

Kryobiologie v laboratoři

Šebek J.

Do vědní disciplíny označované jako kryobiologie, jejímž předmětem zkoumání je účinek nízkých teplot na biologické systémy, spadá i problematika lyofilizace, kryokonzervace buněk potažmo tkání. Vychází z jednoznačného funkčního vztahu, kdy snižování teploty indukuje v přímé úměrnosti pokles metabolických pochodů v živé hmotě. Při úplné stagnaci jakýkoliv molekulárních struktur pak docílíme dokonalého zakonzervování. Nezávisle na sobě přibližně od roku 1950 problematiku studovali James Ephraim Lovelock i John Christopher Polge. Zjistili příčinu poškození buněk vlivem nízkých teplot pod bodem mrazu a úskalí následně překonali. Díky chemickým látkám, které obecně označujeme jako kryoprotektiva (v případě lyofilizace lyoprotektiva), se podařilo na buněčných modelech minimalizovat poškození vlivem mrazu. Prokázali tak, že je možné kryoprezervovat buňky a současně jim po ukončení stáže zachovat viabilitu. Díky jejich úsilí byla na začátku šedesátých let minulého století kryobiologie vědeckou veřejností přijata.

Během kryostáze biologický materiál běžně uskladňujeme při teplotách alespoň -80°C . Pokud chladícím médiem bude kapalný dusík, konečná teplota dosáhne až -196°C . Tekuté hélium využíváme sporadicky.

Poškození buněk mrazem

Hlavní úskalí zamrazování buněk eventuálně tkání o velikosti několika milimetrů tkví v tom, že intracelulární i extracelulární voda při teplotách pod bodem mrazu vytváří mikrokrystaly, které rostou z tzv. nukleačních center a zvětšují svůj objem. Hexagonální led má navíc tendenci rekrystalizovat za vzniku větších útvarů. Protože krystaly narušují integritu fosfolipidových membrán, poškozují buněčné kompartmenty. Vznik mikrokrystalů vede i ke zvýšené koncentraci minerálů, jež při změně skupenského stavu vody z ledu vypadávají do prozatím nezmrzlé kapaliny. Pokud zpracováváme buněčnou suspenzi, potýkáme se i s faktem, že postupně narůstající mikrokrystaly vytlačují buňky do prozatím nezmrzlé kapaliny, kde se nakupí. Označujeme to termínem cell packing effect.

V případě pomalého zamrazování se zmiňované mikrokrystaly utvářejí přednostně v extracelulárním prostředí s typickým uspořádáním, což označujeme jako dendritickou krystalovou deformaci. Od místa chlazení kapalinou postupně prorůstají podlouhlé

relativně velké krystaly, mezi nimiž jsou dendritické kanály. Zde se buňky v průběhu kryoprezervace soustředí, ale pod vlivem hyperosmolární kapaliny ztrácejí vodu a srašťují se, dokud zbylá voda nezmrzne (obr. 1). Bohužel opačný postup, kdy zvolíme rychle navození kryostáze, problém neřeší. Mikrokrystaly v tomto případě vnikají především intracelulárně. Sice dosahují menší velikosti, nicméně mají tendenci rekrystalizovat ve větší útvary. Hyperosmolalita pak nastává uvnitř buněk (obr.2). Výsledkem je rozvrat nitrobuněčného pH a paradoxní zrychlení metabolismu, protože ztráta vody zvyšuje koncentraci látek participujících na biochemických reakcích. Následně se zvyšuje influx vody do intracelulárního prostředí do doby, než buňka nebo okolní tekutina kompletně zmrazne. Stres na celulární struktury indukovaný ledovými krystaly bohužel nedokáže vyřešit ani metoda lyofilizace, která je založena na principu sublimace. V případě buněk ji můžeme uplatnit jen při kryoprezervaci prokaryot. Podstata sublimace vychází z fyzikálněchemických vlastností vody, kdy zmrazení v materiálu indukuje vznik ledových krystalů a následné snížení tlaku navodí sublimaci vody z pevného skupenství na plynné. Mnohem více se lyofilizace osvědčila pro dlouhodobou konzervaci biologického materiálu na úrovni molekul, jež vykazují termolabilní charakter. Proto se od roku 1930 začala používat ve větší míře, aby bylo možné stabilizovat některá antibiotika například beta-laktamová pro parenterální aplikaci.

Kryoprotektiva

Výše popsané technologické postupy pomalého i rychlého zamrazení včetně lyofilizace, které vyvolávají vznik ledových krystalů, buňky mechanicky během poškozují kryoprezervace a posléze znemožňují jejich přežití po vrácení teploty do fyziologického normálu. K potlačení tohoto problému používáme tzv. kryoprotektiva ve zkratce CPA z anglického termínu cryoprotective agent, jež se vyznačují nižším bodem tuhnutí. Poněvadž nahrazují část intracelulární vody a stávají se také součástí mimobuněčného prostředí, redukují mikrokrystaly vyrůstající z nukleačních center. Dále brání osmotickému stresu nebo posunu pH. Podle mechanismu účinku rozeznáváme ochranná média penetrující a nepenetrující. Kryoprotektiva penetrující neboli intracelulární pronikají díky své nízké molekulové hmotnosti po koncentračním gradientu do buněk, kde nahrazují vodu. Nejpoužívanějším je ethylenglykol a dimethylsulfoxid (DMSO), přičemž velmi účinná bývá jejich kombinace v poměru 1:1. Nevýhodou je toxicita, což platí především u dimethylsulfoxidu. Proto volíme takový postup práce, aby expozice buněk nebyla zbytečně

zdlouhavá. Kryoprotektiva nepenetrující zůstávají v extracelulárním prostředí, což koresponduje s faktem, že jsou minimálně cytotoxická. Mají vyšší molekulovou hmotnost a sacharidový základ jim propůjčuje osmotickou aktivitu, která napomáhá vytahovat vodu z buněk. Příkladem nepenetrujících protektiv mohou být sacharóza, trechalóza, dextran. Nejúčinnější je však hydroxyethylový škrob.

