 2021 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, Погодинская ул., 10/1

E-mail: zalomova.91@mail.ru

Поступила в редакцию 10.03.2021 г.

После доработки 10.03.2021 г.

Принята к публикации 18.03.2021 г.

В связи с развитием медицинских технологий все большую актуальность приобретает разработка методов длительной консервации цельной микробиоты кишечника человека, которые бы обеспечивали высокую сохранность, как в отношении видового состава, так и в отношении количественного паритета составляющих микробиоценоз бактерий. Исследовано влияние 5- и 10%-х растворов диметилсульфоксида, глицерина, этиленгликоля, желатина, полиэтиленгликоля, поливинилового спирта, фетальной сыворотки коров, а также фетальной сыворотки в комбинации с 5% диметилсульфоксида на выживаемость кишечной микробиоты человека в процессе криоконсервации в жидком азоте (минус 196°C, хранение до 7 суток). Наиболее высокие показатели выживаемости бактерий при криоконсервации достигнуты при использовании криозащитной смеси на основе фетальной сыворотки коров и 5%-го диметилсульфоксида: от 81 до 87% жизнеспособных клеток по данным флуоресцентного теста LIVE/DEAD при показателе интактной микробиоты, равном 88–90%. Эффективность выбранного криозащитного состава подтверждена также методом микробиологического культивирования в экспериментах по криоконсервации отдельных штаммов – характерных представителей микробиоты кишечника человека.

*Ключевые слова:* криоконсервация, флуоресцентный анализ, фетальная сыворотка коров, культивирование бактерий.

DOI: 10.31857/S0006302921040177

Микрофлора, населяющая желудочно-кишечный тракт человека, является ценным биологическим ресурсом, так как играет важную роль в жизнеобеспечении и поддержании здоровья человека. Нарушение баланса видового состава кишечной микрофлоры, наблюдаемое в последние годы в результате неконтролируемого приема антибиотиков, искусственного пищевого рациона и общего ухудшения экологической обстановки, приводит к возникновению таких заболеваний, как диабет, ожирение, гипертония, психические расстройства [1–3]. Лечение традиционными методами патологий, связанных с дисбалансом ки-

шечной микрофлоры, не всегда дает быстрые и позитивные результаты. Одним из направлений современной медицины является интродукция кишечных микроорганизмов от здорового донора к реципиенту для восстановления основных функций микробиоты [4–6]. Рассматривается также возможность аутологичной интродукции собственных микроорганизмов, сохраненных в период жизни человека до развития заболевания (например, в молодом возрасте) [7, 8]. В этой связи все большую актуальность приобретает развитие технологий длительной консервации микробиоты кишечника человека, которые бы обеспечивали высокую сохранность микробиоты как в отношении видового состава, так и в отношении количественного паритета составляющих микробиоценоз бактерий [9, 10].

*Сокращения:* ДМСО – диметилсульфоксид, ФСК – фетальная сыворотка коров, ПЭГ – полиэтиленгликоль, ПВС – поливиниловый спирт, КОЕ – колониеобразующие единицы.

По данным современных молекулярно-генетических исследований в состав микробиоты кишечника человека входят от 500 до 1000 различных видов бактерий [11]. Основными ее представителями являются анаэробные грамположительные бифидобактерии, лактобактерии и энтерококки, а также грамотрицательные факультативные анаэробные бактероиды и кишечная палочка. Основным методом длительной консервации микробиоты является криоконсервация — низкотемпературное хранение при температуре от  $-80^{\circ}\text{C}$  и ниже, до температуры жидкого азота ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Для криоконсервации существенное значение имеют внутривидовые характеристики, присущие разным бактериям, прежде всего, структурные и функциональные особенности клеточных мембран [12, 13]. Так, считается, что энтерококки и представители кишечной палочки, являясь факультативными анаэробами, имеют повышенную устойчивость к низкотемпературным воздействиям [14]. Методы низкотемпературной консервации бактерий разработаны и успешно используются для сохранения отдельных монокультур. Проблема долгосрочной низкотемпературной консервации целых микробиоценозов пока не решена. Анализ относительно немногочисленных исследований по криоконсервации микробиоты представлен в нашей обзорной статье [15]. Для сохранения микробиоты в основном пытаются использовать те же протоколы консервации, которые используются для отдельных монокультур. В качестве криопротекторов чаще всего фигурируют диметилсульфоксид (ДМСО) и глицерин в концентрациях от 10 до 15% [14, 16–19], реже используются дисахариды [20]. Однако в наших экспериментах было показано, что глицерин в концентрации 10–15% и ДМСО оказывают токсическое действие на клетки бактерий и что такие концентрации являются избыточными для целей криоконсервации [21]. Достаточно использовать их в 5%-й концентрации. При этом можно прогнозировать, что использование сред на основе единственного криопротектора, будь то ДСМО или глицерин, не будет обеспечивать равно эффективную защиту для всех бактерий, составляющих сообщество. В этой связи актуален поиск многокомпонентных сред, обеспечивающих синергические защитные эффекты в процессе криоконсервации.

Потенциальным компонентом для такой среды является фетальная сыворотка коров (ФСК). Согласно литературным данным, фетальная сыворотка часто используется в составе сред замораживания эукариотических клеток [22–27]. Как правило, ее концентрация в криозащитной смеси составляет 10–30%. В отдельных исследованиях успешно применяли ФСК в концентрации 90–100% [28, 29]. В работе [30] описано усиление криозащитных свойств ФСК в отношении кле-

точной культуры гепатоцитов в зависимости от увеличения ее содержания в среде вплоть до 90%. Ряд других экспериментов показывает, что фетальная сыворотка коров не всегда эффективно защищает клетки эукариот после криоконсервации независимо от ее концентрации [31, 32]. Очевидно, что это связано с особенностями проницаемости мембран различных типов клеток. Мы не нашли работ, в которых были бы исследованы криозащитные эффекты ФСК в отношении консервации отдельных культур бактерий или микробных сообществ.

