

1 /str. 0.4 - 11

# Zamrażanie i przechowywanie materiału biologicznego

## ŻYCIODAJNA WODA - NAJWIĘKSZY PROBLEM PODCZAS ZAMRAŻANIA PREPARATÓW BIOLOGICZNYCH

Woda stanowi 60-95% całkowitej masy aktywnie żyjących komórek. Przemiana wody w lód prowadzi do zahamowania dyfuzji, zatrzymania procesów metabolicznych i tym samym zegara biologicznego.

Tworzenie kryształów lodu może jednak prowadzić do nieodwracalnego uszkodzenia materiału biologicznego podczas procesu zamrażania lub rozmrażania:

- wewnątrzkomórkowe kryształy lodu powodują niszczenie błon komórkowych,
- pozakomórkowe kryształy lodu wpływają na uszkodzenia mechaniczne oraz chemiczne,
- zachwianie równowagi osmotycznej wewnątrz komórek prowadzi do denaturacji białek.

WODA



LÓD

BRAK  
DYFUZJIZATRZYMANY  
ZEGAR  
BIOLOGICZNY

Materiał biologiczny podlega zmianom i degradacji zgodnie z prawami obowiązującymi w przyrodzie. Aby zachować go do późniejszych badań w odpowiednim stadium, musimy zatrzymać zachodzące w nim procesy bez wywierania wpływu na jego charakter. Zatrzymanie zegara biologicznego następuje, kiedy między wnętrzem komórki, a jej otoczeniem nie zachodzi dyfuzja. Najbardziej efektywną metodą utrzymania takiego stanu jest zamrożenie i przechowywanie materiału biologicznego w niskich temperaturach.

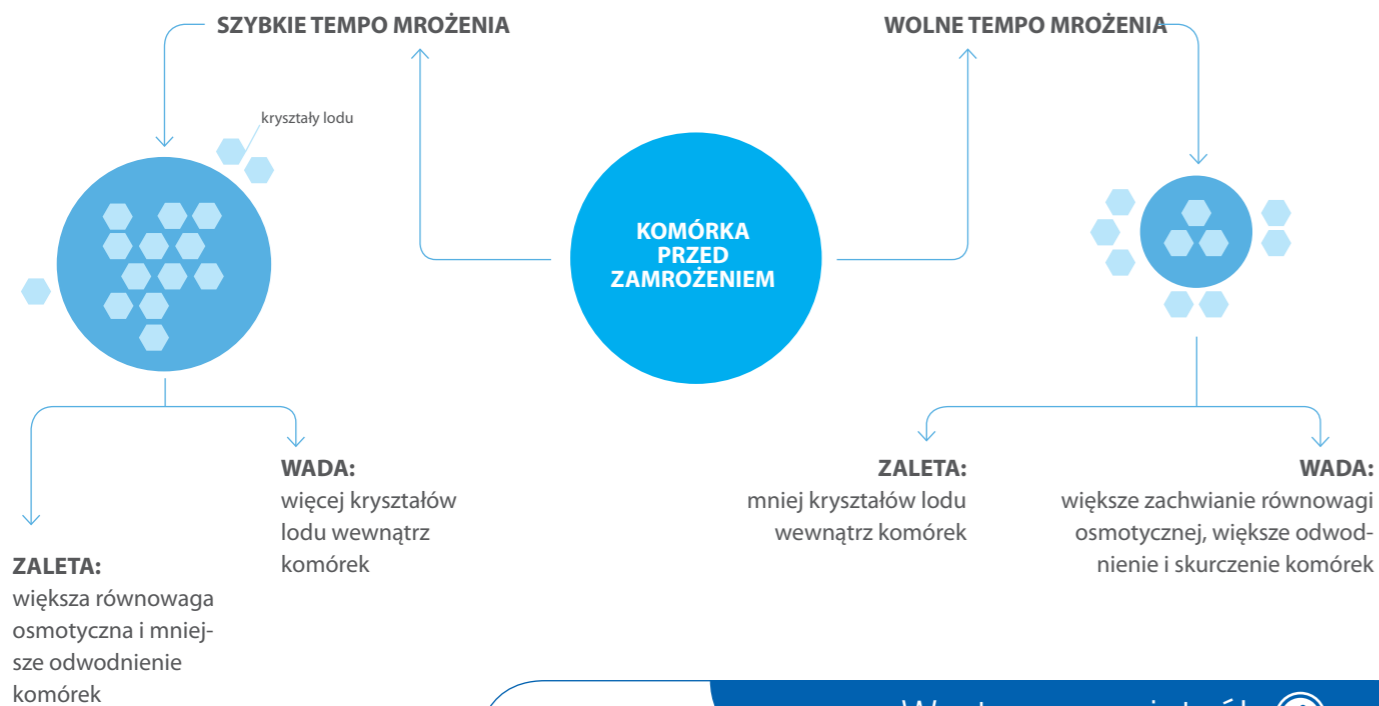
### WPŁYW SZYBKOŚCI ZAMRAŻANIA NA USZKODZENIA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Tempo procesu mrożenia ma ogromny wpływ na zmiany zachodzące w komórkach. Tworzenie kryształów lodu oraz zaburzenia równowagi osmotycznej stanowią w tym przypadku największe niebezpieczeństwo [1].

