

Metoda: Kryokonzervace buněk

Studentka: Jana Skálová, 2. ročník

Školitel: Ing. Tomáš Vlas

Princip: Udržování zdravých rostoucích buněčných kultur je náročný a složitý úkol, zejména kvůli riziku jejich ztráty v důsledku nehod nebo kontaminace. Kromě toho buněčné kultury nejsou stálé a podléhají změnám způsobených stárnutím nebo enzymatickou a chemickou aktivitou. Tyto problémy se snižují použitím kryogenního uchovávání – kryokonzervací.

Kryokonzervace je proces dlouhodobého uchování biologického materiálu v parách tekutého dusíku při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jedná se o nejšetrnější způsob uchovávání, který se běžně využívá k zmrazování pohlavních buněk, tkání, orgánů a v případě FN Plzeň Lochoťín – Imunologie a alergologie nejčastěji mononukleárních frakcí buněk (lymfocyty + monocyty).

Uplatnění metody: Biologický materiál takto uchovávaný si zachovává všechny vlastnosti nutné k dalšímu molekulárně-biologickému a imunologickému vyšetření nebo k výzkumným úkolům. Kryokonzervace pohlavních buněk se provádí především ze zdravotních důvodů. Pokud je u pacienta/pacientky plánovaná onkologická léčba a hrozí ztráta plodnosti, je vhodné spermie/oocyty předem zamrazit. Během onemocnění jako je diabetes mellitus dochází k zhoršování kvality pohlavních buněk, takovým pacientům je rovněž doporučována metoda kryokonzervace. Takto upravené buňky lze za ideálních podmínek uchovávat teoreticky po neomezeně dlouhou dobu.

Úskalí metody: Při zmrazování se voda v buňkách váže do ledových krystalů a dochází tak k dehydrataci jak membránových systémů, tak i ostatních buněčných struktur. Negativní vliv vody a ledu se proto omezuje přidáním kryoprotektiv (např. glycerol, DMSO) do mrazicího média, která pronikají do buňky, nahrazují nitrobuněčnou vodu a místo krystalizace se roztok stává amorfním ledem – vitrifikuje. Kryoprotektiva tak chrání buňky před škodlivými účinky tvorby intracelulárních ledových krystalů nebo před účinky roztoku během procesu zmrazování a rozmrazování.

Pro dosažení vitrifikace je třeba pracovat s velmi malým objemem vzorku a použít rychlé ochlazení. Vzorky se zamrazí na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ uložením do mrazicího boxu na 24 hodin. Poté jsou co nejrychleji vloženy do tekutého dusíku.

Kryomedium sice sníží krystalizační procesy v buňce, ale může mít velmi nežádoucí toxické účinky. Hlavním cílem vitrifikačních metod je proto vyvážit maximální rychlost zmrazování a minimalizovat koncentraci kryoprotektiva.

Přístrojové vybavení: Tato metoda nevyžaduje žádné specializované vybavení. K oddělení pevné a kapalné fáze vzorku je zapotřebí centrifuga. K přípravě kryomédia a zpracování samotného materiálu je kromě chemikálií zapotřebí také laminárního boxu, pipet a spotřebního materiálu jako jsou zkumavky nebo ochranné pomůcky. Pro zamrazení vzorků se využívá mrazicího boxu a v posledním kroku metody hlavně Dewarových nádob na tekutý dusík.

Odběr a transport: Metoda odběru závisí na materiálu, který se bude mrazit. Například odběr ovariální tkáně se provádí laparoskopicky. Množství tkáně je část ovariální kůry o rozměrech cca $10 \times 20 \times 1\text{ mm}$, nejlépe z obou ovarií. Naopak získání spermií pro kryokonzervaci je podstatně jednodušší – ejakulace do kelímku. Pro zpracování mononukleárních frakcí je zapotřebí odběru krve a následné oddělení krve do tří vrstev – vrchní vrstva plazmy, vrstva periferních krevních mononukleárních buněk a spodní frakce polymorfonukleárních buněk.

Všechny odebrané materiály jsou vloženy do předem připraveného média a v co nejkratším čase transportovány do laboratoře ke zpracování.