Целью нашего исследования была оценка эффективности сохранения микробиоты кишечника человека и отдельных ее представителей, факультативных анаэробов: *Escherichia coli* (граммотрицательные бактерии), *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* (грамположительные бактерии) в процессе криоконсервации в жидком азоте под защитой ФСК, широкого спектра известных криопротекторов, а также сочетания данных агентов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования.** Микробиота кишечника человека в виде бактериальной суспензии, полученной от взрослых доноров, а также готовые коллекционные культуры кишечных микроорганизмов: семейства *Enterobacteriaceae* — *Escherichia coli* (лактозопозитивный и лактозонегативный штаммы), бактерии семейства *Enterococcaceae* (*E. faecium*, *E. faecalis*). Культуры кишечных микроорганизмов были взяты из индивидуальных коллекций Центра стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Минздрава России.

**Выделение бактериальных клеток.** Бактериальные суспензии готовили из расчета 0.1 г фекальной массы в 0.9 мл стерильного изотонического раствора 0.9% NaCl, тщательно перемешивали до образования гомогенной консистенции. Для отделения бактерий от посторонних примесей использовали центрифугирование: сначала в 0.9% NaCl при 1200 об/мин в течение 5 мин, затем двукратное центрифугирование в 0.9% NaCl при 10000 об/мин 10 мин. Далее работали с образовавшимся осадком, который ресуспендировали в 1 мл изотонического раствора. После этого подсчитывали общее количество бактериальных клеток в суспензии по методу Виноградского—Брида [21, 33]. В результате определения числа клеток в 1 мл суспензии вычисляли объем суспензии бактерий, который будет давать конечную концентрацию микробов до величины  $(1-2) \cdot 10^8$  клеток/мл криозащитной среды во всех образцах.

Монокультуры кишечных бактерий разных видов/штаммов доводили до рабочей concentra-

ции  $10^7$  клеток/мл криозащитной среды с помощью готовых образцов стандарта мутности.

**Криоконсервация бактериальных суспензий.** Замораживание суспензий кишечных бактерий (чистые культуры и микробиота) проводили в стандартных криопробирках объемом 1 мл (CRYO S, Greiner, Германия). Бактериальные суспензии в объеме 0.5 мл переносили в криопробирки, содержащие 0.5 мл криозащитной среды, 0.9% NaCl (контроль) или ФСК. Концентрация микроорганизмов в каждой криопробирке составляла  $(1-2) \cdot 10^8$  клеток/мл. Затем образцы замораживали путем прямого погружения криопробирок в жидкий азот со средней скоростью  $90 \pm 1.5^\circ\text{C}/\text{мин}$ . Время между добавлением бактериальных суспензий в пробирки с протекторами и их погружением в жидкий азот не превышало 5 мин. Длительность хранения образцов в жидком азоте составляла от двух до семи суток. По истечении этого времени образцы размораживали на водяной бане при  $37^\circ\text{C}$ . После размораживания клетки бактерий осаждали путем центрифугирования при 10000 об/мин в течение 10 мин, затем их ресуспендировали в 0.9% NaCl для определения жизнеспособности.

**Криопротекторы.** В экспериментах использовали 5%-е и 10%-е растворы ДМСО (Sigma, Aldrich, США), глицерина (Sigma Aldrich, США), этиленгликоля (PanReac AppliChem, Германия), желатина (PanReac AppliChem, Германия), полиэтиленгликоля ПЭГ-600 Да (Sigma Aldrich, США), поливинилового спирта (ПВС) с молекулярной массой 72 кДа (Sigma Aldrich, США); бычий сывороточный альбумин (Biosera, Франция) и фетальную сыворотку коров (ПанЭКО, Россия). Криозащитные среды готовили на 0.9% NaCl или ФСК в весовых долях.

**Оценка жизнеспособности кишечных бактерий после криоконсервации.** Метод флуоресцентного анализа. Сравнительный анализ жизнеспособности цельной микробиоты кишечника человека до и после криоконсервации проводили флуоресцентным методом с помощью тест-набора LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit 7012 (Molecular Probe, США). Жизнеспособность оценивали по соотношению интенсивности флуоресцентных красителей SITO9 и пропидиум йодида (PI), дающих зеленый (живые клетки) и красный (мертвые клетки) спектры при длине волны 480–500 и 500–635 нм соответственно.

Перед проведением флуоресцентного анализа снимали контрольные показатели интенсивности флуоресценции при разных разведениях бактериальных суспензий по соотношению живых и мертвых бактерий (0:100, 10:90, 50:50, 90:10, 100:0) для построения калибровочной кривой. Суспензию мертвых клеток получали с помощью 96%-го этилового спирта (1 ч экспозиции при комнатной температуре).

Опытные бактериальные суспензии после размораживания центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин для удаления криопротектора. После центрифугирования супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в 1 мл 0.9% NaCl. Далее образцы переносили на 96-луночные планшеты (Медполимер, Россия) с добавлением в каждую лунку по 100 мкл готовой смеси флуоресцентных красителей LIVE/DEAD BacLight. Спустя 15 мин измеряли интенсивность флуоресценции на планшетном фотометре (FilterMax F5, США).

