

STRESZCZENIE

Krioprezewacja to metoda zabezpieczania i przechowywania materiału biologicznego (komórek, tkanek czy fragmentów organów) w niskich temperaturach, najczęściej w temperaturze par ciekłego azotu lub ciekłego azotu (LN) (ok. $-195,8^{\circ}\text{C}$). Gwarantuje ona długoterminowe przechowywanie materiału biologicznego z zachowaniem jego żywotności i stabilności genetycznej. Podwalinami technik krioprezewacji stały się badania naukowe z końca XIX wieku prowadzone na materiale roślinnym, natomiast rozwój badań nad krioprezewacją przypadł na połowę XX wieku, gdy z powodzeniem zastosowano krioprotektanty. W poniższym artykule omówiono: tło historyczne odkryć związanych z krioprezewacją komórek, podstawy naukowe towarzyszących jej procesów, rodzaje krioprotektantów oraz praktyczne aspekty krioprezewacji przydatne w rutynowej praktyce laboratoryjnej, na przykładzie krioprezewacji komórek ssaczy. Omówiono także pokrótce zalety wykorzystania technik krioprezewacji materiału biologicznego w badaniach naukowych, hodowli zwierząt i roślin oraz medycynie i praktyce klinicznej.

WPROWADZENIE

Przystosowanie się do niekorzystnych warunków środowiska, w tym ujemnych temperatur, jest zjawiskiem towarzyszącym organizmom żywym od wieków. By uchronić się przed niekorzystnymi warunkami środowiska zwierzęta, dzięki zdolności przemieszczania się, mogą się ukryć, zapaść w sen zimowy lub spowolnić swój metabolizm. Rośliny natomiast nie posiadają takiej możliwości. Jednak to właśnie obserwacja świata roślin i ich wieloletnie badania pozwoliły odpowiedzieć na pytanie w jaki sposób organizmy żywe radzą sobie z niskimi temperaturami. Kriokonserwacja i marzenia o nieśmiertelności od lat intrygowały ludzkość. Pierwsze doniesienia dotyczące obserwacji skutków przechowywania plemników w śniegu pochodzą z 1776 roku (L. Spallanzani). W 1866 roku J. Mantegazza jako pierwszy zasugerował niewyobrażalną dotąd wizję, iż „człowiek umierający na polu bitwy może splotić następcę prawnego z zamrożonego i przechowywanego w domu nasienia”. Podwalinami technik krioprezewacji stały się jednak badania na materiale roślinnym. W roku 1897 Hans Molisch stwierdził w roślinach istnienie endogennych substancji aktywowanych niskimi temperaturami. W 1907 roku B. Lidforss wykazał, że tymi związkami są cukry, natomiast B. J. Luyet i P. M. Gehenio w 1938 roku skutecznie zamrozili tkanki mchów [1,2]. W tym samym roku B. J. Luyet i E. L. Hodapp przeprowadzili udaną krioprezewację plemników żaby. Pierwsze, wówczas jeszcze nieskuteczne, doniesienia o laboratoryjnym zamrażaniu ludzkiej spermy pochodzą z lat 30-tych ubiegłego stulecia [3].

W 1949 roku w czasopiśmie *Nature* ukazał się drukiem artykuł „Odrodzenie plemników po zeszkleniu i odwodnieniu w niskich temperaturach” (oryg. *Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures*), podsumowujący pionierskie badania naukowców z Narodowego Instytutu Badań Medycznych w Mill Hill w Londynie, który zrewolucjonizował badania nad krioprezewacją [4]. W artykule przedstawiono wyniki badań nad mrożeniem nasienia ptactwa domowego w obecności glicerolu, glikolu etylenowego i propylenowego tak, aby po rozmrożeniu było ono zdolne do efektywnego zapłodnienia jaj. Późniejsze użycie dimetylosulfotlenku (DMSO) zrewolucjonizowało współczesną kriobiologię [5-7]. Tak rozpoczęła się era kriokonserwacji, bez której dzisiaj trudno sobie wyobrazić pracę laboratoriów biologii komórki, współczesną hodowlę zwierząt, czy też rozwój współczesnej medycyny.

ODKRYCIA NAUKOWE RODZĄ SIĘ Z UWĄŻNEJ OBSERWACJI PRZYRODY

Wiele odkryć naukowych bywa dziełem przypadku. Penicylina, viagra, dynamit, teflon, stal nierdzewna, promienie Roentgena, a nawet szampan czy Coca-Cola to tylko niektóre z powszechnie znanych przypadkowych odkryć. Jed-

dr Dawid Wnuk✉

Zakład Biologii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

https://doi.org/10.18388/pb.2021_461

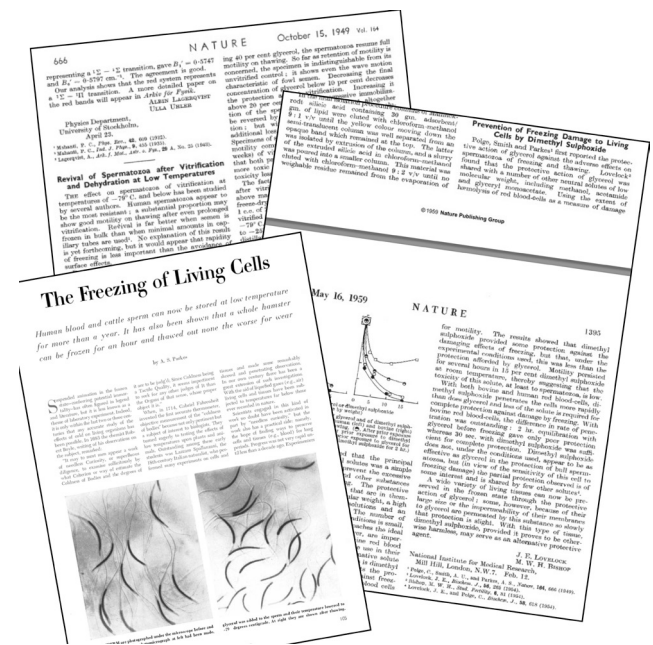
✉ autor korespondujący: dawid.wnuk@uj.edu.pl

Słowa kluczowe: biobank, krioprezewacja, krioprotektanty, hodowle komórkowe *in vitro*

Wykaz stosowanych skrótów: ART (ang. *assisted reproductive technology*) – technika wspomaganego rozrodu; DMSO (ang. *dimethylsulfoxide*) – dimetylosulfotlenek; FBS (ang. *fetal bovine serum*) – płodowa surowica bydłęca; FMD (ang. *formamide*) – formamid; IUI (ang. *intrauterine insemination*) – inseminacja domaciczna, LN (ang. *liquid nitrogen*) – ciekły azot; PEG (ang. *polyethylene glycol*) – glikol polietylenowy; PLL (ang. *poly-L-lisyme*) – poli-L-lizyna; PVP (ang. *polyvinylpyrrolidone*) – poliwinylpirolidon

Podziękowania: Koszty publikacji sfinansowano ze środków statutowych Zakładu Biologii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Szczególne podziękowania dla dr Mileny Paw za konsultację merytoryczną tekstu. Rycina 3, 7 oraz streszczenie graficzne zostały przygotowane z wykorzystaniem programu BioRender.com.

nak nic nie dzieje się bez przyczyny. Uważa obserwacja przyrody przez naukowców oraz rzetelnie zaplanowane i przeprowadzone badania pozwalają na wiele odkryć naukowych, które następnie powszechnie służą człowiekowi. Był rok 1948, kiedy 22-letni Chris Polge podjął pracę w laboratorium profesora Sir Alana Sterlinga Parkesa na Wydziale Biologii Eksperymentalnej w Narodowym Instytucie Badań Medycznych (NIMR) w Mill Hill w Londynie pod bezpośrednią opieką dr Audrey Smith. Prof. A. S. Parkes potrzebował osoby zainteresowanej opracowaniem metod sztucznej inseminacji drobiu, a także do pracy nad metodami przechowywania pozyskanego nasienia. C. Polge zapoznał się z technikami, które mogły mieć zastosowanie w chłodzeniu i ogrzewaniu zawiesin nasienia tak, aby plemniki zachowywały żywotność. Po licznych próbach C. Polge i dr A. Smith zdecydowali się na wykorzystanie roztworów cukru - lewulozy. Zauważono, że ma ona działanie ochronne na plemniki podczas zamrażania. Główny problem stanowiło jednak rozmrażanie nasienia, które prowadziło do uszkodzenia komórek, będącego źródłem dalszych niepowodzeń. Ruchliwość plemników była co prawda zachowana, ale w wyniku sztucznego zapłodnienia nie uzyskiwano płodnych jaj. Sposób w jaki glicerol okazał się odpowiednim krioprotektantem stał się źródłem wielu barwnych anegdot, jednak C. Polge pozostawił pisemny zapis dokładnych okoliczności, które są dość proste. Po wielokrotnych, nieudanych próbach wykorzystania lewulozy prace zawieszono na kilka miesięcy, a pozostały roztwór cukru pozostawiono w lodówce w laboratoriach NIMR w Hampstead. Po wznowieniu badań w laboratorium rolniczym instytutu w Mill Hill, przywieziono z Hampstead butelkę starego roztworu, a gdy użyto go ze świeżo pobranymi plemnikami drobiu, zaobserwowano znaczną poprawę przeżywalności plemników. Poza zaskakująco wysoką żywotnością plemników po inseminacji drobiu udało się uzyskać nawet kilka piskląt. Początkowo zakładano, że odmienny wynik eksperymentów można wytłumaczyć innymi metodami przechowywania plemników po ich pobraniu, jednak kolejne eksperymenty z użyciem świeżo przygotowanych roztworów lewulozy i świeżo pobranego nasienia zawsze kończyły się niepowodzeniem. Dlatego prof. A. S. Parkes nalegał na przeprowadzenie analizy chemicznej oryginalnego roztworu wykorzystanego do krioprezerwacji nasienia (pozostało go już tylko 10 ml), w którym wykryto znaczne stężenie glicerolu. Jak się później okazało, etykiety na butelkach z odczynnikami w lodówce zostały przypadkowo zamienione. Użyty roztwór okazał się mieszaniną glicerolu i białka jaja kurzego, powszechnie stosowaną do naklejania skrawków histologicznych na szkiełka mikroskopowe. C. Polge i dr A. Smith testowali następnie wpływ różnych stężeń glicerolu w pożywce. Gdy plemniki drobiu zawieszono w 15% roztworze glicerolu okazało się, że prawie wszystkie komórki przeżywały zamrażanie i rozmrażanie [8]. Warto wspomnieć, że prof. A. S. Parkes wyznaczył dr. J. E. Lovelocka (który przeżył 103 lata i zmarł niedawno 26.07.2022), do pracy nad biofizycznymi skutkami zamrażania i rozmrażania, który w szczegółowych badaniach prowadzonych wspólnie z C. Polge miał wyjaśnić, na czym polegało ochronne działanie glicerolu [9]. Nad ochronną rolę glicerolu w niskich temperaturach pracował wcześniej, w 1946 roku, także Jean Rostand, który odkrył ochronną rolę glicerolu przed uszko-



