

Przegląd metod kriokonserwacji pod kątem techniki witrifikacyjnej

Anna Niwińska

z Katedry Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Niektóre arktyczne gatunki owadów i ciem znane są z tego, że ich larwy zamrożone w lodzie w temperaturze od -5 do nawet -40°C i niższych, przeżywiają zimę, aby na wiosnę kontynuować rozwój i przeobrazić się w postać dorosłą (1, 2). Inne zwierzęta, takie jak amerykańska żaba leśna (*Rana sylvatica*), przeżywiają parokrotne zamrożenie w temperaturach nawet poniżej -16°C bez uszkodzenia komórek pomimo że 1/3 całkowitej masy ich ciała stanowi wtedy lód (3).

Dzieje się to dzięki obecności w ich płynach ustrojowych krioprotektantów, przeważnie glicerolu, cukrów, białek, ale także

mocznika. Obniżają one punkt zamarzania i nie dopuszczają do tworzenia się kryształów lodu w komórkach i obkurczania błon komórkowych. Wszystko to zapobiega trwałym uszkodzeniom komórek, a co za tym idzie tkanek, które doprowadziłyby do śmierci zwierzęcia. Dokładnie ten sam mechanizm nauka wykorzystuje do własnych celów.

Historia naukowej kriokonserwacji zaczęła się w 1949 r. w Cambridge, kiedy doktorant Christopher Polge opublikował w brytyjskim czasopiśmie „Nature” artykuł o wpływie glicerolu na przeżywalność zamrożonych plemników drobiu

(4). Polge dowiódł, że raptownie zamrożone w -79°C (w zestalonym dwutlenku węgla) lub w -192 °C (w ciekłym powietrzu) utrzymane w 15% glicerolu plemniki po rozmrożeniu uzyskują pełną ruchliwość i zdolność do zapłodnienia komórki jajowej. Dalsze badania Polgego i wsp. (5) dowiodły skuteczności metody także dla nasienia innych kręgowców, takich jak królik, kawia domowa, koń, bydło czy człowiek. Ruchliwość plemników po rozmrożeniu jako marker ich kondycji została uznana za właściwy sposób oceny zachowania funkcji nasienia. Umożliwiło to usystematyzowanie dalszych badań, a te doprowadziły już w 1954 r. do narodzin pierwszej trójki dzieci powstałych z zapłodnienia komórek jajowych plemnikami, które wcześniej przeszły pełną kriokonserwację (6).

Nowe możliwości szybko zostały zaadaptowane do potrzeb rozwoju hodowli zwierząt. Zachowanie genów cennych osobników bydła i koni w postaci zamrożonego nasienia zmieniło politykę hodowlaną i ułatwiło utrwalanie pożądaných cech

An overview of cryopreservation methods in the context of vitrification technique

Niwińska A., Department of Physiological Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

This article aims at the presentation of vitrification – a modern method of cryopreservation. Cryopreservation is widely used for maintaining the viability of cells, tissues, organs or any biological material and is applied in many fields of biological, veterinary and medical sciences. There are two main methods of cryopreservation: slow programmable freezing and vitrification. Vitrification uses high cryoprotectant concentration to prevent the crystallisation of ice and the material solidifies as an amorphous glass, so the need to find a compromise between solution effects injury and intracellular ice formation is eliminated. However, the concentrations of cryoprotectant required are very high so are potentially, and often actually, harmful to cells. Vitrification is becoming increasingly appreciated form of cryopreservation due to its ease and speed however, there are many uncertainties as to its use in human medicine. Cryopreservation is also fraught with many technological obstacles, which main issues are: the speed of freezing, the thawing speed and appropriate concentrations of cryoprotectants.

Keywords: cryopreservation, cryoprotectants, vitrification, freezing.

u potomstwa. Dzisiaj praktycznie wszystkie hodowane przemysłowo krowy zapładniane są metodą inseminacji nasieniem, które było kriokonserwowane. Medycyna także wykorzystwała postęp nauki, rozwijając metody wspomaganego rozrodu i zakładając banki ludzkiej spermy. Odkrycie przechowywania męskich komórek gametycznych to dopiero połowa sukcesu. Zaraz po niebanalnym odkryciu Christophera Polgego naukowcy badali i rozwijali także metody przechowywania innych komórek rozrodczych, takich jak oocyty i komórki embrionalne, a także możliwość zakonserwowania całych tkanek zwierzęcych i ludzkich. To właśnie w tym kierunku rozwija się nauka o zamrażaniu życia, którą w 1964 r. oficjalnie nazwano kriobiologią (8).