**Метод микробиологического культивирования.** Чистые коллекционные культуры кишечных бактерий *E. coli* (лактозопозитивный и лактозонегативный штаммы) и видов семейства *Enterococaceae* (*E. faecium*, *E. faecalis*) культивировали на плотных дифференциально-диагностических средах. Для *E. coli* использовали среду Эндо агар (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) и/или хромогенную среду HiChrom (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Энтерококки культивировали на хромогенном энтерококковом агаре (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

Культивирование кишечных бактерий проводили на чашках Петри диаметром 10 см (Thermo Scientific, США) при постоянной температуре ( $37^\circ\text{C}$ ) в сухо-жаровом шкафу Heratherm IMC 18 (Thermo Scientific, США) в течение 24 ч до образования колоний на поверхности сред. Жизнеспособность бактерий оценивали путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) в серии последовательных разведениях исходной суспензии ( $10^7$  клеток/мл). Указанная концентрация является оптимальной для посева бактерий. На чашки Петри сеяли по 0.1 мл суспензии в разведениях  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ . Для каждого разведения использовали по три чашки Петри ( $n = 3$ ). Каждый эксперимент повторяли трижды.

**Статистическая обработка результатов.** Показатели жизнеспособности бактериальных клеток выражали как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение независимых  $n$  повторов в каждом эксперименте. Статистическую значимость различий между группами проверяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считались достоверными при  $P \leq 0.05$ . Для построения диаграмм использовали программное обеспечение Sigma Plot 14.0 (Systat Software, Inc, Канада).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице приведены результаты флуоресцентного анализа жизнеспособности микробиоты человека после криоконсервации под защитой различных протекторов при их сравнении с ДМСО, акцент на исследовании которого был

сделан в нашей предыдущей публикации [21]. В число исследуемых криопротекторов вошли также полимеры ПВС и ПЭГ, положительный эффект которых в процессе консервации микробиоты описан в работе [19].

Как видно из таблицы, максимальную жизнеспособность бактерий на уровне  $86.0 \pm 4.0$  обеспечивал 5%-й раствор ДМСО. Близкие результаты по выживаемости кишечных микроорганизмов достигались при использовании 5%-х растворов глицерина, этиленгликоля и ПВС – в среднем 79–82% живых клеток. Желатин при такой же концентрации оказывал менее выраженный криозащитный эффект –  $62.0 \pm 2.0\%$  жизнеспособных клеток. ПЭГ обеспечивал низкий уровень сохранности клеток – менее 40%. В работе [19] для 10%-го ПЭГ и 10%-го ПЭГ с 1%-м ПВС был показан сильный криозащитный эффект в отношении отдельных видов кишечных бактерий, однако в наших экспериментах в отношении целого микробиоценоза он не подтвердился. Важно отметить, что при переходе от 5%-й концентрации к 10%-й снижение сохранности кишечных бактерий показано для всех криопротекторов кроме желатина. Снижение показателей жизнеспособности, как мы полагаем, объясняются токсичностью этих протекторов.

Из приведенных выше результатов следует, что для низкотемпературной консервации микробиоты кишечника лучше всего подходит ДМСО в низкой концентрации – 5%. Данная концентрация является оптимальной по критерию соотношения криозащита/токсическое действие в однокомпонентной криозащитной среде, однако использование нескольких компонентов потенциально способно улучшить данный критерий, а также повысить надежность консервации в отношении бактериального микробиоценоза. В этой связи в следующем эксперименте был применен подход, основанный на совместном использовании ДМСО с фетальной сывороткой коров. Такой прием часто применяется при низкотемпературном замораживании криочувствительных эукариотических клеток.

Результаты анализа жизнеспособности микробиоты (LIVE/DEAD тест) в криозащитных средах, содержащих 5% ДМСО, 10% ДМСО, 100% ФСК, 95% ФСК + 5% ДМСО и 90% ФСК + 10% ДМСО, представлены на рис. 1. Было показано, что микробиота кишечника человека хорошо сохранялась под защитой 5%-го ДМСО, приготовленного как на основе 0.9% NaCl, так и на основе ФСК, после низкотемпературной консервации в жидком азоте –  $86.0 \pm 2.0\%$  и  $84.0 \pm 3.0\%$  живых клеток соответственно. 10%-е модификации сред показали более низкие результаты, что наводит на предположение о том, что сыворотка не способна нивелировать токсическое действие

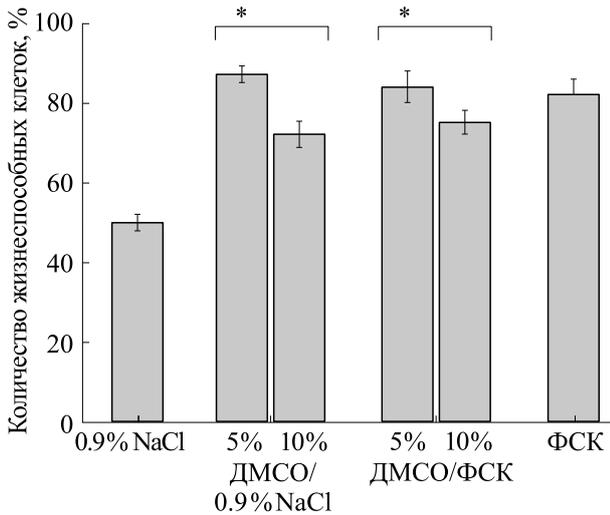
Жизнеспособность микробиоты кишечника человека после криоконсервации в жидком азоте с проникающими и непроникающими протекторами