Rycina 1. Pierwsze artykuły naukowe traktujące o technikach skutecznej krioprezerwacji komórek.

dzeniami spowodowanymi zamarzaniem w eksperymentach na plemnikach żab. Ponieważ jego prace publikowane były w języku francuskim, pozostały niezauważone [10]. Dopiero artykuł naukowy autorstwa C. Polge'a, A. Smith oraz A. S. Parkes'a w czasopiśmie Nature (Ryc. 1) [4] zapoczątkował badania nad krioprezerwacją, a sami autorzy zostali uznani za pionierów krioprezerwacji. Ich fotografie przedstawia Ryc. 2. Późniejsze odkrycia J. E. Lovelocka i wsp. w aspekcie ochronnych właściwości dimetylosulfotlenku podczas mrożenia komórek [7], zapoczątkowały erę kriobiologii, która nieustannie rozwija się aż do dnia dzisiejszego.

PO CO ZAMRAŻAĆ KOMÓRKI?

Jedną z rutynowych metod laboratoryjnych stosowanych we współczesnej biologii jest długotrwałe przechowywanie żywych komórek w obniżonej temperaturze. Metoda ta jest szczególnie przydatna dla zabezpieczenia wyselekcjonowanych linii komórkowych, o często unikalnych właściwościach, przed wypadkami losowymi (zakażenia w hodowli, awarie sprzętu). Linie komórkowe w hodowlach *in vitro* są podatne na zmienność genetyczną i fenotypową, wynikającą z: presji selekcyjnej w hodowli, starzenia się komórek nieuniemniertelnych linii komórkowych oraz niestabilności genetycznej i fenotypowej. Metody krioprezerwacji



Rycina 2. Pionierzy technik krioprezerwacji komórek.

zabezpieczają komórki przed utratą ich unikalnych właściwości (np. specyficznych markerów powierzchniowych i unikalnych zdolności komórek do różnicowania itp.). Przechowywanie komórek w biobankach pozwala również na przerwanie pracy z danym rodzajem komórek na dowolny czas, co znacząco redukuje koszty prowadzenia hodowli komórkowych, zarówno materialne, czasowe jak i osobowe.

Krioprezervację komórek powszechnie wykorzystuje się nie tylko w badaniach *in vitro* do zabezpieczenia hodowli komórek do dalszych badań. Technika ta znalazła swoje nieocenione zastosowanie w praktyce hodowli zwierząt [11,12]. Zachowanie unikalnych cech genetycznych bydła, koni, owiec w praktyce hodowlanej stało się rzeczywistością już nie tylko poprzez wykorzystanie metod doboru naturalnego i odpowiedniego krzyżowania ze sobą najlepiej dostosowanych osobników. Możliwość krioprezervacji nasienia jest obecnie powszechnie wykorzystywana w praktyce weterynaryjnej. Szacuje się, że większość hodowanych przemysłowo zwierząt jest rozmnażana poprzez inseminację nasieniem, zabezpieczanym i przechowywanym w kriobankach [12]. Pozwala to na ochronę nie tylko zagrożonych gatunków, ale także na zachowanie nasienia cennych osobników na wypadek epidemii i ich śmierci. W Polsce, w roku 2014 w Instytucie Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w podkrakowskich Balicach utworzono Krajowy Bank Materiałów Biologicznych (KBMB), który przechowuje w ciekłym azocie (LN) materiał biologiczny (zarodki, nasienie, oocyty) od ras bydła objętych Programem Ochrony Zasobów Genetycznych oraz zwierząt o wybitnych cechach produkcyjnych i hodowlanych. Przechowuje on obecnie 42500 porcji kriokonserwowanego nasienia bydła, 67 kriokonserwowanych zarodków bydlęcych oraz 387 kriokonserwowanych zarodków świń (dane pochodzą ze strony internetowej Krajowego Banku Materiałów Biologicznych: <https://kbmb.izoo.krakow.pl/>).

O wielu zaletach stosowania krioprezervacji wykorzystywanej w technikach rozrodu zwierząt pisała już w 1961 roku jedna z pionerek i odkrywczyni tej technologii dr A. Smith: „*Rolnicy mogli (teraz) wybierać nasienie buhajów, które wcześniej mogły nie być dostępne, gdy były potrzebne. Cenne nasienie nie było już marnowane, a nasienie buhajów o niepewnej wartości mogło być przechowywane przez kilka lat, dopóki ich potomstwo nie dojrzało i nie zostało przebadane pod kątem wydajności mlecznej i innych cech. Inną potencjalną zaletą tej metody było to, że w czasie epidemii takich infekcji jak pryszczycza, istniała rezerwa wcześniej pobranego nasienia, które można było wykorzystać do czasu, aż minie niebezpieczeństwo zarażenia. Przechowywanie nasienia w niskich temperaturach pozwoliłoby na ograniczenie liczby buhajów wykorzystywanych do rozrodu w obrębie jednego kraju. Ponadto pojawiła się możliwość ożywionego międzynarodowego handlu zamrożonym nasieniem w celu poprawy stanu pogłotnia na całym świecie*” [13].

Kriokonserwacja służy także zabezpieczeniu komórek i tkanek roślinnych. Mimo, iż badania nad krioprezervacją rozpoczęto od tkanek roślinnych, naukowcy nie potrafili wprowadzać tkanek roślinnych do LN. Powodem jest specyficzna budowa komórek roślinnych, które są nie tylko różnej wielkości, ale posiadają duże i liczne wakuole. Co więcej, komórki roślinne otoczone są sztywną ścianą

komórkową, która stanowi poważną barierę dla krioprotektantów, ograniczając tempo ich penetracji do wnętrza komórek. Sukces w zakresie krioprezervacji roślin w LN odniesiono dla embriogenicznej zawiesziny marchwi w roku 1971 [1]. Dopiero lata 90. XX wieku, wraz z opisaniem „nowych technik krioprezervacji” przyniosły sukces w mrożeniu tkanek roślinnych. Bazując na procesie wityfikacji, techniki: 1/ wityfikacji, 2/ kapsułkowania – dehydratacji, 3/ kapsułkowania – wityfikacji, 4/ kropli, otworzyły drogę do masowego opracowywania protokołów gromadzenia tkanek roślinnych w LN [1,2]. Badania nad krioprezervacją organizmów roślinnych rozpoczęto, rzecz jasna, od kultur komórkowych, jednak współczesne zaawansowane techniki pozwalają na ochronę wielu zagrożonych i cennych gatunków, stanowiąc poniekąd zabezpieczenie przed postępującą, globalną utratą bioróżnorodności. Zainteresowanych krioprezervacją komórek i tkanek roślinnych odsyłam do znakomitego opracowania: *Plant Cryopreservation: A Practical Guide* pod redakcją naukową Barbary M. Reed [14] oraz polskojęzycznych opracowań prof. Anny Mikuły i współpracowników [1,2].

Również medycyna wykorzystuje powszechnie krioprezervację do przechowywania nie tylko gamet (ludzkiej spermy oraz komórek jajowych) [2,15–17], ale również krwi pępowinowej, krwinek czerwonych [18,19], komórek macierzystych [19–21], a nawet tkanek, organów [22,23] i ludzkiego ciała. Według danych europejskiego programu monitorowania *in vitro* (ang. *European In vitro fertilization Monitoring; EIM*) w samej tylko Polsce w latach: 2013–2016 przeprowadzono łącznie 106 718 cykli leczenia z zastosowaniem technik wspomaganego rozrodu (ang. *assisted reproductive technology; ART*) oraz zarejestrowano 51 405 zabiegów inseminacji domacicznej (ang. *intrauterine insemination; IUI*), podczas których powszechnie wykorzystuje się nasienie przechowywane za pomocą technik krioprezervacji [24].

Metody krioprezervacji z powodzeniem sprawdzają się zarówno w badaniach naukowych (do zabezpieczenia cennego materiału badawczego), jak i w praktyce klinicznej (bankowanie krwi pępowinowej, komórek macierzystych, komórek wykorzystywanych w terapiach opartych o hodowane *in vitro* komórki itp. [21,25,26]). Marzenia człowieka o nieśmiertelności i wiara w konserwację ciała po śmierci w taki sposób, aby gdy nauka się rozwinie, można było spróbować wskrzeszać ludzi, stały się celem współczesnej kriobiologii.