Zamrażanie

W przeciwieństwie do wspomnianych wcześniej komórek owadów czy płazów, komórki ssaków przystosowane są do prawidłowego funkcjonowania w wąskim zakresie temperatur. W zależności od gatunku zwierzęcia i umiejscowienia komórki spektrum tolerancji obejmuje zakres między 34 a 42°C. Mimo że krótka ekspozycja na niższe temperatury może być niegroźna,

to przetrzymywanie komórek przez dłuższy czas w temperaturach bliskich zera i poniżej bezwzględnie je zabija.

Pierwszym krytycznym momentem są temperatury od +15°C do -5°C. Dłuższe przebywanie komórki w takiej temperaturze bądź powolne jej schładzanie powoduje szereg uszkodzeń znanych jako uszkodzenia wywołane schłodzeniem (chilling injury). Uszkodzenia te są niejednorodne i głównie są wynikiem zmian właściwości błon białkowo-lipidowych. Lipidy w zależności od zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych tężeją szybciej lub wolniej, w związku z czym błona komórkowa traci integralność i zmienia przepuszczalność. Dowiedzono także negatywnego wpływu niskich temperatur na strukturę wrzeciona kariokinetycznego, co jest szczególnie ważne w przypadku kriokonserwacji oocytów. Nie wszystkie komórki jednak są wrażliwe na efekty uszkodzenia wywołanego schłodzeniem, za to wszystkie podatne są na uszkodzenia w wyniku mrożenia (9).

Kiedy komórka ulega zamrażaniu, zawarta w niej woda krystalizuje w lód. W efekcie, z powodu dążenia do wyrównania ciśnienia osmotycznego, substancje rozpuszczone w cytozolu ulegają co raz to większemu stężeniu, doprowadzając do odwodnienia organelli. Zmienia się także przepuszczalność błon lipidowych, co ma kluczowe znaczenie dla integralności komórki. Uszkodzenia spowodowane stresem osmotycznym, przepuszczalnością błon i zniekształceniami cytoskieletu destabilizują komórkę, a fizyczne uszkodzenia powstałe przy tworzeniu się kryształków lodu wewnątrz ostatecznie doprowadzają komórkę do śmierci. Żeby uchronić komórkę przed uszkodzeniami naturalnymi dla procesu zamrażania, potrzebna jest zmiana dwóch kluczowych elementów – właściwości płynu komórkowego i czasu na zmianę, a co za tym idzie na uszkodzenia.

Krioprotektanty – zmiana właściwości płynu komórkowego

Najważniejszym elementem komórki, niezbędnym do jej funkcjonowania, a także przenikającym każdy jej element, jest woda. Ona też pierwsza ulega zmianom pod wpływem temperatury, a zmiana jej stosunku w różnych kompartmentach komórki powoduje stres osmotyczny. Dlatego też rola krioprotektantów jest kluczowa.

Krioprotektanty dzielą się na przenikające przez błony komórkowe oraz pozostające poza obrębem komórki. Pierwsze z nich to substancje penetrujące, takie jak glicerol, glikol etylenowy czy dimetylosulfotlenek (DMSO), są to niskocząsteczkowe

substancje organiczne o niskim punkcie zamarzania i dużej lepkości. Ich obecność w komórce podczas zamarzania powoduje przekształcenie się płynu komórkowego z formy płynnej w postać szklistą bez wytworzenia kryształów. Ten mechanizm nazwany został nityfikacją. Zapobiega on destrukcji struktur komórkowych na tle powstawania dużych kryształów lodu. Drugi rodzaj krioprotektantów to substancje nieprzenikające błon komórkowych. Duże cząsteczki cukrów, takich jak glukoza, sacharoza, sorbitol czy disacharydy, zwiększają ciśnienie osmotyczne płynu komórkowego, co prowadzi do wypływania wody z komórki na zewnątrz. Prowadzi to do kontrolowanej dehydratacji, a zatem zmniejszenia się ilości wody mogącej skryształizować w lód w obrębie błon komórki. Obecność krioprotektantów niepenetrujących pozwala także na zmniejszenie stężenia krioprotektantu penetrującego.