Криозащитная среда	Процент жизнеспособных клеток
Интактная микробиота	$89.0 \pm 1.0$
0.9% NaCl (отрицательный контроль)	$50.0 \pm 1.0$ [21]
ДМСО, 5%	$86.0 \pm 4.0$ [21]
Глицерин, 5%	$81.0 \pm 2.0$
Этиленгликоль, 5%	$82.0 \pm 5.0$
Полиэтиленгликоль, 5%	$37.0 \pm 4.0$
Поливиниловый спирт, 5%	$79.0 \pm 2.0$
Желатин, 5%	$62.0 \pm 2.0$
ДМСО, 10%	$76.0 \pm 5.0$ [21]
Глицерин, 10%	$61.0 \pm 3.0$
Этиленгликоль, 10%	$78.0 \pm 3.0$
Полиэтиленгликоль, 10%	$35.0 \pm 2.0$
Поливиниловый спирт, 10%	$74.0 \pm 4.0$
Желатин, 10%	$77.0 \pm 4.0$

Примечание. Тест LIVE/DEAD BacLight. Условия криоконсервации: температура –196°C, срок хранения – 72 ч. Растворы протекторов приготовлены на основе 0.9% NaCl ( $n = 20$ ).

ДМСО. В чистой ФСК без добавления ДМСО уровень жизнеспособных бактериальных клеток также был высок и составил  $82.0 \pm 4.0\%$ .

Фетальная сыворотка может выполнять роль криопротектора для кишечных микроорганизмов за счет биологических активных веществ, различных ростовых факторов и цитокинов, влияющих на свойства и сохранность клеточных мембран, а также на процессы восстановления после криоконсервации. В частности, альбумин – основной компонент сыворотки – способствует восстановлению барьерных свойств плазматической мембраны и усиливает сигнальные пути бактериальных клеток во время роста. Для того чтобы оценить его вклад в криозащиту в составе ФСК (содержание альбумина в ФСК составляет 40–50 мг/мл), был проведен эксперимент по криоконсервации микробиоты в средах с различным



**Рис. 1.** Жизнеспособность (метод LIVE/DEAD BacLight) смеси кишечных микроорганизмов после криоконсервации в жидком азоте (температура  $-196^{\circ}\text{C}$ , срок хранения 72 ч) в 5- и 10%-х растворах ДМСО, приготовленных на основе 0.9% NaCl и ФСК ( $n = 25$ ). \* – Достоверность различий жизнеспособности микробиоты кишечника при использовании смесей ДМСО/0.9% NaCl и ДМСО/ФСК с различной концентрацией ДМСО ( $P < 0.05$ ), согласно критерию оценки достоверности результатов Манна–Уитни.

содержанием альбумина. В результате эксперимента показано, что чистый альбумин, взятый в концентрациях 10, 30 и 50 мг/мл, менее эффективно по сравнению с ФСК защищает микробиоту кишечника, снижая общее количество живых клеток в процессе криоконсервации до 61–73% выживших бактерий (рис. 2).

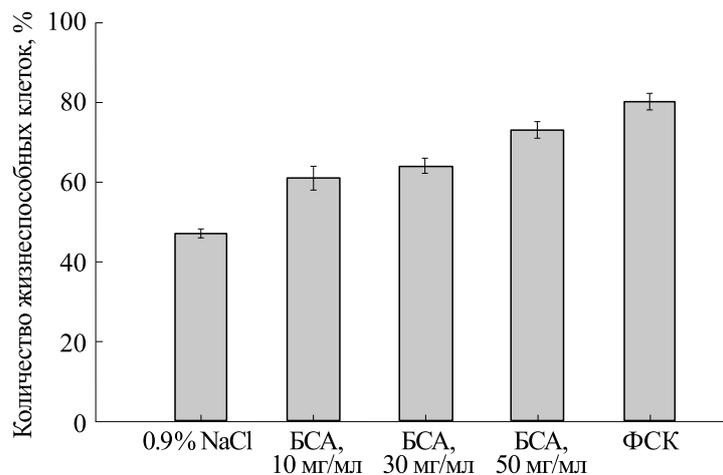
Таким образом, показано, что криозащитное действие ФСК нельзя в полной мере заместить

использованием альбумина. Другие компоненты ФСК также необходимы для того, чтобы в полном объеме обеспечивать сохранность и восстановление клеток микроорганизмов желудочно-кишечного тракта.

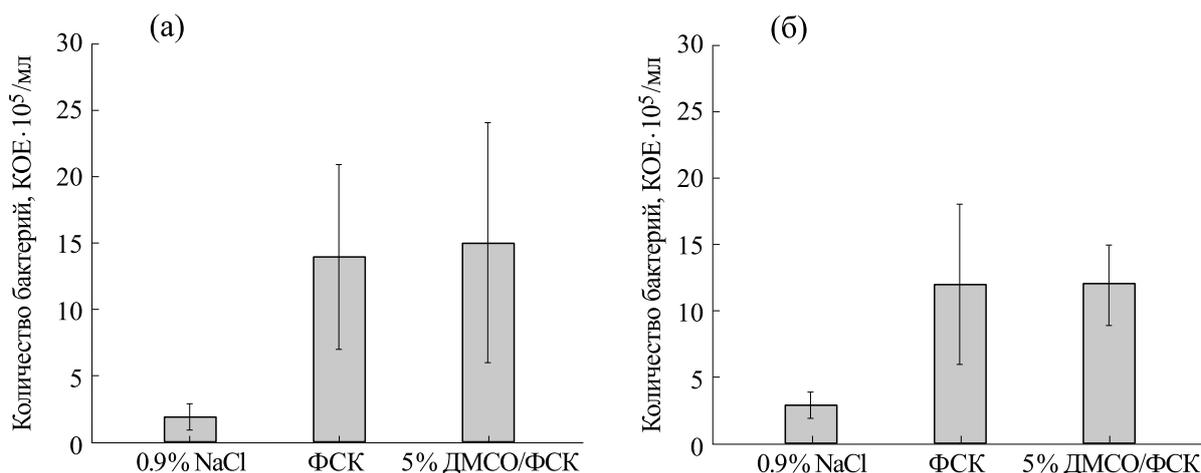
Полученные нами результаты сохранности микробиоты показали, что добавление 5% ДМСО в ФСК дает незначительное увеличение защитных свойств среды замораживания, по сравнению с чистой сывороткой (рис. 1). Однако учитывая большое разнообразие микроорганизмов кишечной микрофлоры, обоснованно предположить, что одни фракции бактерий будут лучше сохраняться под защитой ФСК, а другие – под защитой ДМСО, что повысит надежность криоконсервации микробного сообщества.