KRIOPREZERWACJA W PRAKTYCE LABORATORYJNEJ HODOWLI KOMÓREK *IN VITRO*

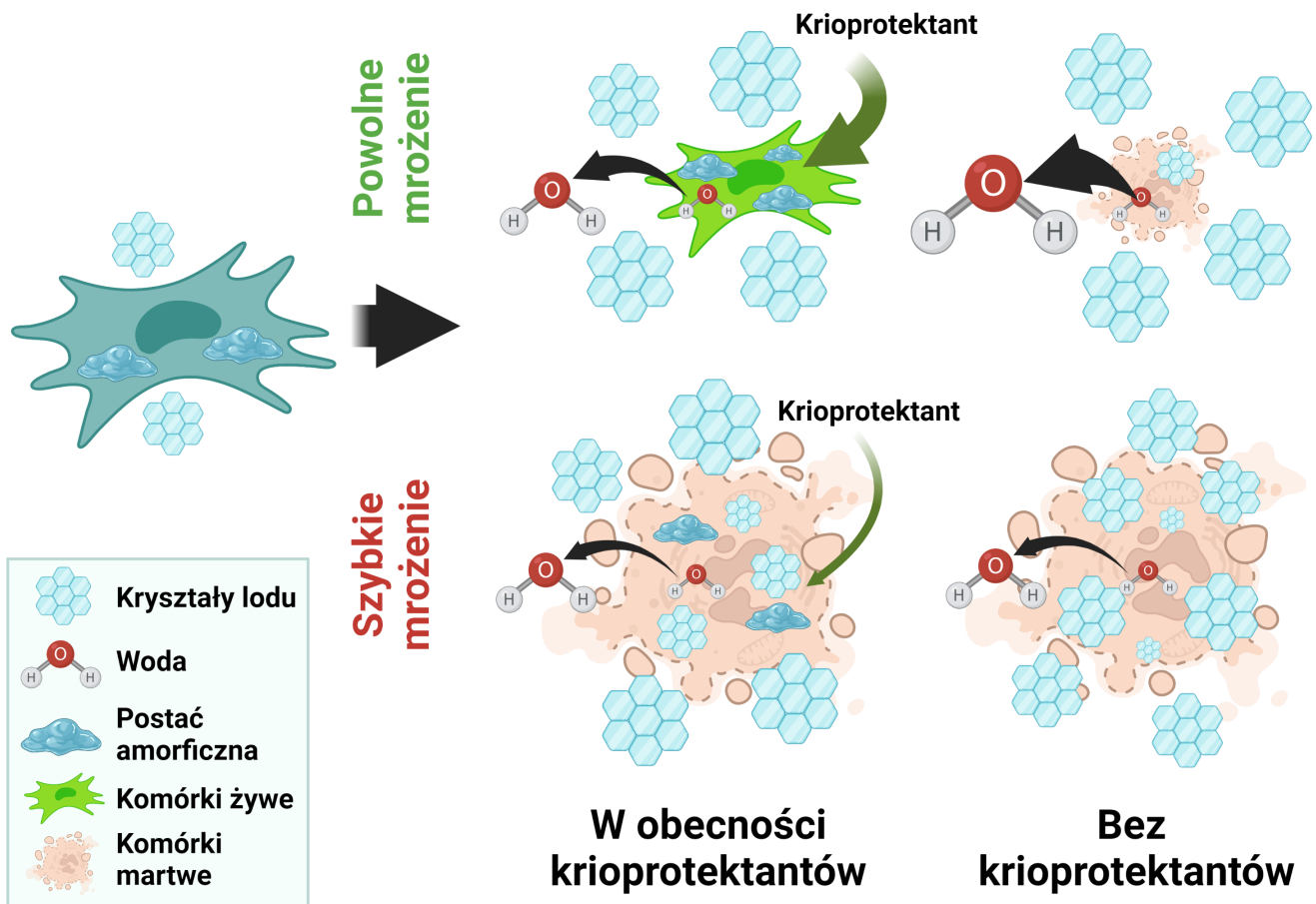
PODSTAWOWE PROCESY FIZYKOCHEMICZNE TOWARZYSZĄCE KRIOPREZERWACJI KOMÓREK

Woda jest podstawowym składnikiem wszystkich żywych komórek. To dzięki niej w komórkach zachodzi wiele złożonych procesów biochemicznych, bez których nie byłoby życia. Woda podczas schładzania do temperatury 0°C nie przechodzi w całości do stanu stałego, a frakcja wody niezamarzniętej poniżej 0°C występuje powszechnie, co związane jest z pojęciami heterogennej nukleacji i przechłodzenia, które zostały starannie omówione w artykule Huberta Harańczyka: *Rozważania o dwóji z fizyki, czyli jak zamarza woda*

[27]. Wbrew powszechnemu przekonaniu, wyzwaniem dla komórek podczas krioprezewacji nie jest wcale ich zdolność do przetrwania podczas przechowywania w niskiej temperaturze (poniżej -180°C), lecz do pokonania trudnego etapu osiągnięcia niskiej temperatury, a potem do tajania. Komórki są wystawione na wysoką śmiertelność pokonując dwukrotnie (podczas chłodzenia i ocieplania pośrednią strefę temperatur od -15°C do -60°C) [13,28]. Gdy komórki są schładzane do temperatury około -5°C , zarówno one, jak i otaczająca je pożywka hodowlana pozostają niezamrożone i przechłodzone. W przedziale temperatur między -5°C a około -15°C dochodzi do tworzenia lodu (spontanicznie lub w wyniku sztucznego wprowadzenia kryształów lodu do roztworu) w środowisku pozakomórkowym. Zawartość komórek pozostaje jednak niezamrożona i przechłodzona. Przechłodzona woda w komórkach ma, z definicji, większy potencjał chemiczny niż woda w częściowo zamrożonym roztworze zewnątrzkomórkowym. Woda wypływa więc osmotycznie z komórek i zamarza na zewnątrz komórek (Ryc. 3). W zależności od zastosowanego tempa mrożenia dochodzi do powstawania kryształów lodu na zewnątrz lub wewnątrz komórek, co prowadzi do szybkiej albo wolnej dehydratacji. Procesy te są kluczowe z punktu widzenia przeżywalności komórek i zostaną omówione w dalszej części artykułu.

Przez wiele lat naukowcy zastanawiali się w jaki sposób dochodzi do uszkodzeń komórek podczas mrożenia. Reakcje komórek na zamrażanie po raz pierwszy zostały wyrażone ilościowo przez Petera Mazura [29]. W 1969 roku Peter Mazur przewodniczył sympozjum „The Frozen Cell” w Londynie. Wzięło w nim udział imponujące międzynarodowe grono naukowców. Nawiazuując do prac A. Smith i J. E. Lovelocka – pionierów krioprezewacji z Narodowego Instytutu Badań Medycznych w Wielkiej Brytanii, P. Mazur powiedział na wstępie: „*Odkrycia Smith, Lovelocka i ich kolegów były tak przekonujące, że inni badacze skłonni byli przyjąć, że procedury zamrażania opracowane dla spermy są również optymalne dla wszystkich komórek i skłonni byli zakładać, że wyjaśnienie Lovelocka dotyczące uszkodzeń i ochrony podczas zamrażania ma zastosowanie dla wszystkich komórek. Główne pytanie, które chciałbym postawić do rozważenia, brzmi: do jakiego stopnia te założenia są słuszne?*” [30].

Podstawowym założeniem, o którym była mowa, było to, że zamrażanie uszkadza komórki ponieważ naraża je na stężenie elektrolitów powyżej krytycznej frakcji molowej (nadmierna dehydratacja), a rozmrażanie zawiesiny komórek powoduje rozcieńczenie elektrolitów w taki sposób, że komórka pęcznieje z uwagi na nadmierny napływ wody i ostatecznie pęka. P. Mazur podkreślił, że analiza J. E. Love-



Rycina 3. Procesy towarzyszące technice krioprezewacji komórek podczas szybkiego i wolnego zamrażania mieszaniny mrozeniowej z komórkami, bez lub w obecności krioprotektantów. Wyłącznie w przypadku powolnego mrożenia w obecności krioprotektantów, które stanowią wymiennik wody w komórce i zamarzają bez tworzenia struktury krystalicznej, zachowuje się wysoką żywotność komórek po rozmrożeniu. W przypadku powolnego mrożenia bez krioprotektantów następuje nadmierna dehydratacja i śmierć komórek. W przypadku szybkiego mrożenia w komórkach nie dochodzi do odpowiedniego stopnia dehydratacji i w ich wnętrzu powstaje zbyt duża ilość kryształów lodu, które uszkadzają struktury subkomórkowe powodując śmierć komórek. Przygotowano za pomocą: BioRender.com.

locka przypisuje większość uszkodzeń spowodowanych zamrażaniem jednej przyczynie, a nie jest to wynik tworzenia się lodu jako takiego. Kontynuował: „Niektórzy z nas uważają, że istnieją co najmniej dwa czynniki odpowiedzialne za uszkodzenia i że jednym z nich jest w rzeczywistości tworzenie się lodu wewnątrz komórki” [30].

Komórki są zatem narażone zarówno na uszkodzenia mechaniczne (poprzez tworzenie kryształów lodu) oraz chemiczne (poprzez wzrastające stężenie soli w wyniku odwodnienia – tzw. dehydratacji). P. Mazur sformułował dwuczynnikową hipotezę, która zakłada, że: 1/ przy wolnym tempie chłodzenia, uszkodzenie komórek zachodzi z powodu efektów roztworu, tj.: stężenia solutu/elektrolitu, silnego odwodnienia komórek i zmniejszenia niezamrożonej frakcji w przestrzeni zewnątrzkomórkowej; natomiast 2/ przy szybkim tempie chłodzenia, uszkodzenie komórek zachodzi z powodu śmiertelnego dla nich wewnątrzkomórkowego formowania kryształów lodu, model IIF (ang. *intracellular ice formation*) [28].

Nie sposób omówić w szczegółach procesów fizykochemicznych towarzyszących zamrażaniu komórek, a także różnych teorii towarzyszących zamrażaniu komórek (m. in. modelu IIF i równań opisujących prawdopodobieństwo IIF jako funkcji szybkości chłodzenia, temperatury i charakterystyki kriobiologicznej danego typu komórki), które uzupełniają powyższe rozważania. Szczegóły wraz z opisem matematycznym i rysem historycznym omówiono w artykułach: *Stopping biological time. The freezing of living cells* autorstwa P. Mazura [31] oraz *Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells* autorstwa D. Gao oraz J. K. Critser [28], do których odsyłam wszystkich zainteresowanych.