Mieszanina krioprotekcyjna w zależności od typu protokołu zawiera zwykle mieszaninę obu rodzajów krioprotektantów oraz buforów pH stanowiących właściwe środowisko dla danego typu komórek, a także makromolekuły białkowe o pozytywnym wpływie na zwiększanie lepkości cieczy i zachowanie równowagi zamrożonej komórki. Warianty mieszanin i stężenia substancji zależą od typu komórek i etapu ich rozwoju, ale przede wszystkim od typu procedury krioprezerwacyjnej: powolnego zamrażania lub kriokonserwacji.

Niska temperatura – zatrzymanie czasu

Innymi zagrożeniami dla komórki zaraz po krystalizacji lodu wewnątrz jej struktur jest stres osmotyczny i wspomniane uszkodzenie wywołane schłodzeniem. Pierwsze, czyli zbyt duża koncentracja substancji osmotycznie czynnych, prowadzi do chemicznego braku równowagi niezbędnego do prawidłowego funkcjonowania komórki. Drugie to dezintegracja i zmiana właściwości błon komórkowych spowodowana zastyganiem ich części lipidowej w niskich temperaturach (+15°C do -5°C). Przenikanie substancji przez błony komórkowe jest spowodowane ruchem cząsteczek, a ten możliwy jest tylko przy odpowiedniej temperaturze. Równanie Arrheniusa opisuje proporcjonalność zwalniania tempa reakcji chemicznych do zmniejszania się temperatury, w której zachodzą te reakcje. Zatrzymanie czasu polega więc na obniżeniu temperatury do -130°C, momentu, w którym wszystkie molekuly zamiast poruszać się tkwią w miejscu, wibrując zawieszona w szklistej formacji. Temperatura ta nie pozwala im się poruszać, a jedne połączenia między nimi stanowią słabe, ale zrównoważone wiązania wodorowe (9).

Woda jest płynem o małej lepkości i wysokim punkcie zamarzania. Aby osiągnęła stan zwitryfikowania, czyli formy szklistej, potrzebuje bardzo specyficznych warunków ciśnienia i temperatury. Problemem jest prędkość zamarzania. Zastosowanie krioprotektantów obniża punkt zamarzania cieczy wewnątrzkomórkowej i zwiększa jej lepkość, co ułatwia stworzenie szklistej, lepkiej formacji bez wytwarzania kryształów lodu. Jednak duże stężenie krioprotektantów wiąże się z toksycznym wpływem na komórkę, więc niezbędne jest zwiększenie prędkości zamarzania, aby pozostawić cząsteczkom jak najmniej czasu na ruch, zanim zostaną uwięzione w zeszkolonej materii.

Powszechnie stosowaną substancją, która umożliwia prędkie zamrażanie komórek, jest ciekły azot LN₂. Substancja ta przechowywana w termostatacznych naczyniach w stanie ciekłym zachowuje temperaturę poniżej -196°C. Temperatura zachowana w stanie ciekłym (LN₂) jest odpowiednia do przeprowadzenia procesu wityfikacji, niemniej do uzyskania pożądanego efektów niezbędne jest spełnienie właściwych warunków, które umożliwią jak najszybszą penetrację zamrażania w głąb komórki.

Pamiętać trzeba o tym, że w momencie kontaktu komórki zwierzęcej z ciekłym azotem różnica temperatur wynosi około 232°C. Powoduje to gwałtowne zwiększenie się temperatury cieczy, a w wyniku tego wrzenie, podczas którego wydzielany jest azot w formie gazowej. Na powierzchni komórki powstaje warstwa gazu oddzielająca ją od zimnej cieczy, co ogranicza transfer temperatury i w efekcie zmniejsza prędkość zamrażania. Mechanizm ten zależy głównie od objętości komórki i medium, w którym jest zawieszona. Naturalnie więc jest zmniejszanie tej objętości, aby przyspieszyć proces wityfikacji. Pożądaną objętością kropli zawiesiny z komórką jest objętość mniejsza od 1 µl.