Для подтверждения этого предположения были проведены эксперименты по криоконсервации нескольких наиболее распространенных видов/штаммов микрофлоры кишечника человека (кишечная палочка, энтерококки), различающихся между собой по строению и свойствам плазматических мембран (грамотрицательные и грамположительные бактерии). В этих экспериментах жизнеспособность клеток до и после криоконсервации оценивали по их способности образовывать колонии на плотных питательных дифференциально-диагностических средах методом посева. В роли криозащитных агентов использовали чистую ФСК, а также ФСК в сочетании с 5% ДМСО и как отрицательный контроль – 0.9% NaCl.

В ходе культивирования в течение 24 ч при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  на питательных средах Эндо агар и HiChrom лактозопозитивный штамм *E. coli* продемонстрировал высокий рост колоний (на уровне  $(12-14) \cdot 10^5$  КОЕ/мл) после криоконсерва-



**Рис. 2.** Жизнеспособность (метод LIVE/DEAD BacLight) микробиоты кишечника человека после криоконсервации (температура  $-196^{\circ}\text{C}$ , срок хранения 72 ч) в 0.9% NaCl, ФСК и в средах с различным содержанием альбумина, приготовленного на основе 0.9% NaCl ( $n = 6$ ).



**Рис. 3.** Выживаемость лактозопозитивного штамма *Escherichia coli* в результате культивирования на средах Эндо агар (а) и HiChrom (б) после криоконсервации (температура  $-196^{\circ}\text{C}$ , срок хранения 96 ч) в ФСК и в ее сочетании с 5% ДМСО. По стандарту мутности титр *E. coli Lac*<sup>+</sup> до криоконсервации составил 107 кл/мл.

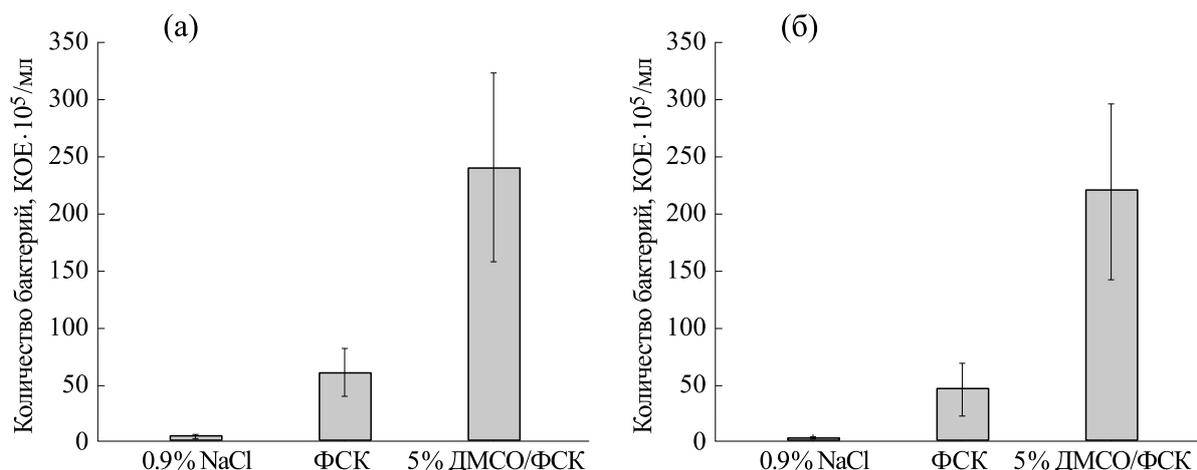
ции в жидком азоте под защитой ФСК и ФСК с добавлением 5% ДМСО по отношению к контролю ( $(2-5) \cdot 10^5$  КОЕ/мл) (рис. 3).

В данном эксперименте результаты бактериального роста оказались близкими в средах ФСК и ФСК с 5% ДМСО для *E. coli Lac*<sup>+</sup>. Из рис. 3 следует, что использование двухкомпонентной защитной среды для данного штамма не предоставляло преимуществ по сравнению с чистой ФСК.