TEMPERATURA I TEMPO MROŻENIA

Bazując na teorii P. Mazura oraz na faktach przytoczonych powyżej, można dojść do wniosku, że aby uzyskać maksymalny stopień przeżywalności komórek, należy zamrażać komórki stosunkowo wolno (w celu odpowiedniej dehydratacji i penetracji ich wnętrza przez krioprotektanty) i szybko je odmrażać (aby zapobiec ponownemu, szkodliwemu szybkiemu zamrażaniu).

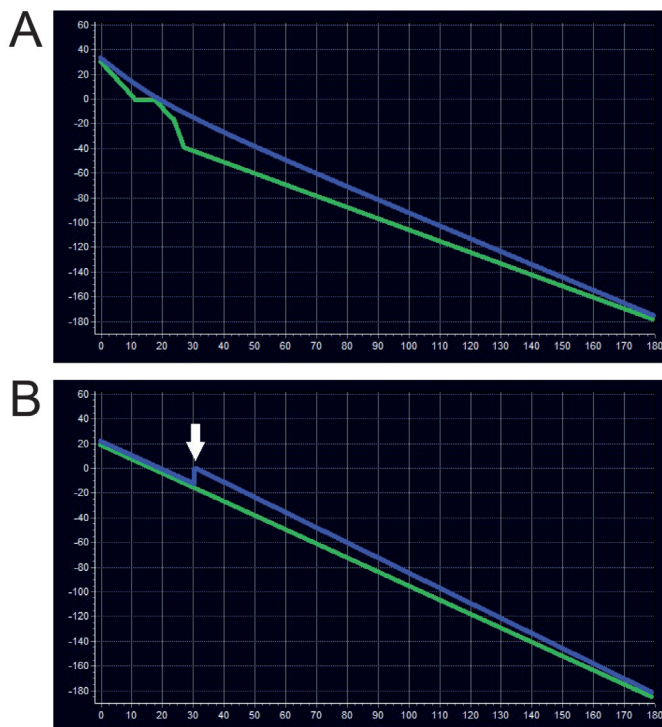
Zamrażanie nie może jednak być zbyt wolne, gdyż sytuacja taka sprzyja poważnym zmianom objętości komórek w wyniku przedłużającej się dehydratacji i długotrwałej ekspozycji na wysokie stężenia soli (składających się głównie z elektrolitów), które mogą powodować uszkodzenie komórek. P. Mazur i współpracownicy zauważyli, że stres hiperosmotyczny może powodować wyciek/przepływ elektrolitów, a powrót komórki do warunków izoosmotycznych (w procesie rozmrażania) powoduje pęcznienie komórek ponad ich normalną objętość izotoniczną i w konsekwencji prowadzi do przerwania ciągłości błon plazmatycznych [29,32]. J. E. Lovelock zaproponował w 1957 roku, że zwiększone stężenie płynu wewnątrzkomórkowego i nadmierne odwodnienie komórki wywierają szkodliwy wpływ na kompleksy lipidowo-białkowe błon komórkowych, osłabiając je i zwiększając straty lipidów i fosfolipidów. Komórka, podobnie jak w teorii P. Mazura, staje się więc przepuszczalna dla elektrolitów i podczas odmrażania pęcznieje, aż

w końcu pęka. J. Levitt (1962) zaproponował, że dehydratacja powoduje zmiany w strukturze i połączeniach pomiędzy białkami w komórkach, a proces rozmrażania działa destrukcyjnie na nowe połączenia, poprzez ich rozłożenie i denaturację. A. M. Karow Jr. i W. R. Webb (1965) wyjaśnili uszkodzenia spowodowane powolnym zamrażaniem jako konsekwencję przejścia wody związanej (usieciowanej) ze struktur subkomórkowych do kryształów lodu, co pozbawia białka wody usieciowanej (niezbędnej do zachowania integralności komórki np. gdy znajduje się ona w białkach błonowych) w ich strukturze i w konsekwencji może prowadzić do permeabilizacji błon w komórkach [28].

Podczas schładzania mieszaniny komórek z pożywką i krioprotektantem, której temperatura krzepnięcia jest dużo niższa niż 0°C, w zalecany tempie (1–2°C/min) dochodzi w pewnym momencie do powstania kryształów (krystalizacji) w tzw. punkcie eutektycznym (temperatura przy której wszystkie składniki roztworu ulegają zestaleniu). Granica przechłodzenia występuje w zakresie temperatur pomiędzy –20°C do –30°C, kiedy to obserwuje się krystalizację składników roztworów: wewnątrz i zewnątrzkomórkowego. Proces krystalizacji jest zawsze egzotermiczny (z wydzielaniem energii) stąd temperatura próbki nieco się podnosi, co jest dodatkowo szkodliwe dla komórek. Jednak przeprowadzając mrożenie komórek w zamrażarce programowanej można sterować dynamiką mrożenia indywidualnie dla zabezpieczanej linii komórkowej wykorzystując zoptymalizowane protokoły. Dodatkowo można zniwelować skoki temperatury spowodowane krystalizacją poprzez zwiększenie tempa schładzania w momencie osiągnięcia punktu eutektycznego. Temperatura przy zamrażaniu powinna być kontrolowana do osiągnięcia ok. –40°C, przed przeniesieniem komórek do niższych temperatur w celu ich długotrwałego przechowywania, aby zapewnić maksymalny odzysk komórek po rozmrożeniu. Przy spadku do temperatury ok. –40°C dehydratacja komórki jest wystarczająca, aby podczas dalszego zamrażania nie dochodziło już do wewnątrzkomórkowego powstawania kryształów lodu. Wyniki pozyskane z badań metodami różnicowej kalometrii skaningowej wskazują, że w obecności DMSO w zakresie temperatur pomiędzy –49°C a –59°C we wnętrzu komórek dochodzi do procesów zeszklenia (witryfikacji), które chronią komórkę przed dalszą dehydratacją oraz wewnątrzkomórkową krystalizacją. We wnętrzu komórek powstaje wówczas amorficzna substancja, której cząsteczki ułożone są w sposób chaotyczny, podobny do tego, spotykanego w cieczach. Zapobiega to formowaniu destrukcyjnych kryształów lodu i komórki przeżywają [33].

W przypadku szybkiego mrożenia zawiesiny komórek (powyżej 25°C/min) dehydratacja jest znacznie utrudniona, gdyż woda zamraża wewnątrzkomórkowo i zewnątrzkomórkowo uniemożliwiając wymianę roztworów, jednocześnie tworzą się duże kryształy lodu, które mogą uszkadzać organelle komórkowe, m.in. mitochondria i retikulum endoplazmatyczne [34] oraz lizosomy [35].

W praktyce do właściwego zamrożenia zawiesiny komórek w odpowiednim tempie stosuje się początkowe mrożenie programowane w zamrażarkach niskotemperaturowych. Zamrażarki te posiadają możliwość sterowania elek-



Rycina 4. Zamrażanie komórek za pomocą automatycznego systemu programowanego mrożenia. Wykresy przedstawiają porównanie typowego profilu temperatury w próbce podczas konwencjonalnego (wykres niebieski), wolnego zamrażania próbek w zależności od zastosowanego tempa chłodzenia (wykres zielony - odczyt temperatury z czujnika umieszczonego w komorze zamrażarki), które zostało odpowiednio (A) i nieodpowiednio dobrane (B). Białą strzałką oznaczono nagły wzrost temperatury próbki w punkcie eutektycznym, w momencie tworzenia kryształów lodu. Na Ryc. 4A przedstawiono odpowiednio dostosowane tempo schładzania tak, by temperatura w punkcie eutektycznym nie podnosiła się, gdyż jest to proces egzotermiczny. Oś X przedstawia czas schładzania [min], oś Y - temperaturę [°C].

tronicznego z poziomu programu komputerowego (Ryc. 4). W laboratoriach, które nie dysponują sprzętem do programowanego mrożenia stosuje się zamrażanie niekontrolowane elektronicznie w zapewniających odpowiedni spadek temperatury pudełkach mrożeniowych o odpowiedniej grubości ścianek, które umieszcza się w standardowych zamrażarkach niskotemperaturowych (-80°C). Próbki po zamrożeniu przenosi się do kriobanków, gdzie w tempera-

turze par LN lub w LN (poniżej temperatury -130°C , w której czas biologiczny ustaje) mogą być przechowywane długoterminowo. W układach wodnych w temperaturze LN (-196°C) nie zachodzą żadne reakcje termiczne, gdyż woda w stanie ciekłym nie istnieje poniżej -130°C . Jedyne stany fizyczne, które istnieją, to stany krystaliczne lub szkliste, w których lepkość roztworów jest tak wysoka, że dyfuzja cząstek jest nieznaczna w czasie krótszym niż geologiczny. Ponadto, w temperaturze -196°C energia cieplna układu jest niewystarczająca do zachodzenia reakcji chemicznych [30]. Schematyczny przebieg procesu zabezpieczania komórek z wykorzystaniem technik krioprezerwacji przedstawiono na Ryc. 7.

Krioprezerwacja jest ściśle związana z przechowywaniem materiału biologicznego w LN. Stało się to możliwe dzięki odkryciom polskich naukowców Zygmunta Wróblewskiego oraz Karola Olszewskiego, którzy niespełna 140 lat temu w laboratoriach Uniwersytetu Jagiellońskiego, 13 kwietnia 1883 roku, po raz pierwszy skroplili ten gaz. Istnieją także inne pierwiastki, które skraplają się w równie niskich temperaturach, np. tlen (-183°C), skroplony również przez w/w naukowców 8 dni wcześniej. Nie jest on jednak stosowany w krioprezerwacji, gdyż wykazuje wysoką reaktywność z substancjami organicznymi. Stosowanie tlenu przynosiłoby więc więcej szkody niż korzyści. Innym przykładem jest hel, który jest jednak pierwiastkiem rzadkim i występującym na Ziemi nie tak powszechnie jak azot czy tlen. Ponadto utrzymanie fazy ciekłej helu ($-268,9^{\circ}\text{C}$) i zabezpieczenie go przed wyparowaniem jest bardzo kosztowne. Ze względu na to, że ciekły azot zapewnia wystarczająco dobre warunki do długoterminowego przechowywania w niskiej temperaturze, jest powszechny i stosunkowo łatwy w magazynowaniu, naukowcy zaprzestali poszukiwania innych „mediów” służących krioprezerwacji materiału biologicznego.