Drugim elementem mogącym ograniczać przenikanie temperatury jest nośnik użyty w protokole. Nośniki wityfikacyjne różnią się między sobą konstrukcją i materiałem. Ważne jest przewodnictwo cieplne nośnika, które powinno być jak najlepsze. Producenci prześcigają się w tworzeniu nowych konstrukcji nośników: łopatek, słomek, cewek i siateczek. Zostało przeprowadzone wiele badań porównujących efektywność każdego nośnika w stosunku do różnych typów zamrażanych komórek (10).

Ważnym i krytycznym momentem dla zamrażanej komórki jest jej proces rozmrażania. Badania pokazują, że jest on nawet bardziej znaczący od samego procesu mrożenia.

W czasie rozmrażania komórka musi przejść proces rehydratacji, nabrać

odpowiedniego dla niej kształtu i składu płynu komórkowego, pozbywając się ze swojego wnętrza krioprotektantu. Słowem – wrócić do stanu sprzed zatrzymania czasu. Tak jak w przypadku wityfikacji, proces musi odbyć się wystarczająco szybko, aby struktury komórkowe nie zdążyły zostać zdewastowane przez temperatury najbardziej krytyczne, powodujące uszkodzenia wywołane schłodzeniem, jednocześnie musi trwać na tyle długo, aby komórka w pełni mogła nabrać stanu osmotycznej równowagi niezbędnego do dalszego rozwoju (8).

Przy spełnieniu wszystkich powyższych warunków przeżywalność zamrożonych komórek przekracza 90%.

Toksyczność krioprotektantów

Kluczem do sukcesu wityfikacji jest szybkość i intensywność, w przeciwieństwie do protokołów powolnego zamrażania, które polegają na stopniowym obniżaniu temperatury i małym stężeniu krioprotektantów. Protokół powolnego zamrażania polega na obniżaniu temperatury stopniowo, średnio z prędkością 1°C/min, aż do temperatury -80°C. Dopiero po osiągnięciu tej temperatury próbka ulega zanurzeniu w roztworze ciekłego azotu. Istnieje także protokół tak zwanego „przerwanego powolnego zamrażania” (interrupted slow cooling), które polega na powolnym obniżaniu temperatury tylko do -35°C, a następnie także przyspieszenie reakcji poprzez włożenie do ciekłego azotu -196°C (7).

Medium krioprotekcyjne, w którym zanurzona jest komórka poddana stopniowemu ochładzaniu, nie przekracza zwykle 5–7% stężenia krioprotektantów. Nieduże stężenie tych substancji oznacza mniejszą ingerencję w naturalny skład chemiczny komórki, a co za tym idzie: mniejszą możliwość uszkodzeń chemicznych. Za toksyczny wpływ krioprotektantów na komórki odpowiada głównie szok osmotyczny. Każdy krioprotektant został uznany za potencjalnie szkodliwy, jednak za najmniej szkodliwy uznaje się glicerol, jako substancję naturalnie krioprotekcyjną sprawdzoną w naturze. Niektóre substancje używane w mieszankach jako dodatek krioprotekcyjny (crioprotective additive – CPA) są uważane za łagodzące przebieg wymiany substancji z medium do komórki, a co za tym idzie za zmniejszające toksyczność krioprotektantów.

Standardowe mieszanki krioprotekcyjne używane do protokołu powolnego zamrażania zawierają więc w sobie kombinację różnych substancji krioprotekcyjnych o niskim stężeniu wraz z dodatkami utrzymującymi stabilne pH i poprawiającymi dehydratację, a także łagodzącymi przebieg mrożenia.

W wityfikacji, czyli metodzie raptownego zamrażania, zasada metody jest inna i potrzebuje bardziej specyficznych rozwiązań.