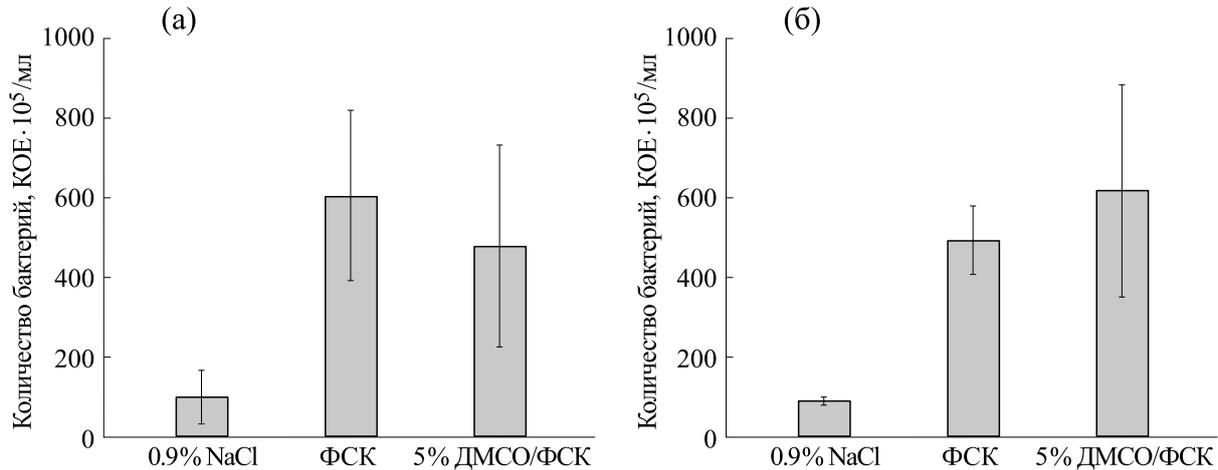
Помимо способности к росту колоний после криоконсервации важной оценкой также считается сохранение штаммами ферментативной активности. Особенностью лактозопозитивного

штамма *E. coli* является наличие  $\beta$ -галактозидазной и  $\beta$ -глюкоронидазной ферментативной активности, обуславливающей красно-малиновый цвет колоний с металлическим блеском в среде Эндо агар и синий цвет колоний в среде HiChrom соответственно. Результаты культивирования после криоконсервации демонстрировали наличие данных цветовых показателей для позитивного штамма, что свидетельствовало о сохранности этих систем.

На рис. 4 продемонстрированы результаты культивирования лактозонегативного штамма *E. coli* после криоконсервации. Этот штамм также культивировали на чашках Петри в течение 24 ч при



**Рис. 4.** Выживаемость лактозонегативного штамма *Escherichia coli* в результате культивирования на средах Эндо агар (а) и HiChrom (б) после криоконсервации (температура  $-196^{\circ}\text{C}$ , срок хранения 96 ч) в ФСК и в ее сочетании с 5% ДМСО. По стандарту мутности титр *E. coli Lac*<sup>-</sup> до криоконсервации составил 107 кл/мл.



**Рис. 5.** Выживаемость кишечных бактерий *Enterococcus faecium* (а) и *Enterococcus faecalis* (б) в результате культивирования на энтерококковом агаре после криоконсервации (температура  $-196^{\circ}\text{C}$ , срок хранения 96 ч) в ФСК и в ее сочетании с 5% ДМСО. По стандарту мутности титр *E. faecium* и *E. faecalis* до криоконсервации составил 107 кл/мл.

температуре  $37^{\circ}\text{C}$  на средах Эндо агар и HiChrom. На гистограмме видно, что интенсивный рост клеток штамма обнаруживался под защитой ФСК с добавлением 5% ДМСО —  $240 \cdot 10^5$  КОЕ/мл на Эндо агаре и  $218 \cdot 10^5$  КОЕ/мл на HiChrom. В 100%-й сыворотке после криоконсервации в среднем наблюдалось в четыре раза меньше восстановленных колоний *E. coli Lac<sup>-</sup>*. В контрольных образцах значение КОЕ не превышало  $3 \cdot 10^5$  КОЕ/мл. В этом эксперименте двухкомпонентная криозащитная смесь продемонстрировала явное преимущество по сравнению с чистой ФСК, что подтверждает правильность выбранного подхода к криоконсервации микробиоты. Ввиду того, что в эксперименте не рассматривали чистый 5%-й ДМСО, нельзя оценить, присутствует ли синергический эффект при использовании ФСК и ДМСО. Однако подтвердилось предположение, что некоторые штаммы бактерий, в частности *E. coli Lac<sup>-</sup>*, лучше сохраняются под защитой ДМСО, нежели ФСК. Можно предположить, что для ряда других бактерий сообщества будет наблюдаться обратная картина.

На рис. 5 приведены результаты выживаемости двух культур кишечных энтерококков после криоконсервации в жидком азоте. Штаммы выращивали на селективной среде — энтерококковом агаре. Данная среда позволяет идентифицировать *E. faecium* (в норме клетки имеют розовый цвет) и *E. faecalis* (в норме клетки имеют лиловый цвет) за счет различий на биохимическом уровне.

На гистограмме видно, что ФСК и ФСК в сочетании с 5% ДМСО демонстрировали высокий рост колоний *E. faecium* и *E. faecalis* до  $700 \cdot 10^5$  КОЕ/мл по отношению к контролю ( $(92-100) \cdot 10^5$  КОЕ/мл). Для обеих культур энтерококков не было выявлено статистически достоверных различий в результатах культивирования при сравнении сред ФСК и ФСК в комбинации с ДМСО (рис. 5). В целом представители семейства *Enterococcaceae* сохранялись примерно на том же уровне, что и *Enterobacteriaceae* при криоконсервации в жидком азоте.

Основной целью наших экспериментов было исследование сохранности микробиоты кишечника человека как целой общности. На сегодняшний день относительно мало исследований посвящено этой проблеме, несмотря на ее все возрастающую актуальность. Литературные данные показывают, что для консервации бактерий используется широкий спектр различных криопротекторов, исчерпывающий список которых можно найти в обзоре [14]. При этом самыми распространенными протоколами криоконсервации бактерий являются протоколы, основанные на использовании глицерина и ДМСО. Для консервации цельной микробиоты кишечника (бактериальные суспензии, фекальные инокуляты, цельные фекалии) преимущественно пытаются адаптировать те же самые протоколы, что и для монокультур микроорганизмов с использованием композиций 10–20%-х растворов глицерина (не менее половины всех исследований), реже ДМСО (около 20% исследований), еще реже трегалозы, инулина, ПЭГ, сахарозы, желирующих

агентов [15, 17, 35]. Для криоконсервации фекальных трансплантатов почти исключительно использовался 10%-й глицерин (10 из 11 работ, опубликованных с 2012 г.), а замораживание осуществляли при  $-80^{\circ}\text{C}$  [15].