Różne parametry i właściwości kriobiologiczne komórek są potrzebne do przewidzenia optymalnych warunków chłodzenia, aby zapobiec wewnątrzkomórkowemu formowaniu kryształów lodu. Ciągłe opracowywane są nowe modele fizyczne, które pozwalają przewidzieć prawdopodobieństwo wystąpienia tego zjawiska: np. model M. Tone-



Rycina 5. Automatyczny system do przechowywania próbek z odpowiednio zamrożonymi komórkami (banków komórkowych) w LN (1) oraz w parach LN (faza gazowa LN; 3-5). Aby zapewnić bezpieczeństwo pracy należy stosować odpowiedni strój (fartuch, rękawice, okulary/maski ochronne) oraz monitorować zawartość tlenu w powietrzu, gdyż parujący LN może wypierać tlen z powietrza. System przeznaczony do monitoringu stężenia tlenu przedstawia fotografia 2.

r'a i wsp. (1990, 1993) oraz K. Muldrew'a i L. E. McGann'a (1994). Opracowuje się także bardziej zaawansowane modele matematyczno-fizyczne w jednowymiarowych układach pseudotkankowych (D. Irimia & J. O. M. Karlsson, 2005) [36] oraz modele mogące zostać wykorzystane do prób mrożenia całych tkanek i organów (A. Arav, 2020) [22].

ZANIM ZACZNIESZ KRIOPREZERWACJĘ KOMÓREK...

Zabezpieczeniu technikami krioprezerwacji należy poddawać komórki z hodowli *in vitro* będące w dobrej kondycji (pod koniec fazy logarytmicznego wzrostu – konfluencja ok. 85–90%; bez zakażeń – najlepiej hodowla bez antybiotyków), gdyż pomimo najwyższej ostrożności i stosowania odpowiednich krioprotektantów, proces ten nie jest dla komórek obojętny i może mu towarzyszyć ich wzmożona śmiertelność. Warto także przeprowadzić dodatkowe badania mające na celu ocenę hodowanej linii komórkowej ze względu na parametry ważne w prowadzonych badaniach (dodatkowe testy aktywności proliferacyjnej, analiza izoenzymów, analiza potencjału do różnicowania, analiza charakterystycznych markerów itp.). W celu oceny kondycji komórek, zarówno przed krioprezerwacją, jak i po rozmrożeniu komórek, wskazana jest ocena ich żywotności przy użyciu wybranych testów. Zamrożone komórki najczęściej przechowywane są w LN lub parach LN. Sposób przechowywania zależy od konstrukcji pojemników na LN. System do przechowywania banków komórkowych w parach LN (faza gazowa) zaprojektowany w oparciu o pojemniki izotermiczne skonstruowane pierwotnie przez J. Dewara (popularnie zwane dewarami) przedstawia Ryc. 5.

Zamrażaniu komórek często towarzyszy nieodwracalne uszkodzenie będące wynikiem powstawania dużych kryształków lodu. Wiele gatunków owadów, płazów, ryb, a nawet gadów, stosuje naturalne metody krioprezerwacji (np. produkując naturalne krioprotektanty jak glicerol, sorbitol, glikol etylenowy, czy białka posiadające właściwości krioprotekcyjne) [27,41,42] do przetrwania trudnych warunków zimy lub do życia w ekstremalnie niskich temperaturach. Rośliny, zwłaszcza wieloletnie, które w swoim życiu narażone są na ujemne temperatury (np. rośliny klimatu umiarkowanego) produkują substancje ochronne takie jak: wieloalkohole (np. rybitol, mannitol, arabitol), cukry, prolinę, kwas absycynowy (ABA) [1,2].

KRIOPROTEKTANTY REDUKUJĄ USZKODZENIA KOMÓREK POWSTAŁE W WYNIKU ZAMRAŻANIA

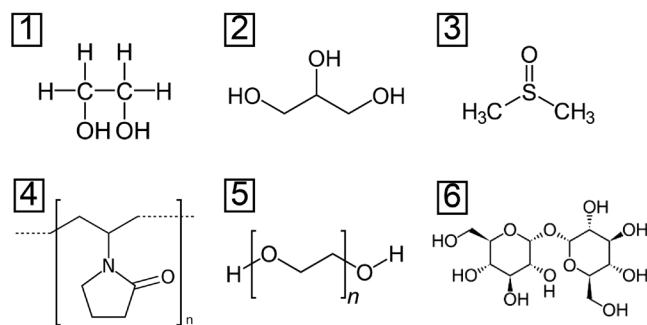
Zjawisku powstawania kryształów lodu w komórkach w dużym stopniu zapobiega zamrażanie w obecności krioprotektantów, najczęściej glicerolu lub DMSO. Pierwsze użycie DMSO w krioprotekcji komórek zostało opisane przez J. E. Lovelocka i M. W. H. Bishopa w roku 1954 z wykorzystaniem ludzkich i bydłych krwinek czerwonych oraz nasienia byków [7].

Powszechnie używanymi krioprotektantami są między innymi: glikol etylenowy (EG), glikol propylenowy (PG; 1,2-propanediol), DMSO, glicerol (GLY), formamid (FMD), metanol (METH) i butanediol (BD; 2,3-butanediol), mocznik, acetamid, N-metyloformamid, N,N-dimetyloforma-

mid, glikol dietylenowy, glikol trietylenowy, n-propanol, izopropanol, 1,3-propanediol, 2-metoksyetanol, 3-metoksy-1,2-propanediol, 2-metylo-2, 4-pentanediol (MPD) [37–39].

Krioprotektanty można podzielić na dwie grupy w zależności od możliwości ich przenikania przez nieuszkodzoną błonę komórkową, na: 1/ penetrujące – wymienione powyżej i 2/ niepenetrujące, np. alkohol poliwinylowy, poliglicerol, poliwinylpirolidon (PVP), glikol polietylenowy (PEG), sacharoza, trehaloza, ficoll. Krioprotektanty penetrujące są zdolne do przenikania przez nieuszkodzoną błonę komórkową do wnętrza komórek, gdzie stanowią swoisty „wymiennik wody” w komórce, a same zamarzając przechodzą w postać szklistą (amorficzną) bez tworzenia kryształów lodu mogącego uszkadzać komórki. Ponieważ lód łatwiej tworzy się zewnątrzkomórkowo niż wewnątrzkomórkowo, użycie niepenetrujących krioprotektantów zapobiega dodatkowo tworzeniu się zewnątrzkomórkowego lodu oraz ułatwia dehydratację komórki [40]. Wzory strukturalne kilku krioprotektantów penetrujących i niepenetrujących przedstawiono na Ryc. 6.

Wiele różnic w wynikach badań nad toksycznością krioprotektantów wynika z różnych warunków eksperymentalnych, takich jak: temperatura, stężenie krioprotektanta, czas ekspozycji na krioprotektant, roztwór nośnikowy krioprotektanta. Krioprotektanty mogą uszkadzać lub naruszać błony komórkowe, zaburzać funkcje enzymów, powodować zaburzenia w funkcjach mitochondriów i powodować uszkodzenia niektórych makrocząsteczek (białka, kwasy nukleinowe itp.). Należy jednak brać pod uwagę fakt, iż niektóre efekty uznawane za spowodowane toksycznością krioprotektantów mogą w rzeczywistości wynikać z szoku osmotycznego, czy też stresu oksydacyjnego oraz szoku cieplnego wywołanych samym procesem mrożenia [37]. Wiadomo, że niektóre mieszaniny krioprotektantów mogą być mniej toksyczne niż pojedynczo używane krioprotektanty. Dla przykładu użycie DMSO redukuje toksyczność FMD, a połączenie DMSO z glikolem propylenowym zwiększa przeżywalność niektórych typów komórek. Dodatek trehalozy, sacharozy, sorbitolu lub mannitolu do standardowych krioprotektantów może zmniejszać hemolizę (rozpad krwinek czerwonych i przechodzenie hemoglobiny do osocza). Częstym sposobem ograniczającym cytotoksyczność krioprotektantów jest używanie mieszaniny krioprotektantów penetrujących wraz z niepenetrującymi, przez



Rycina 6. Struktury chemiczne wybranych krioprotektantów penetrujących (1 – glikol etylenowy; 2 – glicerol; 3 – DMSO) oraz niepenetrujących (4 – PVP; 5 – PEG; 6 – trehaloza).

co możliwe jest zastosowanie niższych stężeń krioprotektantów penetrujących. Wiele szczegółowych informacji na temat toksyczności krioprotektantów, teorii toksyczności krioprotektantów i strategii jej zmniejszania można znaleźć w pracy przeglądowej B. P. Besta [37].

Jednym z najpowszechniej używanych krioprotektantów w biologii komórki jest DMSO (używany najczęściej w stężeniu 10–15%). To przejrzysta, bezbarwna ciecz, która krystalizuje w +18,5°C. DMSO jest higroskopijny oraz egzotermiczny po zmieszaniu z roztworami wodnymi. Dzięki swoim dobrym właściwościom solwatacyjnym znalazł zastosowanie jako rozpuszczalnik wielu substancji nierozpuszczalnych w wodzie. Z uwagi na łatwą penetrację przez błony biologiczne stosowany jest często jako nośnik do podawania leków. Swoje właściwości krioprotekcyjne zawdzięcza dobremu wiązaniu się z wodą i obniżaniu jej temperatury zamrażania ograniczając tworzenie kryształów lodu [5]. Jak wcześniej wspomniano DMSO, jak i pozostałe krioprotektanty wykazują pewną toksyczność wobec komórek, w zależności od użytego stężenia.