Powolne zamrażanie prowadzi początkowo do tworzenia kryształów lodu na zewnątrz

komórek, przez co zostaje zachwiana równowaga osmotyczna i następuje ich odwodnienie. Szybkie zamrażanie minimalizuje efekt zachwiania równowagi osmotycznej, ale prowadzi do tworzenia większej ilości lodu wewnątrz komórek, co wpływa na ich uszkodzenie.





## KRIOPROTEKTANTY

Krioprotektanty to substancje chroniące komórki przed negatywnymi skutkami procesu mrożenia. Umożliwiają zmniejszenie tempa dyfuzji wody i minimalizację szoku osmotycznego, redukcję formowania kryształów lodu wewnątrz komórek oraz obniżenie temperatury zamrażania. W zależności od mechanizmu działania dzielimy je na [2]:

### - Krioprotektanty przenikające do wnętrza komórek.

Są to substancje o niskim ciężarze molekularnym, takie jak alkohole (metanol, sorbitol, glikol etylenowy, glikol propylenowy, glicerol), DMSO i dimetylacetamid. Znajdują zastosowanie głównie podczas powolnego zamrażania preparatów biologicznych.

### - Krioprotektanty zewnątrzkomórkowe.

Są to substancje o większym ciężarze molekularnym, które nie wnikają do wnętrza komórek. Należą do nich krioprotektanty złożone (osocze krwi, mleko odtłuszczone, ekstrakt drożdżowy, ekstrakt słodowy, pepton), cukry (sacharoza, glukoza, dekstran) oraz polimery (poliwinylpirolidon). Znajdują zastosowanie głównie podczas szybkiego zamrażania preparatów biologicznych.

## Warto zapamiętać!

**NEGATYWNE SKUTKI TWORZENIA KRYSZTAŁÓW LODU I ZACHWIANIA RÓWNOWAGI OSMOTYCZNEJ MOŻNA ZMNIJSZYĆ POPRZEC:**

- › użycie krioprotektantów
- › kontrolę tempa procesu mrożenia

## Czy wiesz że....?

Organizmy żyjące w środowisku narażonym na wpływ niskich temperatur, takie jak arktyczne owady, morskie bezkręgowce, czy żaby hibernujące na lądzie wykształciły podczas ewolucji specjalne mechanizmy adaptacyjne i strategię przetrwania [3]:

1. Unikanie zamrożenia poprzez syntezę białek anty-zamrażających i wysokie stężenie naturalnych krioprotektantów.
2. Tolerowanie zamrożenia poprzez kontrolowane formowanie kryształów lodu, regulację objętości komórki oraz przystosowanie do niedotlenienia / niedokrwienia i zatrzymania procesów metabolicznych.

## Warto zapamiętać!

Do najczęściej stosowanych krioprotektantów należą glicerol i DMSO. Używa się je zwykle oddzielnie w stężeniu 5-10%; jako mieszanina wykorzystywane są tylko w przypadku komórek roślinnych. Przed użyciem krioprotektanty muszą zostać wysterylizowane. Glicerol autoklawuje się przez 15 minut w temperaturze 121°C i następnie chroni przed działaniem światła podczas przechowywania. DMSO filtruje się przez filtr nylonowy lub teflonowy PTFE 0.2 µm przemyty uprzednio alkoholem i DMSO. Zaleca się, aby krioprotektanty były przygotowywane do użycia w postaci jednorazowych porcji, gdyż wielokrotne korzystanie z większego pojemnika prowadzi do wprowadzania zanieczyszczeń i wilgoci.