Глицерин можно рассматривать в качестве «золотого стандарта» консервации цельной микробиоты, однако его преимущества с нашей точки зрения не являются неоспоримыми. Так, в недавнем исследовании [19] показано, что 15–25%-е растворы глицерина значительно снижали выживаемость микроорганизмов. По нашим экспериментальным данным по показателю выживаемости микробиоты после консервации глицерин продемонстрировал высокую эффективность на уровне 80%, однако уступил в этом отношении ДМСО. Кроме того, отмечалось значительное снижение выживаемости микробиоты при повышении концентрации с 5% до 10%.

В работе [19], основываясь на идее о необходимости подавления в первую очередь роста кристаллов льда, вместо глицерина авторы предложили использовать полимерные непроницающие молекулы ПЭГ и ПВС по отдельности или в комбинации. При этом полимерные молекулы были призваны оказывать эффекты, аналогичные действию антифризных белков, вырабатываемых некоторыми экстремофильными бактериями [36]. Мы изучили сохранность кишечной микробиоты под защитой непроницающих протекторов ПВС и ПЭГ, которые упоминаются в работе [19]. Если в отношении ПВС был показан заметный, хотя и уступающий показателям глицерина и ДМСО, криозащитный эффект, то ПЭГ, наоборот, продемонстрировал высокую токсичность по отношению к клеткам бактерий.

Лидерами по эффективности криозащиты в нашем исследовании выступили ДМСО и ФСК. При этом их совместное использование не ухудшало показатели выживаемости микробиоты, составившие 80–90%, что сопоставимо с данными анализа незамороженной микробиоты ( $\approx 90\%$ ). Очевидно, что криозащитный состав, основанный на монокриопротекторе, не будет равноэффективно защищать всех представителей микробного сообщества. С этой точки зрения многокомпонентные составы будут иметь преимущество в надежности криоконсервации. Наши экспериментальные данные по консервации ряда выбранных представителей микробиоты подтверждают правильность такого подхода.

Основными режимами криоконсервации, используемыми для хранения микробных сообществ, являются быстрый способ замораживания

с погружением образца в жидкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) с последующим переносом в низкотемпературный морозильник ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) (порядка 50% всех исследований) и медленный способ замораживания с помещением образца сразу на  $-80^{\circ}\text{C}$  [15]. Мы использовали первый способ (со скоростью охлаждения  $90^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ), поскольку с нашей точки зрения он обеспечивает большую гибкость при выборе температуры дальнейшего хранения:  $-196^{\circ}\text{C}$  при необходимости длительного хранения, например в криобанке, или перенос на  $-80^{\circ}\text{C}$ . Хранение в низкотемпературном морозильнике обычно более удобно для последующего медицинского применения.

Какие недостатки можно выделить в предлагаемом методе консервации микробиоты? Фетальная сыворотка коров является достаточно дорогостоящим биоматериалом. В этой связи использование 100%-й сыворотки может снизить экономическую эффективность предлагаемого технического решения. Поэтому актуально рассмотреть использование криозащитных сред с уменьшенным содержанием сыворотки в целях экономии для криоконсервации микробиоты кишечника человека. В дальнейшем мы планируем оценить, насколько эффективность криоконсервации зависит от содержания сыворотки в среде замораживания.

Сроки хранения материала в жидком азоте в проведенных нами экспериментах находились в интервале от двух до семи суток. Поскольку конечной целью исследования является решение проблемы долговременной консервации микробиоты, то для окончательного подтверждения полученных данных необходим анализ выживаемости бактериальных сообществ после длительных сроков хранения. В связи с этим в рамках работы были сделаны закладки кишечной микробиоты на долговременное хранение. Результаты данных экспериментов будут отражены в последующих публикациях.

## ВЫВОДЫ

Представлена концепция криоконсервации микробиоты кишечника человека, используемой для биомедицинских приложений, основанная на применении многокомпонентной криозащитной среды, призванной повысить надежность консервации различных представителей микробного сообщества. Показана высокая эффективность криозащиты двухкомпонентного состава, включающего фетальную сыворотку коров и 5% ДМСО, при криоконсервации бактериальных суспензий донорской микробиоты по протоколу

быстрого замораживания в жидком азоте при  $-196^{\circ}\text{C}$ .