Zmniejszenie cytotoksyczności DMSO można uzyskać poprzez:

1. zmniejszenie stężenia DMSO w mieszaninie krioprotekcyjnej

Aby jednocześnie zachować właściwości krioprotekcyjne mieszaniny mrożeniowej często dodaje się do niej związków wysokocząsteczkowych np. surowicy bydlęcej (FBS), roztworów albuminy, hydroksyetylowanej skrobi (HES); cukrów: glukozy, dekstrozy, trehalozy, sacharozy; polimerów: PEG, PVP, PLL; białek powstrzymujących zamrażanie, a także prolinę lub ektoinę. W celu maksymalnej ochrony komórek można stosować także dodatki przeciwutleniaczy i środków przeciwapoptotycznych. Wykorzystując powyższe związki można zredukować stężenie DMSO nawet do 2% bez utraty wpływu krioprotekcyjnego mieszaniny mrożeniowej [5].

2. szybkie usunięcie DMSO ze środowiska (po rozmrożeniu komórek)

Stosuje się wiele metod usuwania DMSO np. wirowanie czy filtrację. Prosty sposób jest również jego duże rozcieńczenie np. za pomocą pożywki z surowicą (która z uwagi na wysoką zawartość białek posiada dodatkowe działanie ochronne).

3. zastąpienie DMSO innymi krioprotektantami

Doniesienia literaturowe wskazują także na liczne zastosowania białek posiadających właściwości krioprotekcyjne, tzw. „antifreeze proteins” (białek powstrzymujących zamrażanie). Należą do nich między innymi: AFGPs (ang. antifreeze glycoproteins) występujące między innymi u ryb antarktycznych z rodziny nototeniiowatych: trematomy lodowej (*Pseudotrematomus bernacchii*), antara polarnego (*Disostichus mawsoni*), dorsza grenlandzkiego (*Gadus ogac*), a także AFPI-III występujące zarówno u zwierząt (ryb: flądry zimowej – *Pleuronectes americanus*; węgorzyca amerykań-

skiej – *Zoarces americanus*; owadów: wyłogówki – *Choristoneura fumiferana*), jak i u roślin (np. żyta zwyczajnego – *Secale cereale*; marchwi zwyczajnej – *Daucus carota*; psianki słodkogórz – *Solanum dulcamara*; życicy trwałej – *Lolium perenne*) zabezpieczając je przed zamarzaniem. Wszelkie szczegóły, historię, strukturę, opis ewolucji tych białek można prześledzić w rozdziale 3. w książce: *Modern biopolimer science* [41]. Wiele ciekawych informacji na temat zastosowania białek powstrzymujących zamrażanie znajduje się również w artykule autorstwa A. Eskandari i wsp. [42].

4. obniżenie temperatury stosowania DMSO.

Stosowanie roztworu DMSO, lub roztworu witrifikacyjnego w skład którego wchodzi DMSO, w temperaturze ok. 0°C (zwykle na lodzie) pozwala w przypadku tkanek roślinnych na znaczące zredukowanie jego cytotoksyczności.

ZŁOTY STANDARD KRIOPREZERWACJI KOMÓREK Z HODOWLI IN VITRO

Nie sposób przedstawić doskonałego protokołu krioprezerwacji odpowiedniego w zastosowaniu do wszystkich typów komórek i tkanek. Przez lata naukowcy trudzą się ustaleniem zoptymalizowanych i zwalidowanych protokołów dostosowanych między innymi do typu komórek, ich wielkości, pochodzenia, podatności na uszkodzenia w procesie mrożenia i rozmrażania, tolerancji na obecność krioprotektantów itp. Doskonałym opracowaniem zawierającym kilkanaście szczegółowych protokołów krioprezerwacji wielu rodzajów komórek: od komórek układu rozrodczego przez komórki macierzyste po komórki krwi, jest opracowanie W. F. Wolkers'a oraz H. Oldenhof wydane przez Humana Press (serii: Springer Protocols): *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* [40]. Protokoły krioprezerwacji komórek układu rozrodczego znajdziemy także w opracowaniu: *Cryopreservation of Mammalian Gametes and Embryos* wydawnictwa Humana Press (serii: Springer Protocols) pod redakcją: P. Z. Nagy'ego, A. C. Varghese'a oraz A. Agarwala [43].

W przypadku materiału roślinnego, zaawansowane techniki krioprezerwacji oparte na procesie witrifikacji pozwoliły na wprowadzanie do LN komórek, tkanek, a nawet fragmentów organów roślinnych. Techniki te umożliwiają krioprezerwację bez względu na klimatyczne pochodzenie roślin, a także ich tolerancję na niskie temperatury, czy dehydratację. Jednakże, podobnie jak w przypadku komórek zwierzęcych, nie powstała do tej pory jedna uniwersalna procedura krioprezerwacji tej grupy organizmów. Warto zwrócić uwagę, że powstałe na świecie banki tkanek i komórek roślinnych specjalizują się bardzo często w kriozabezpieczaniu wyłącznie określonej grupy roślin, np. w Katolickim Uniwersytecie Leuven w Belgii gromadzone są odmiany bananowców: *Musa balbisiana* i *M. acuminata* oraz *Ensete spp.* utrzymywane od połowy lat osiemdziesiątych w kolekcjach polowych w Hondurasie, Nigerii, Burundi, Guadeloupe i Costa Rica. W Limie w Peru utworzono bank ziemniaka, a w Międzynarodowym Kriobanku Genów w Skierniewicach gromadzi się różne odmiany czosnków. Naukowcom łatwiej bowiem dopracować procedurę kriopre-

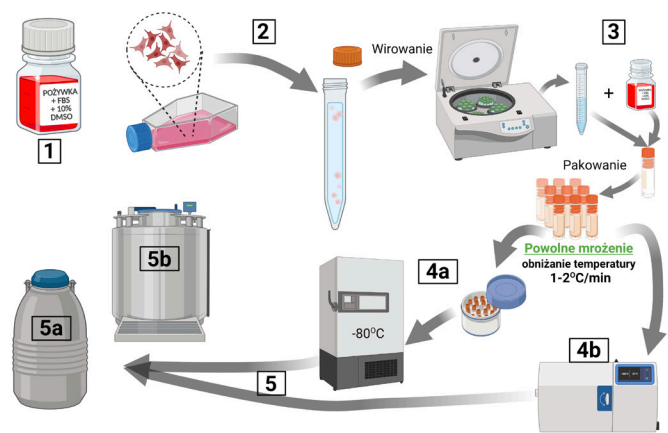
zerwacji dla nowej odmiany, niż opracowywać ją dla całej nowej grupy roślin [1,2].

Aby opracować samodzielnie odpowiedni protokół krioprezerwacji należy zwrócić uwagę na szereg parametrów,

warunków, cech i zależności. Kilka z najważniejszych zasad dotyczących krioprezerwacji komórek ssaków o których warto pamiętać, opatrzonych komentarzem, zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Parametry kluczowe podczas krioprezerwacji komórek zwierzęcych (ssaków).

Parametr	Komentarz
Warunki aseptyczne	Procedury przygotowania komórek ssaków z hodowli <i>in vitro</i> do zamrożenia w LN należy prowadzić zgodnie z zasadami pracy aseptycznej pod odpowiednimi komorami z użyciem sterylnego sprzętu, najlepiej jednorazowego użytku.
Kondycja komórek w kulturach <i>in vitro</i>	Kriokonserwację przeprowadza się pod koniec fazy logarytmicznego wzrostu komórek tj. w przypadku komórek adherentnych nienowotworowych przy ok. 70–90% konfluencji tak, aby nie doszło do kontaktowego zahamowania wzrostu komórek w hodowli.
Żywotność komórek przed krioprezerwacją	Procedurom zamrażania w LN powinno poddawać się komórki w dobrej kondycji, przy co najmniej 90% żywotności tak, aby żywotność komórek po odmrożeniu była możliwie jak najwyższa.
Kontaminacja mikroorganizmami	Procedurom zamrażania w LN powinno poddawać się komórki bez zakażeń bakteryjnych (w tym sprawdzone na obecność mykoplazmy odpowiednimi testami), grzybowych, wirusowych (szczególnie ważne przy hodowlach komórek pochodzenia pierwotnego, np. przetestowanie komórek na obecność wirusa HIV, HPV itp.). Komórki najlepiej zamrażać bez obecności antybiotyków – antybiotyki mogą zmieniać właściwości termodynamiczne medium mrożeniowego [44] lub mogą ulegać rozkładowi pod wpływem niskich temperatur.
Kontaminacja krzyżowa	Podczas procedury przygotowania komórek do zamrożenia w LN może dojść do przypadkowego zanieczyszczenia krzyżowego różnych hodowli komórkowych. Szacuje się, że problem może dotyczyć nawet 50% powszechnie używanych linii komórkowych (dane z badania przeprowadzonego w Chinach) [45]. Aby tego uniknąć procedurę krioprezerwacji najlepiej prowadzić dla każdej linii komórkowej oddzielnie.
Krioprotektant	Użycie odpowiedniego krioprotektanta w odpowiednim stężeniu zapewni właściwy przebieg procedury mrożenia w LN i odpowiednią żywotność komórek po rozmrożeniu. Najpowszechniej używanym krioprotektantem jest DMSO w stężeniu 5–15% w zależności od linii komórkowej.
Mieszanina mrożeniowa – związki protekcyjne	Dodanie do mieszaniny mrożeniowej związków wysokocząsteczkowych, np. surowicy wołowej (FBS) może uchronić komórki przed toksycznym wpływem krioprotektantów, a także wspomóc regenerację komórek po ich rozmrożeniu.
Liczba zabezpieczanych komórek	Liczba zamrożonych komórek powinna być wystarczająca, aby po rozmrożeniu umożliwić ich rozcieńczenie w stosunku 1:10 lub 1:20 w celu rozcieńczenia krioprotektanta. Ponadto komórki po rozmrożeniu powinny zostać wysiane w gęstości przynajmniej 5x większej niż do rutynowej hodowli. <i>Przykład: dla komórek hodowanych w gęstości 100 tys. komórek/ml, należy zamrozić 10 mln komórek w 1 ml medium mrożeniowego (o zawartości 10% DMSO), a po rozmrożeniu zawiesinę komórek rozcieńczyć do 20 ml ciepłą pożywką hodowlaną z suplementami, co daje 0,5 mln komórek/ml (pięć razy więcej niż normalne stężenie komórek/ml podczas pasażu). W ten sposób krioprotektant zostaje rozcieńczony ze stężenia 10% do 0,5%, dzięki czemu prawdopodobieństwo jego cytotoksyczności znacznie spada.</i>
Zastosowanie odpowiednich próbek mrożeniowych	Próbki mrożeniowe powinny być sterylne, odporne na działanie niskich temperatur, wolne od zanieczyszczeń oraz szczelnie zamykane (zwłaszcza jeżeli przechowywane komórki umieszcza się w LN – istnieje wówczas ryzyko kontaminacji) [46]. Najbezpieczniejszym systemem przechowywania banków komórek jest faza gazowa LN, gdzie bezpośredni kontakt próbek z LN jest ograniczony.
Tempo mrożenia	Odpowiednim tempem mrożenia komórek jest obniżanie temperatury o 1–2°C/min do minimum -40°C, aby zapewnić odpowiednią dehydratację komórek i zapobiec powstawaniu kryształów lodu. Zapewniają ją odpowiednie pojemniki mrożeniowe (mrożenie niekontrolowane) lub zamrażarki programowane (mrożenie kontrolowane).
Tempo rozmrażania	Aby zapobiec ponownemu, szybkiemu zamrażaniu mieszaniny mrożeniowej podczas rozmrażania, czemu towarzyszy powstawanie kryształów lodu, komórki należy odmrażać stosunkowo szybko. Mieszanina mrożeniowa jest silnie zmrożona, a rozmarzanie rozpoczyna się od ścianek próbki mrożeniowej.
Warunki po rozmrożeniu	Po rozmrożeniu mieszaniny mrożeniowej należy dodać ciepłej pożywki hodowlanej z suplementami w celu rozcieńczenia krioprotektanta i zapewnienia komórkom odpowiednich warunków do wzrostu. W przypadku komórek adherentnych, po przyłączeniu komórek do podłoża należy niezwłocznie wymienić pożywkę hodowlaną na świeżą (w celu usunięcia krioprotektanta i pozostałości martwych komórek mogących stymulować proces apoptozy). Dopuszcza się odwirowanie zawiesiny z komórkami przy niskiej prędkości np. 150x g (wymagane w przypadku hodowli w zawiesinie). W wielu przypadkach hodowli komórek prawidłowych, adherentnych, szczególnie pochodzenia pierwotnego nie zaleca się wirowania komórek po rozmrożeniu; może ono znacznie obniżyć żywotność komórek, gdyż struktura błony komórkowej może być naruszona przez proces mrożenia (niska temperatura zmienia stan fizyczny lipidów, a tym samym zmienia organizację i płynność lipidów).