# DMSO, GLICEROL

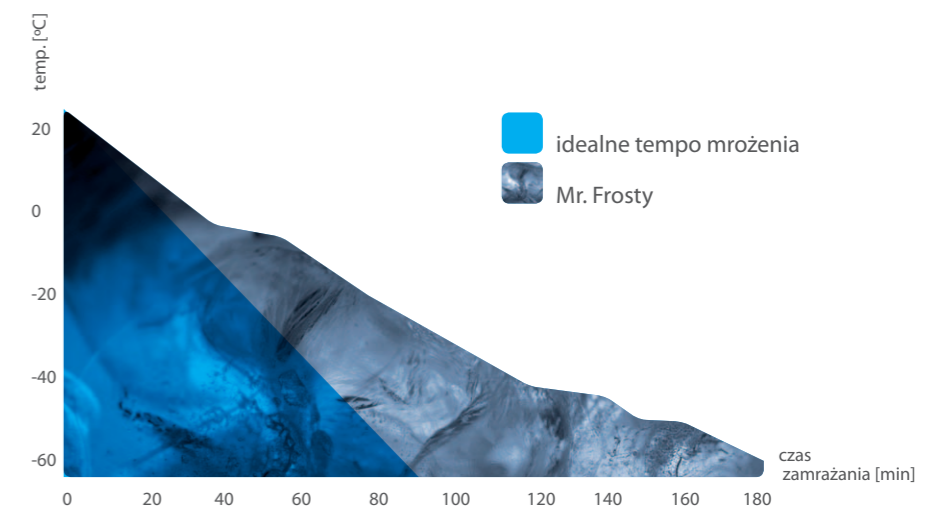
## TEMPO ZAMRAŻANIA PREPARATÓW BIOLOGICZNYCH

Wybór tempa zamrażania zależy od typu komórek i od przeznaczenia zamrożonego materiału [1]. Jeżeli istotne jest zachowanie przeżywalności zamrożonego materiału biologicznego, to dla większości komórek optymalnym rozwiązaniem będzie zamrażanie z szybkością -1°C na minutę. Dodatkowo użycie krioprotektantów zmniejszy niebezpieczeństwo uszkodzeń spowodowanych zachwianiem równowagi osmotycznej i formowaniem kryształów lodu.

## KONTROLOWANE OBNIŻANIE TEMPERATURY MOŻNA PRZEPROWADZIĆ STOSUJĄC PROSTY SYSTEM ŁAGODNEGO ZAMRAŻANIA PREPARATÓW MR. FROSTY.

Mr. Frosty gwarantuje powtarzalne zamrażanie preparatów w tempie -1°C/minutę. Jest to przezroczysty pojemnik, w którym umieszczamy probówki z materiałem biologicznym, nalewamy do niego alkoholu izopropylowego i następnie umieszczamy go w zamrażarce niskotemperaturowej. Preparaty ulegają zamrożeniu w tempie bliskim -1°C/minutę, co umożliwia późniejsze odzyskanie komórek z wysokim stopniem przeżywalności.

System Mr. Frosty do kontrolowanego zamrażania preparatów.



## Zamrażanie w systemie Mr. Frosty przebiega w tempie zbliżonym do idealnego.

Numer katalogowy	Kompatybilność z probówkami [ml]	Max liczba probówek	Wymiary [cm] h x Ø	Objętość izopropanolu [ml]
Frosty-0001	1.0 – 2.0	18	86 x 117	250
Frosty-0036	3.6	12	151 x 117	500
Frosty-0050	4.5 – 5.0	12	151 x 117	500

## Warto zapamiętać!

### JAK PRAWIDŁOWO ROZMRAŻAĆ PREPARATY BIOLOGICZNE?

Przeżywalność zamrożonego materiału biologicznego zależy w dużym stopniu od odpowiedniego tempa rozmrażania. Powinno być szybkie, najlepiej w łaźni wodnej w temperaturze około 37°C. Czas dobierany jest zawsze indywidualnie w zależności od rodzaju rozmrażanego materiału. Szczególną uwagę należy zwrócić na szybkie przekroczenie przedziału temperatur od -45°C do -5°C w celu uniknięcia rekryształizacji lodu w komórkach.