Komórka poddawana wityfikacji przebywa nie w jednym medium krioprotekcyjnym, a wielu, o zwiększającym się stężeniu krioprotektantów od kilku (5–8%) do kilkudziesięciu (50%) procent. Zasada ta nosi nazwę ekwilibryzacji komórki. Mimo, że badania *in vitro* wskazują na znacznie większą przeżywalność komórek po 4-, 8- lub 16-stopniowej ekwilibryzacji, zwykle stosuje się ekwilibryzację 3-stopniową. Argumentem za skróconym protokołem może być dążenie do uproszczenia metody, a także zmniejszenie czasu narażenia preparatu na krioprotektanty we wrażliwym dla niego przedziale temperatur (11).

W wityfikacji także nie ma optymalnej mieszanki wityfikacyjnej. Dla każdego rodzaju komórki mieszanki się różnią, jednak zastosowanie wielokrotnych badań pozwoliło na wyselekcjonowanie roztworów najbardziej odpowiednich dla różnych typów komórek. Na przykład dla zarodków bydłowych najwyższy odsetek, blisko 90% zarodków rozwijających się *in vitro*, stwierdzono po wityfikacji w mieszaninie glikolu etylenowego, fikolu i sacharozy (EFS).

Niemniej metoda wityfikacji budzi obiektywnie co do jej bezpieczeństwa właśnie ze względu na niezbędne wysokie stężenia toksycznych krioprotektantów. Przeprowadzono wiele badań na temat szkodliwego działania krioprotektantów, jednak głównie polegały one na przedłużonej ekspozycji komórki na te substancje w temperaturze pokojowej. Uszkodzenia komórek zwykle były natury osmotycznej. Badania z lat 90. wykazały także niejasną zależność między narażeniem wysokimi stężeniami DMSO w medium wityfikacyjnym a wysokimi stratami prawidłowo rozwijających się zarodków w fazie poimplantacyjnej. W innych badaniach z narażeniem na krioprotektanty wiązano także rozpad chromosomów, zwiększone występowanie aneuploidii i inne chromosomalne nieprawidłowości, a także rozwój zniekształconych płodów z komórki wcześniej uznanej za rozwijającą się prawidłowo (7). Te oraz inne badania o niejasnych wynikach zmniejszyły zainteresowanie wityfikacją jako metodą kriokonserwacji i nadal pozostawiają wiele pytań i niepokoju związanego z tym typem zamrażania komórek.

Typy i stadia wityfikowanych komórek

Mimo wątpliwości podniesionych w latach 90., które na jakiś czas zahamowały rozwój wityfikacji jako metody efektywnego zamrażania komórek rozrodczych

obecnie dyskutuje się o możliwości wyparcia technik powolnego zamrażania poprzez techniki witrifikacyjne. Witrifikacja staje się powszechną metodą konserwacji zygot, a także dalszych faz rozwoju embrionu, takich jak blastocysta. Co ciekawe, jeśli chodzi o zamrażanie męskich komórek rozrodczych i plemników zwierząt witrifikacja nie została uznana za bardziej efektywną niż metody powolnego zamrażania. Pomimo braku uniwersalności witrifikacja jest obiecującą metodą do zamrażania najdelikatniejszych i najtrudniejszych w przechowywaniu komórek rozrodczych – oocytów.

Oocyty wykazują większą wrażliwość na zjawisko uszkodzenia wywołanego schłodzeniem oraz formowanie się kryształków lodu wewnątrz komórki niż komórki embrionalne. Uznaje się, że specyficzna budowa błon komórkowych oocytu wykazuje większą przepuszczalność dla krioprotektantów, a zarazem większą podatność na dezintegrację w trakcie powolnego ochładzania. Wykazano także u nich zjawisko obrzęku osmotycznego, czyli obrzmianie komórek w wyniku nieprawidłowej wymiany osmotycznej po rozmrożeniu. Obrzęk ten może doprowadzić do pęknięcia zewnętrznych błon komórkowych oocytu i w efekcie śmierć rozmrożonej komórki (11). Specyfika techniki witrifikacyjnej: omijanie krytycznych wartości temperatury i raptowne zamrażanie, okazała się mieć pozytywne efekty na kriokonserwację oocytów i w rezultacie metoda ta została uznana za odpowiednią dla komórek tego typu. Nie znaleziono jednak uniwersalnej

metody konserwacji oocytów, gdyż wykazano różnicę w przeżywalności zależną od gatunku, rasy czy nawet kariotypu. Przyszłe badania być może pozwolą na stworzenie najbardziej odpowiednich rozwiązań, które mogłyby zostać wykorzystane przez współczesną medycynę (12).