Rycina 7. Podstawowy schematyczny protokół mrożenia komórek: 1) Przygotować pożywkę do mrożenia z odpowiednią zawartością krioprotektanta. 2) Wykonać pasaż komórek (w odpowiedniej kondycji) przeznaczonych do zamrożenia i umieścić je w odpowiedniej gęstości w medium mrożeniowym. 3) Rozdzielić przygotowaną zawiesinę komórek do próbek mrożeniowych. 4) Przeprowadzić proces nieprogramowanego (A) lub programowanego (B) mrożenia zachowując tempo schładzania 1–2°C/min. 5) Komórki schłodzone do temperatury min. –60°C umieścić w fazie ciekłej (A) lub gazowej (B) LN w odpowiednich pojemnikach w celu długotrwałego przechowywania. Przygotowano za pomocą: BioRender.com.

Mając na uwadze przytoczone powyżej zasady można schematycznie przedstawić podstawowy protokół krioprezervacji ssaczych komórek adherentnych (Ryc. 7), który po przeprowadzeniu odpowiednich prac optymalizacyjnych i walidacyjnych można by zaimplementować do standardowych procedur operacyjnych i stosować rutynowo do krioprotekcji wybranych hodowli komórkowych *in vitro*.

BANKI KOMÓREK I TKANEK W POLSCE I NA ŚWIECIE

Na całym świecie powstaje coraz więcej firm oferujących kultury komórek prokariotycznych i eukariotycznych, a także wiele bioproduktów, zabezpieczonych w LN, łatwych do odtworzenia według wcześniej opracowanych procedur. Najstarszą kolekcją-kriobankiem w Europie jest holenderska CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures, gdzie można zaopatrzyć swoje laboratorium w grzyby, drożdże, bakterie, fagi i plazmidy. Linie komórkowe, hybrydomy, DNA, RNA, komórki macierzyste oferuje w Europie The European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), której odpowiednikiem w Stanach Zjednoczonych jest American Type Culture Collection (ATCC), która dodatkowo w swojej ofercie posiada: fagi, drożdże, grzyby, nasiona roślin, bakterie, algi, wirusy. Istnieje także mnóstwo kriobanków, przechowujących swoje zbiory najczęściej w –20°C, obejmujących kolekcje komórek roślinnych (banki nasion): m.in. największy bank nasion na świecie Millennium Seed Bank Project znajdujący się w historycznym hrabstwie Sussex, w południowo-wschodniej Anglii nad kanałem La Manche w Wielkiej Brytanii. Warto wspomnieć także projekty typu zamrożone zoo (ang. *frozen zoo*), w których przechowuje się zamrożone w LN zwierzęce i roślinne materiały biologiczne (sperma, komórki jajowe, nasiona). Jednym z nich jest frozen zoo w San Diego w Stanach Zjednoczonych, gdzie przechowuje się od roku 1978 próbki pochodzące od 8400 egzemplarzy

roślin i zwierząt, obejmujące ponad 800 gatunków i podgatunków. Innym biobankiem gromadzącym zarówno zasoby genowe roślin uprawnych, jak i zwierząt hodowlanych jest NCGRP (ang. *National Center for Genetic Resources Preservation*) w Fort Collins, Colorado. Najstarszym, działającym od przeszło 30 lat, biobankiem w Polsce jest Narodowy Bank Genów zlokalizowany w Polskiej Akademii Nauk Ogródzie Botanicznym – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie pod Warszawą. Zgromadzono tam zasoby roślin chronionych i zagrożonych flory Polski, ziarniki żyta oraz pąki zimowe roślin sadowniczych. Obok tradycyjnego przechowywania materiału w –20°C, wykorzystuje się tam również LN. W LN zgromadzono dotychczas nasiona prawie stu gatunków roślin chronionych i zagrożonych oraz pąki spoczynkowe starych odmian jabłoni, gruszy i kilku odmian czereśni. Innym przykładem biobanku działającego na terenie Polski jest Leśny Bank Genów (LBG) w Kostrzycy nieopodal Jeleniej Góry w województwie dolnośląskim. W kriogenicznych warunkach zdeponowano tam materiał biologiczny pochodzący od dębu szypułkowego i bezzypułkowego, buka zwyczajnego, czereśni ptasiej, lipy drobnolistnej i kilku gatunków roślin zielnych. Co interesujące, duplikaty swoich zbiorów LBG gromadzi w wielu bankach na całym świecie, m.in. na wyspie Svalbard (prowincja norweska na Oceanie Arktycznym), w Fort Collins, USA, w Millennium Seed Bank, a nawet w banku na hiszpańskiej Grand Canarii [1,2].

Najbardziej popularne są jednak kriobanki medyczne i zootechniczne, gdzie przechowywane są komórki jajowe i nasienie oraz embriony ludzkie, a także bydłce, końskie i trzody chlewnej. Dla przykładu Cryos International w Danii jest największym na świecie bankiem nasienia i ma największy wybór dawców oraz bezpłatny dostęp do wyszukiwania dawców online, natomiast California Cryobank jest największym kriobankiem tego typu w USA. Biobank Graz w Austrii to jeden z największych i najbardziej znanych biobanków klinicznych na świecie. Przechowuje się tam około 20 milionów pojedynczych próbek płynów ustrojowych i tkanek ludzkich. Innymi dużymi biobankami na świecie są: Shanghai Zhangjiang Biobank (10 mln próbek), Biobank Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakim (IARC) z próbkami od ponad 0,5 mln osobników, UK Biobank w Anglii, FINNGEN Biobanks w Finlandii oraz China Kadoorie Biobank (CKB), znany wcześniej jako Kadoorie Study of Chronic Disease in China (KSCDC), który ma na celu zbadanie głównych genetycznych i środowiskowych przyczyn powszechnych chorób przewlekłych w populacji chińskiej i przechowuje próbki krwi od ponad 0,5 mln pacjentów.

W Polsce istnieje ponad 50 banków tkanek i komórek wykorzystywanych do zastosowań medycznych (głównie do przeszczepów tkanek i komórek), które posiadają pozwolenie Ministra Zdrowia na prowadzenie działalności zgodnie z art. 26 Ustawy z dnia 1 lipca 2005 r. o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów (Dz. U. Nr 169, poz. 1411, z późn. zm.) (stan na dzień 28.07.2022). Zajmują się one głównie: gromadzeniem, przetwarzaniem, przechowywaniem, dystrybucją oraz puszczaniem do obiegu:

- krwi pełnej, komórek krwiotwórczych, limfocytów z krwi obwodowej i komórek krwiotwórczych ze szpiku, szpiku kostnego, komórek krwi pępowinowej, komórek mezenchymalnych ze szpiku,
- wysp trzustkowych,
- tkanek ludzkiego płodu i komórek izolowanych z tkanek ludzkiego płodu (sznura pępowinowego, łożyska i błon płodowych, preparatów z błony owodniowej i kosmówki),
- tkanki łącznej: tłuszczowej i komórek izolowanych z tkanki tłuszczowej (np. mezenchymalnych komórek macierzystych), tkanki łącznej chrzęstnej i komórek izolowanych z tkanki chrzęstnej (chondrocyty),
- tkanek i komórek skóry (skóry pełnej z tkanką podskórną, naskórka z częścią skóry właściwej, tkanki tłuszczowej podskórnej, preparatów tkanek powłok sterylizowanych radiacyjnie od zmarłych dawców),
- tkanek wykorzystywanych w stomatologii (zębów stałych i mlecznych, tkanki dziąsła, miazgi zęba stałego),
- tkanek sercowo-naczyniowych (zastawek serca, osierdzia, naczyń krwionośnych),
- tkanek mięśniowo-szkieletowych (kości, więzadeł, ścięgien, łąkotec),
- tkanek oka (gałek ocznych, płatków rogówkowo-twardówkowych, twardówki),
- tkanki nerwowej i nerwów.