## JAKI RODZAJ MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO ZAMIERZAMY ZAMROZIĆ I PRZECHOWAĆ?

Preparaty biologiczne, takie jak tkanki, komórki roślinne, zwierzęce, ludzkie, bakterie, grzyby, czy wirusy zamrażamy i przechowujemy w niskich temperaturach przede wszystkim w celu:

- zachowania materiału genetycznego do badań podstawowych i taksonomicznych,
- zachowania bioróżnorodności,
- dla potrzeb medycznych,
- dla potrzeb przemysłu mikrobiologicznego, biotechnologicznego i farmaceutycznego.

# -80°C

Rodzaj materiału biologicznego	Liczebność komórek	Krioprotektant	Zamrażarki niskotemperaturowe -80°C	Zbiorniki z ciekłym azotem -150°C
<b>Bakterie</b>	10 <sup>7</sup> /ml	Glicerol (10%)	+	+
<b>Bakteriofagi</b>	10 <sup>8</sup> pfu/ml	Glicerol (10%)	+	+
<b>Grzyby</b>	10 <sup>6</sup> /ml <sup>(1)</sup>	Glicerol (10%)	+	+
<b>Drożdże</b>	10 <sup>7</sup> /ml	Glicerol (10%)	+	+
<b>Protozoa</b>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>7</sup> /ml	DMSO (5-10%) lub glicerol (10-20%)	-	+
<b>Algi</b>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>7</sup> /ml	Metanol (5-10%) lub DMSO (5-10%)	+	+
<b>Komórki roślinne</b>	- <sup>(2)</sup>	DMSO (5-10%) + glicerol (5-10%)	+	+
<b>Komórki zwierzęce</b>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup> /ml	DMSO (5-10%) lub glicerol (5-10%)	+	+
<b>Tkanki</b>	-	OCT	+	+
<b>Krew</b>	-	Glicerol	+ <sup>(4)</sup>	+
<b>Surowica</b>	-	-	+	-
<b>Embriony</b>	20	1,2-propandiol, glicerol lub glikol etylenowy	-	+
<b>Wirusy roślinne</b>	- <sup>(3)</sup>	-	+	-
<b>Wirusy zwierzęce</b>	10 <sup>6</sup> /ml <sup>(3)</sup>	DMSO (7%) + wołowa surowica płodowa (FBS) (10%)	+	+
<b>Plazmidy</b>	10 <sup>6</sup> /ml	Glicerol (10%)	+	-
<b>Biblioteki fagowe</b>	- <sup>(3)</sup>	Glicerol (10%)	+	+
<b>DNA / RNA</b>	-	-	+	-
<b>Białka</b>	-	-	+	-

Źródło: zmodyfikowana wersja tabeli przygotowanej przez F.P. Simone (ATCC) we współpracy z Nalge Nunc™ International Corp.

(1) grzybnie są przygotowywane do mrożenia bez odniesienia się do liczebności komórek.

(2) komórki roślinne są suszone do 3-20% objętości komórkowej przed zamrożeniem.

(3) liczebność cząstek infekcyjnych ma niewielki wpływ na odzyskanie aktywnych wirusów i bakteriofagów po rozmrożeniu.

(4) krew i większość jej składników może być przechowywana w -80°C, jednakże limfocyty przechowywane do dalszego rozwoju linii komórkowych muszą być przechowywane w -150°C.