Podsumowanie

Rzeczony kriobiologii przeszedł długą drogę od przełomowego 1949 r. do dzisiaj. Metody kriokonserwacji pozwalają naukowcom na „zatrzymanie czasu” dla różnych typów komórek w celu zachowania materiału genetycznego lub szeroko rozumianych badań embriologicznych. Długotrwałe badania nad specyfiką uszkodzeń powodowanych mrożeniem oraz zrozumienie mechanizmów zachodzących w komórce poddawanej tego typu stresorom pozwala na ulepszenie protokołów powolnego zamrażania i witrifikacji. Każda z metod ma swoje zastosowanie, jednakże specyfika witrifikacji pozwala na skrócenie czasu potrzebnego do procesu zamrażania, a także na uproszczenie techniki mrożenia komórek poprzez zastąpienie drogich chłodziarek kriokonserwacyjnych zestawem nośników i kontenerem ciekłego azotu. Mimo braku uniwersalnego protokołu kriokonserwacyjnego witrifikacja jest techniką bardzo obiecującą, szybko rozwijającą się i efektywną.

Być może dalsze badania pozwolą na stworzenie właściwych protokołów mogących mieć zastosowanie w konserwacji komórek rozrodczych na wszystkich

etapach rozwoju bez szkody dla ich kondycji, co byłoby bardzo pożądane ze względu na rozwój medycyny rodzinnej i technik hodowlanych.

Piśmiennictwo

1. Brown C.L., Bale J.S., Walters K.F.A.: Freezing induces a loss of freeze tolerance in an overwintering insect. *The Royal Society* 2004, **271**, 1507–1511.
2. Danks H.V.: Seasonal Adaptations in Arctic Insects. *Integr. Comp. Biol.* 2004, **44**, 85–94.
3. Layne J.R. Jr, Lee R.E. Jr: Freeze tolerance and the dynamics of ice formation in wood frogs (*Rana sylvatica*) from southern Ohio. *Can. J. Zool.* 1987, **65**, 2062–2065.
4. Polge C., Smith A., Parkers A.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949, **666**, 164(4172).
5. Polge C., Rowson L. E. A.: Fertilizing Capacity of Bull Spermatozoa after Freezing at -79°C . *Nature* 1953, **169**, 626–627.
6. Swanson K.W.: The Birth of the Sperm Bank. *The Annals of Iowa* 2012, **71**, 241–276.
7. Gook D.A.: History of oocyte cryopreservation. *Reproductive BioMedicine Online* 2011, **23**, 281–289.
8. Leibo S.P., Thomas B.: The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. *Fertil. Steril.* 2011, **96**, 269–276.
9. Cordeiro R.M., Stirling S., Fahy G.M., de Magalhães J.P.: Insights on cryoprotectant toxicity from gene expression profiling of endothelial cells exposed to ethylene glycol. *Cryobiology*, 2015, Epub 2015 Oct 22.
10. Orief Y., Schultze-Mosgau A., Dafapoulos K., Al-Hasani S.: Vitrification: will it replace the conventional gamete cryopreservation techniques? *Middle East Fert. Soc. J.* 2005, **10**, 171–182.
11. Gajda B., Rajsa I.: Aktualny stan i możliwości kriokonserwacji zarodków i oocytów zwierząt gospodarskich. *Rocz. Nauk. Pol. Tow. Zootech.*, 2014, **10**, 89–111
12. Keros V., Fuller B.J.: Cryopreservation of Mammalian Oocytes. *Cryopreservation and Freeze – Drying Protocols* 2014, **3**, 304–319.
13. Benson J.D.: Modeling and Optimization of Cryopreservation. *Cryopreservation and Freeze – Drying Protocols* 2014, **3**, 83–136.