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований 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. A. L. Kau, P. P. Ahern, W. N. Griffin, et al., *Nature* **474**, 327 (2011).
2. A. T. Vieira, M. M. Teixeira, and F. S. Martins, *Front. Immunol.* **4**, 445 (2013).
3. L. E. Botero, L. Delgado-Serrano, M. L. Hernandez, et al., *Acta Biol. Colomb.* **21** (1), 5 (2016). DOI: 10.15446/abc.v21n1.49761
4. E. B. M. Daliri, C. N. Tango, B. H. Lee, and D. H. Oh, *Int. J. Med. Microbiol.* **308**, 487 (2018).
5. D. P. Bojanova and S. R. Bordenstein, *PLoS Biol.* **14**, e1002503 (2016).
6. E. M. Terveer, Y. H. van Beurden, A. Goorhuis, et al., *Microbiology and Infection* **23**, 924 (2017).
7. J. Suez, N. Zmora, G. Zilberman-Schapira, U. Mor, et al., *Cell* **174**, 1406 (2018).
8. E. I. Ermolenko, A. N. Suvorov, V. I. Simanenkova, et al., Patent No RUS 2460778 (2010).
9. A. Barzegari, N. Saedi, and A. A. Saei, *Future Microbiol.* **9** (5), 639 (2014).
10. O. Plakash, Y. Nimonkar, and Y. S. Shouche, *FEMS Microbiol. Lett.* **339**, 1 (2013).
11. A. V. Chaplin, A. G. Brzhozovsky, T. V. Parfenova, et al., *Actual. Microbiol.* **70**, 56 (2015).
12. H. T. Meryman, *Transfusion* **47**, 935 (2007).
13. D. Smith and M. Ryan, *Sci. World J.* ID 805659, 9 (2012). DOI: 10.1100/2012/805659
14. Z. Hubalek, *Cryobiology* **46**, 205 (2003).
15. D. V. Smirnova, L. V. Zalomova, A. V. Zagainova, et al., *Int. J. Med. Microbiol.* **309**, 259 (2019).
16. A. L. Bryukhanov and A. I. Netrusov, *J. Appl. Biochem. Microbiol.* **42**, 177 (2006).
17. L. Bircher, A. Geirnaert, F. Hammes, et al., *Microb. Biotechnol.* **11** (1), 163 (2018). DOI: 10.1111/1751-7915.13265
18. A. Criste, M. Giuburuncă, O. Negrea, et al., *Animal Sci. and Biotechnol.* **47** (2), 73 (2014).
19. M. Hasan, A. E. R. Fayter, and M. I. Gibson, *Biomacromolecules* **19** (8), 3371 (2018). DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00660.
20. M. Abadias, N. Teixido, J. Usall, et al., *J. Food Protection* **64** (6), 856 (2001).
21. Л. В. Заломова, Д. А. Решетников, С. В. Уграицкая и др., *Биофизика* **65** (5), 1 (2020).
22. E. Müller-Schweinitzer and P. Ellis, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **345** (5), 594 (1992). DOI: 10.1007/BF00168954
23. S.-J. Ha, B.-G. Kim, Y.-A. Lee, et al., *PLoS One* **11** (8), e0161372 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0161372
24. X. Fu, B. Xu, J. Jiang, et al., *J. Clin. Proteomics* **17**, 15 (2020). DOI: 10.1186/s12014-020-09279-6
25. D. Pogozhykh, V. Prokopyuk, O. Pogozhykh, et al., *PLoS One* **10** (10), e0139834 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0139834
26. Y. Yuan, Y. Yang, Y. Tian, et al., *Sci. Rep.* **6**, 34476 (2016). DOI: 10.1038/srep34476
27. M. Verdanova, R. Pytlik, and M. Hubalek Kalbacova, *Biopreservation and Biobanking* **12**, 2 (2014). DOI: 10.1089/bio.2013.0078
28. R. Fujisawa, M. Mizuno, H. Katano, et al., *BMC Musculoskelet. Disord.* **20**, 316 (2019). DOI: 10.1186/s12891-019-2700-3
29. K. M. Preininger, M. Singh, and C. Xu, *Adv. Exp. Med. Biol.* **951**, 123 (2016). DOI: 10.1007/978-3-319-45457-3\_10
30. D. J. Stevenson, C. Morgan, E. Goldie, et al., *Cryobiology* **49** (2), 97 (2004). DOI: 10.1016/j.cryobiol.2004.05.006
31. A. Mitchell, K. A. Rivas, R. Smith, and A. E. Watts, *Stem Cell Res. Therapy* **6** (1), 231 (2015). DOI: 10.1186/s13287-015-0230-y
32. C. H. Escobar and O. Chaparro, *STEM Cells Translat. Med.* **5** (358), (2016). DOI: 10.5966/sctm.2015-0094
33. А. И. Негрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др., *Практикум по микробиологии* (Академия, М., 2005), сс. 103–104.
34. T. Nei, T. Araki, and T. Matsusaka, in *Freezing and Drying of Microorganisms*, Ed. by T. Nei (Tokyo: University of Tokyo Press, 1969).
35. N. Gaci, P. P. Chaudhary, W. Tottey, et al., *Microb. Ecol. Health and Disease* **28**, 1308070 (2017). DOI: 10.1080/16512235.2017.1308070
36. B. Graham, A. E. R. Fayter, J. E. Houston, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 17 (2018).

## **Fetal Serum in Combination with 5% Dimethyl Sulfoxide Effectively Protects the Human Gut Microbiota during Cryopreservation in Liquid Nitrogen**

**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*

Due to advances in medical technologies, the need for the development of methods for long-term human gut microbiota safe and efficient preservation that would retain species richness in microbial community and ensure quantitative parameters of the bacterial content of the microbiocenosis is paramount. In this study, we evaluated the effects of 5% and 10% solutions of dimethyl sulfoxide, glycerol, ethylene glycol, gelatin, polyethylene glycol, polyvinyl alcohol, fetal bovine serum, as well as fetal bovine serum in combination with 5% dimethyl sulfoxide on survival rates of human gut microbiota during cryopreservation in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ , storage up to 7 days). The highest survival rates of bacteria during cryopreservation were obtained with a cryoprotective agent mixture based on fetal bovine serum and 5% dimethyl sulfoxide: the LIVE/DEAD bacterial viability kit was applied, and the detection efficiency of viable cells was 81 to 87%, along with an intact microbiota index of 88–90%. The effectiveness of the selected cryoprotectant composition was also confirmed by the method of microbiological cultivation in experiments on the cryopreservation of individual strains that were common to the human gut microbiota.

*Keywords: cryopreservation, fluorescence analysis, fetal bovine serum, bacterial cultivation*