# -140°C

Przechowywanie materiału biologicznego w odpowiedniej temperaturze oraz w odpowiednim środowisku gwarantuje jego późniejsze **odzyskanie w niezmienionym stanie.**

# -156°C -196°C



### Metoda przechowywania zamrożonego materiału biologicznego

Metoda przechowywania zamrożonego materiału biologicznego	Temperatura	Okres przechowywania
Zamrażarka niskotemperaturowa	-80°C	1-10 lat
Faza gazowa nad ciekłym azotem	Od -140 do -156°C	Powyżej kilkunastu lat
Ciekły azot	-196°C	Powyżej kilkunastu lat

Im dłużej zamierzamy przechowywać zamrożony materiał i jednocześnie zachować jego przeżywalność po rozmrożeniu, **tym niższą temperaturę powinniśmy stosować.** Zamrażarki niskotemperaturowe pozwalają na przechowanie materiału biologicznego w temperaturze poniżej -80°C przez okres kilku lat. W przypadku zbiorników z ciekłym azotem okres przechowywania wydłuża się powyżej kilkunastu lat.



## NAJBARDZIEJ ZNANE KOLEKCJE MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Kriobanki obejmujące kolekcje mikroorganizmów, kultur komórkowych i bioproduktów:

- **CBS** - Centraalbureau voor Schimmelcultures - najstarsza kolekcja w Europie założona w 1904 roku w Holandii. Obejmuje grzyby, drożdże, bakterie, fagi i plazmidy.
- **ATCC** - American Type Culture Collection - linie komórkowe, hybridomy, bakterie, fagi, drożdże, grzyby, nasiona roślin, algi, wirusy, DNA, RNA, wektory, biblioteki, kity, komórki macierzyste, kolekcje specjalne (np. bank komórek chłoniaków nieziarniczych).
- **ECACC** - European Collection of Cell Cultures - linie komórkowe, hybridomy, DNA, RNA, kity, komórki macierzyste.
- **ARS** - Agricultural Research Service Culture Collection (**NRRL**) - bakterie, promieniowce, grzyby, drożdże.
- **DSMZ** - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen - bakterie, fagi, drożdże, grzyby, plazmidy, wirusy roślinne, ludzkie, zwierzęce i roślinne kultury komórkowe.

W bankach szczepów wykorzystywanych do procesów biotechnologicznych ważna jest nie tylko przeżywalność, ale również istotne jest zachowanie wyjściowych cech fizjologicznych szczepu produkcyjnego, wynikających z niezmienności genetycznej podczas przechowywania zamrożonego materiału.



Pierwszym opatentowanym szczepem przemysłowym, który został zdeponowany przez American Cyanamid Company w kolekcji NRRL, był *Streptomyces aureofaciens* NRRL 2209 produkujący aureomycynę (chlotetracyklina z grupy tetracyklin) [4].

Czy wiesz że....?

Kriobanki obejmujące kolekcje komórek roślinnych (banki nasion):

- **Millennium Seed Bank Project** - największy bank nasion na świecie, w pobliżu Londynu,
- **Svalbard Global Seed Vault** - 1300 km od Bieguna Północnego w archipelagu Svalbard (Norwegia) w postaci tunelu wydrążonego w wiecznej zmarzlinie,
- **Vavilov Institute of Plant Industry** - jeden z pierwszych banków nasion na świecie (Sankt Petersburg).



W lutym 2012 roku w Rosyjskiej Akademii Nauk odtworzono roślinę *Silene stenophylla* z nasion z epoki plejstoenu datowanych na 20.000-40.000 lat. Tym samym odkryto na Syberii w wiecznej zmarzlinie najstarszy znany naturalny kriobank) [5].

Kriobanki obejmujące kolekcje komórek zwierzęcych:

- **Frozen Zoo** w San Diego - kolekcja nasienia, komórek jajowych i embrionów gatunków zagrożonych,
- Projekt **Frozen Ark** - zamrożony materiał biologiczny (DNA, komórki, tkanki) gatunków zwierząt zagrożonych i niezagrożonych.

Kriobanki medyczne:

- przechowywanie komórek jajowych i nasienia (zapłodnienie *in vitro*) oraz embrionów w przypadku ludzi, a także w hodowli głównie bydła, koni i świń,
- kolekcje patogenów i przeciwciał do badań nad chorobami, ich profilaktyką i zwalczaniem (**GHRC - Global HIV Vaccine Research Cryobank**),
- kolekcje próbek krwi (transfuzje), hemo-cytoblastów (komórki macierzyste dla wszystkich typów krwinek), tkanek do transplantacji, zastawek serca, preparatów z biopsji nowotworowych.

Czy wiesz że....?