Pieczę nad bankami tkanek i komórek wykorzystywanych w medycynie sprawuje Krajowe Centrum Bankowania Tkanek i Komórek (KCBTiK), które pełni funkcje referencyjne i konsultacyjne oraz sprawuje nadzór pod względem fachowo-medycznym nad wszystkimi bankami. Rzecz jasna w wielu przypadkach do przechowywania tkanek i komórek wykorzystuje się techniki krioprezerwacji. Listę wszystkich banków komórek i tkanek działających na terenie RP można znaleźć na stronie internetowej KCBTiK pod adresem: <https://www.kcbtik.pl/>.

W roku 2017 zawiązano Konsorcjum [BBMRI.pl](http://www.bbmri.pl) (ang. *BioBanking and BioMolecular Resources Research Infrastructure Poland*), które w pierwszej fazie utworzyło 7 jednostek z terenu całego kraju, celem realizacji projektu „Utworzenie sieci biobanków w Polsce w obrębie Infrastruktury Badawczej Biobanków i Zasobów Biomolekularnych *BBMRI-ERIC*”. Projekt jest finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach przystąpienia Polski do Europejskiej Infrastruktury Badawczej *BBMRI-ERIC*. Głównym celem projektu badawczego jest utworzenie Polskiej Sieci Biobanków (PSB) w obrębie Infrastruktury Badawczej Biobanków i Zasobów Biomolekularnych *BBMRI-ERIC*. Podstawowym założeniem PSB jest zrzeszenie jak największej liczby jednostek zajmujących się gromadzeniem materiału biologicznego i udzielenie im merytorycznego wsparcia w rozwijaniu ich biobanków i repozytoriów.

PIŚMIENNICTWO

1. Mikula A, Rybczyński J (2006) Krioprezerwacja narzędziem długoterminowego przechowywania komórek, tkanek i organów pochodzących z kultur *in vitro*. *Biotechnologia* 4 (75): 145-163
2. Mikula A, Makowski D, Tomiczak K, Rybczyński J (2013) Kultury *in vitro* i krioprezerwacja w zachowaniu różnorodności roślin – standardy dla banku genów. *Polish Journal of Agronomy* 14: 3-17

3. Sherman JK (1973) Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: State of the art of human semen banking. *Fertil Steril* 24: 397-412
4. Polge C, Smith AU, Parkes A (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration. *Nature* 164: 666
5. Awan M, Buriak I, Fleck R, Goltsev A, Kerby J, Lowdell M, Mericka P, Petrenko A, Petrenko Y, Rogulska O, Stolzing A, Stacey GN (2020) Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regen Med* 15: 1463-1491
6. Darwin M (2007) History of DMSO and glycerol in cryonics. *Alcor Org* 1-5
7. Lovelock JE, Bishop MWH (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183: 1394-1395
8. Hunter RHF (2008) Ernest John Christopher Polge. 16 August 1926-17 August 2006. *Biogr Mem Fellows R Soc* 54: 275-296
9. Lovelock JE, Polge C (1954) The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochem J* 58: 618-622
10. Rostand J (1946) Glycérine et résistance du sperme aux basses températures. *CR Acad Sci Paris* 222
11. Wierzbowski S (1971) Zagadnienia kriobiologii w sztucznym unasięnianiu zwierząt. *Zesz Probl Postępów Nauk Rol* 124: 363-374
12. Gajda B, Rajsa I (2014) Aktualny stan i możliwości kriokonserwacji zarodków i oocytów zwierząt gospodarskich. *Rocz Nauk Pol Tow Zootech* 10: 89-111
13. Pegg DE (2007) Principles of Cryopreservation. W: John G. Day GNS (red) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods Mol Biol* 368: 39-57
14. Reed BM (2008) Cryopreservation – Practical Considerations. W: Reed BM (red) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer New York*, 3-13
15. Yang H, Tiersch TR (2020) Concepts, history, principles, and application of germplasm cryopreservation technology. *Edis* 2020: 10
16. Suzuki N, Donnez J (2016) Gonadal Tissue Cryopreservation in Fertility Preservation. *Springer Japan, Tokyo*
17. Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE (2016) Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology* 86: 1637-1644
18. Daszyński J (1971) Długotrwała konserwacja krwi i innych tkanek. *Zesz Probl Postępów Nauk Rol* 124: 375-392
19. Asghar W, El Assal R, Shafiee H, et al (2014) Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine. *Biotechnol J* 9: 895-903
20. Holm F, Ström S, Inzunza J, et al (2010) An effective serum-and xeno-free chemically defined freezing procedure for human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Hum Reprod* 25: 1271-1279
21. Yong KW, Choi JR, Kamarul W (2016) Biobanking and cryopreservation of stem cells. *Springer International Publishing, Cham*
22. Arav A (2022) Cryopreservation by directional freezing and vitrification focusing on large tissues and organs. *Cells* 11: 1072.
23. Fahy GM, Wowk B, Pagotan R, Chang A, Phan J, Thomson B, Phan L (2009) Physical and biological aspects of renal vitrification. *Organogenesis* 5: 167-175
24. Janicka A, Spaczynski RZ, Koziol K, Radwan M, Kurzawa R (2021) Assisted reproductive medicine in Poland, 2013-2016: Polish Society of Reproductive Medicine and Embryology (PTMRIE) and Fertility and Sterility Special Interest Group of the Polish Society of Gynaecologists and Obstetricians (SPiN PTGiP) report. *Ginekol Pol* 92: 7-15
25. Sun C, Yue J, He N, Liu Y, Zhang X, Zhang Y (2016) Fundamental principles of stem cell banking. *Adv Exp Med Biol* 951: 31-45
26. Meneghel J, Kilbride P, Morris GJ (2020) Cryopreservation as a key element in the successful delivery of cell-based therapies – a review. *Front Med* 7: 592242
27. Harańczyk H (2003) Rozważania o dwóji z fizyki, czyli jak zamarać wodę. *Foton* 83: 23-29
28. Gao D, Critser JK (2000) Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J* 41: 187-196

29. Mazur P (1963) Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 47: 347–369
30. Pegg D, Kleinhans F (2016) In memoriam Peter Mazur – Cryobiologist. *Cryobiology* 72: 83–85
31. Mazur P (1988) Stopping biological time. The freezing of living cells. *Ann N Y Acad Sci* 541: 514–31
32. Mazur P (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247: 0–4
33. Kilbride P, Meneghel J, Fonseca F, Morris J (2021) The transfer temperature from slow cooling to cryogenic storage is critical for optimal recovery of cryopreserved mammalian cells. *PLoS One* 16:e0259571
34. Trump BF, Young DE, Arnold EA, Stowell RE (1965) Effects of freezing and thawing on the structure, chemical constitution and function of cytoplasmic structures. *Fed Proc* 24: 144–68
35. McGann LE, Yang H, Walterson M (1988) Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology* 25: 178–185
36. Irimia D, Karlsson JOM (2005) Kinetics of intracellular ice formation in one-dimensional arrays of interacting biological cells. *Biophys J* 88: 647–660
37. Best BP (2015) Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Res* 18: 422–436
38. Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR (2021) Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplant* 30: 1–12.
39. Bhattacharya S (2018) Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. W: Yusuf Bozkurt (red) *Cryopreserv Biotechnol Biomed Biol Sci*. Headquarters IntechOpen Limited, London
40. Wolkers WF, Oldenhof H (2015) *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Springer New York, New York
41. Buckley SL, Lillford PJ (2009) *Antifreeze proteins. Their structure, binding and use*. W: Stefan Kasapis, Ian T. Norton and Johan B. Ubbink (red.) *Modern Biopolymer Science*, Elsevier, 93–128
42. Eskandari A, Leow TC, Rahman MBA, Oslan SN (2020) Antifreeze proteins and their practical utilization in industry, medicine, and agriculture. *Biomolecules* 10: 1–18
43. Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A (2017) *Cryopreservation of mammalian gametes and embryos*. Springer New York, New York
44. Salvetti P, Joly T, Baudot A (2006) Effect of antibiotics on thermodynamic properties of freezing media in rabbit species: A first calorimetric approach. *Cryobiology* 53: 268–275
45. Huang Y, Liu Y, Zheng C, Shen C (2017) Investigation of cross-contamination and misidentification of 278 widely used tumor cell lines. *PLoS One* 12: 1–16
46. Bajerski F, Nagel M, Overmann J (2021) Microbial occurrence in liquid nitrogen storage tanks: a challenge for cryobanking? *Appl Microbiol Biotechnol* 105: 7635–7650

The basis of cell cryopreservation

Dawid Wnuk✉

Jagiellonian University, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Department of Cell Biology

✉corresponding author: dawid.wnuk@uj.edu.pl

Key words: cell banks, cryopreservation, cryoprotectants, *in vitro* cell cultures

ABSTRACT

Cryopreservation is a method of preserving and storing biological material (cells, tissues and organ fragments) at low temperatures, usually at liquid nitrogen (LN) or liquid nitrogen vapor temperatures. It guarantees long-term storage of biological material with maintenance of its viability and genetic stability. The foundations for cryopreservation techniques were laid by scientific research on plant material in the late 19th century, while the boost in research on cryopreservation techniques occurred in the mid-20th century, when cryoprotectants were successfully applied. The following article discusses the historical background of discoveries related to cell cryopreservation, the advantages of using cryopreservation techniques, the scientific basis of the processes accompanying it, the types of cryoprotectants and the practical aspects of cryopreservation useful in routine laboratory practice, using mammalian cell cryopreservation as an example. The advantages of using cryopreservation techniques for biological material in scientific research, animal and plant breeding, and medicine and clinical practice are also briefly discussed.