Četné studie poukazují na prospěšnost kombinovaných médií, které obsahují penetrující i nepenetrující složku. Intracelulárním kryoprotektivům sice připisujeme zásadní význam, nicméně mohou poškodovat buňky. Proto ke snížení jejich negativního dopadu používáme například hydroxyethylenový škrob. Augmentační působení nepenetrujících látek, tak napomáhá snižovat toxicitu ethylenglykolu nebo dimethylsulfoxidu. K dalším doplňkům kryomédia náleží purifikované bílkoviny ve smyslu albuminu eventuelně oligopeptidů a pufovací látky. Často se kombinuje fosfátový pufr s tzv. HEPES, který má chemický název N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonová kyselina). Chemicky se jedná o organickou molekulu. Vhodně zvolené kryoméidium s postupem chlazení nám zvyšuje úspěšnost zamrazování. Můžeme dosáhnout viability buněk, která činí 80 až 90 % z původní buněčné populace. Uvedené číslo životaschopných buněk je nejvíce ovlivněno teplotním přechodem z -20°C na -40°C, což pokládáme za nejkritičtější fázi úvodu do kryostáze.

Metody kryoprezervace

Během kontrolovaného mrazení, jež pokládáme za nejšetrnější postup, teplota klesá pozvolna přibližně v řádu jednoho stupně celsia za minutu. Celková doba úvodu do kryostáze by ve většině případů měla trvat 80 až 100 minut. Buňky nejvíce poškozuje efekt krystalizace vody, kdy led v médiu zvění narušuje buněčné struktury, a následný vzestup osmolality z nich nadměrně vytahuje vodu do extracelulárního prostředí. Proto nepenetrující protektiva sehrávají důležitější roli než u rychlého mrazení. Navíc se zde výrazněji uplatňuje cell packing effect. Existuje mnoho osvědčených protokolů řízeného zamrazování zvolených dle typu buněk, přičemž se vzájemně liší časovou náročností i rychlostí poklesu teplot. Ovšem je nutné použít speciální programovatelné mrazící boxy s regulací, jejichž chladicí kapalinou bývá kapalný dusík.

Pro rychlé mrazení častěji používáme termín vitrifikace, při níž buněčnou suspenzi přibližně o chladničkové teplotě vystavíme účinku tekutého

dusíku. Zprudka poklesne teplota až na -196°C podle typu použitého chladicího média. Kryoméidium při uvedených fyzikálních podmínkách podléhá právě vitrifikaci. Při ní se nevytváří klasický krystalický led, ale mraz extrémně zvýší viskozitu a médium zesklivatí. Nevznikají tak krystaly, které by zvění poškozovaly buněčný povrch. Z pohledu poškození buněk se nejvíce uplatňuje efekt roztoku, protože intracelulárně vzniká velké množství mikrokystalů, což doprovází nerovnováha v osmolalitě. Proces na přijatelnou úroveň potlačíme, když oproti kontrolovanému mrazení použijeme vyšší koncentrace kryoprotektivních látek přesněji řečeno těch penetrujících. Pro vitrifikaci jsou vhodné buňky, které neobsahují větší množství vody.

Rekonstituce buněk

Po ukončení kryoprezervace rozmrazujeme buňky rychle v řádu několika minut. Účelem není jen obnovení fyziologické teploty, ale i náhrada penetrujícího kryoprotektiva jakožto toxické látky zpět za vodu, a to co nejrychleji. Po vyjmutí z chladicího média se biologický materiál podrobí ohřevu v lázni při 37°C. Jakmile rozmrzne, buňky je zapotřebí přemístit do kultivačního média eventuelně izotonického roztoku s fosfátovým pufrem a HEPES. Nastane diluce kryoprotektiv a jejich vyplavení z intracelulárního prostředí. Aby buňky nebyly osmoticky poškozeny, měl by objem vyměněného protektiva za vodu probíhat rovnoměrně.

Literatura

1. BROCKBANK, Kelvin, James COVAULT a Michael TAYLOR. Cryopreservation guide. USA: Thermo Fisher Scientific Inc., 2007, 24 s. ISBN -; PF-LECS-CRYOGUIDE-0707. Dostupné z: www.thermo.com/cold
2. DAY, John a Glyn STACEY. Cryopreservation and freeze-Drying protocols. 2. vyd. New Jersey: Humana Press Inc., 2007, 347 s. ISBN 978-1-58829-377-0.
3. RYAN, John. General guide for cryogenically storing animal cell cultures: Technical bulletin. USA: Corning Inc., 2004, 9 s. Life science. ISBN -; 3/04-TC-306. Dostupné z: www.corning.com/lifescience
4. THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. Thermo scientific nalgene and nunc cryopreservation guide. USA: Thermo Fisher Scientific Inc., 2009, 9 s. ISBN -; BRLSPCRYOPRES-1209. Dostupné z: www.thermo.com/cold