

Úvod, historie kryokonzervace a kryoprotektiva

doc. Ing. Michal Jeřeta, Ph.D.

Gynekologicko-porodnická klinika, LF MU a FN Brno

Organizace předmětu

EMKO0811p Kryoprezervace

- 1) Úvodní přednáška - základní metody kryoprezervace v biologii, historie technik kryokonzervace
- 2) Princip metod kryoprezervace tkání a buněk, kryoprotektiva a jejich užití v kryokonzervaci tkání
- 3) Vitřifikace embryí - způsoby, stádia mražení, doba uchovávání, požadavky SUKL
- 4) Vitřifikace oocytů - způsoby, efektivita, využití - dárcovský program, social freezing
- 5) Kryokonzervace spermií (podmínky skladování, typy nosičů, požadavky SUKL)
- 6) Kryokonzervace ovariální a testikulární tkáně
- 7) Legislativní a etické otázky spojené s kryokonzervací a uchováváním lidských gamet a embryí, současné trendy metod ART využívající vitřifikace. Neonatologické výsledky ve vztahu k vitřifikaci embryí a gamet

Zkouška: test otázky a,b,c maximální počet 30 bodů + 2 samostatné otázky za 5 bodů

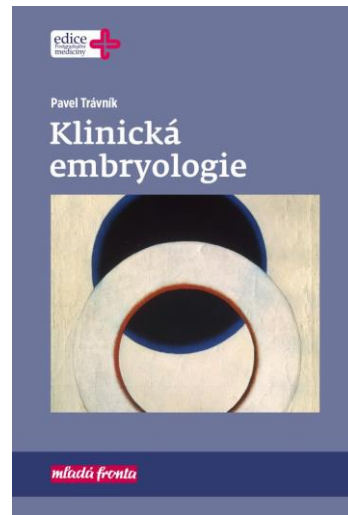
Maximální zisk 40 bodů, 37-40 A, 33-36 B, 29-32 C, 25-28 D, 21-24 E, pod 21 F

Literatura:

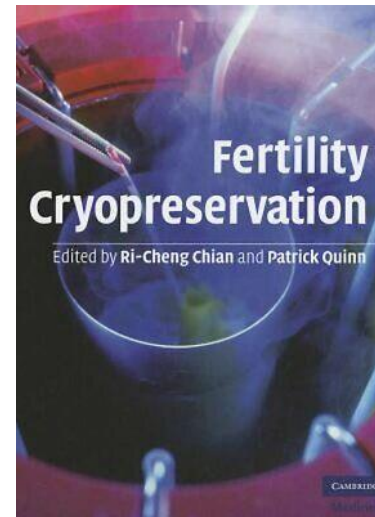
- pdf přednášek na IS MUNI



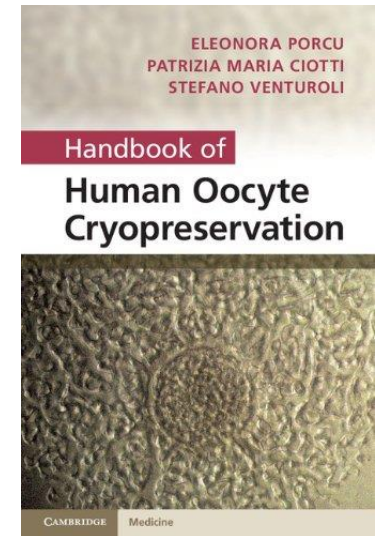
2018



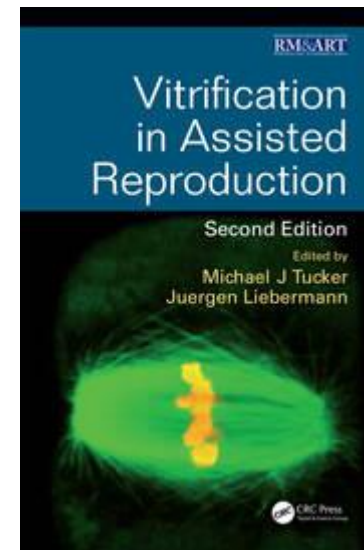
2018



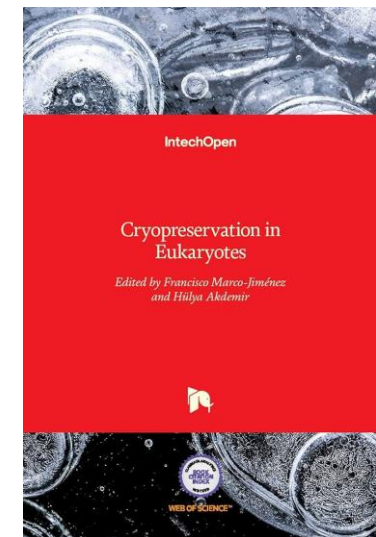
2010



2012



2016



2016

Historie kryokonzeravce

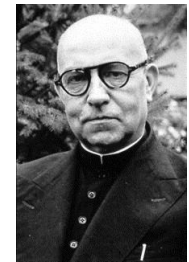
1668 – Rober Boyle, zakladatel moderní chemie zveřejnil práci „[New Experiments and Observations Touching Cold](#)“ irský filozof věřil, že některá zvířata lze zmrazit a opět oživit pokud se pomalu rozmrazí



1898 – ruský fyzik G. Tammann píše o tom, že molekuly sloučenin uhlíku mohou ztuhnout v podobě amorfního skla aniž by vytvořily krystaly



1940 – kniha „[Life and Death at Low Temperatures](#)“ základ pro další rozvoj oboru a její autor švýcarský kněz B.J.Luyet se stal otcem oboru kryobiologie



1949 – práce „[Revival of Spermatozoa after Dehydration and Vitrification at Low Temperatures](#)“ první efektivní použití glycerolu jako kryoprotektiva (Polge Christopher, Audrey Ursula Smith, and Alan Sterling Parkes)



Historie krykonzervace v ČR



- 1952 založení Tkáňové ústředny v Hradci Králové (prof. Klen)
- 1966 Ferox Děčín začal vyrábět kryokontejnery
- 1969 Sekce pro biologii nízkých teplot (prof. Klen) v ČSBS
- 1992 zahájen program krykonzervace embryí (FN Brno)
- 1993 první dítě po KET v ČR (FN Brno)
- 2003 první dítě narozené po vitrifikaci oocytů (Pronatal Praha)



Odborné společnosti



- The Society for Cryobiology založena v roce 1964

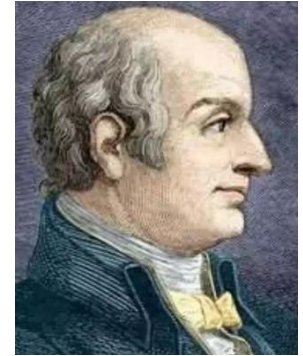


ČESKO-SLOVENSKÁ
BIOLOGICKÁ SPOLEČNOST, z.s.

- sekce pro biologii nízkých teplot v rámci České biologické společnosti, vznikla v roce 1969

Historie kryokonzervace v reprodukci:

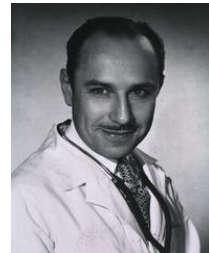
1775 - Lazaro Spallanzani se pokusil uchovat spermie ochlazením ve sněhu, první kdo popsal vliv nízkých teplot na spermie, první IUI u psa



1952 – první práce zaměřené na mražení **býčího ejakulátu** a jeho použití pro inseminace



1954 – technika mražení **lidských spermií** a jejich použití (J.K. Sherman, R. Bunge - University of Iowa)



1972 – první **myší mláďata** narozená po kryokonzervaci embryí (Ian Wilmut a DG Whitting)



Historie kryoprezervace v reprodukci - člověk



1983 – první těhotenství po KET lidských embryí, mražení 8 dní po IVF
(australští lékaři Trounson a Mohr)

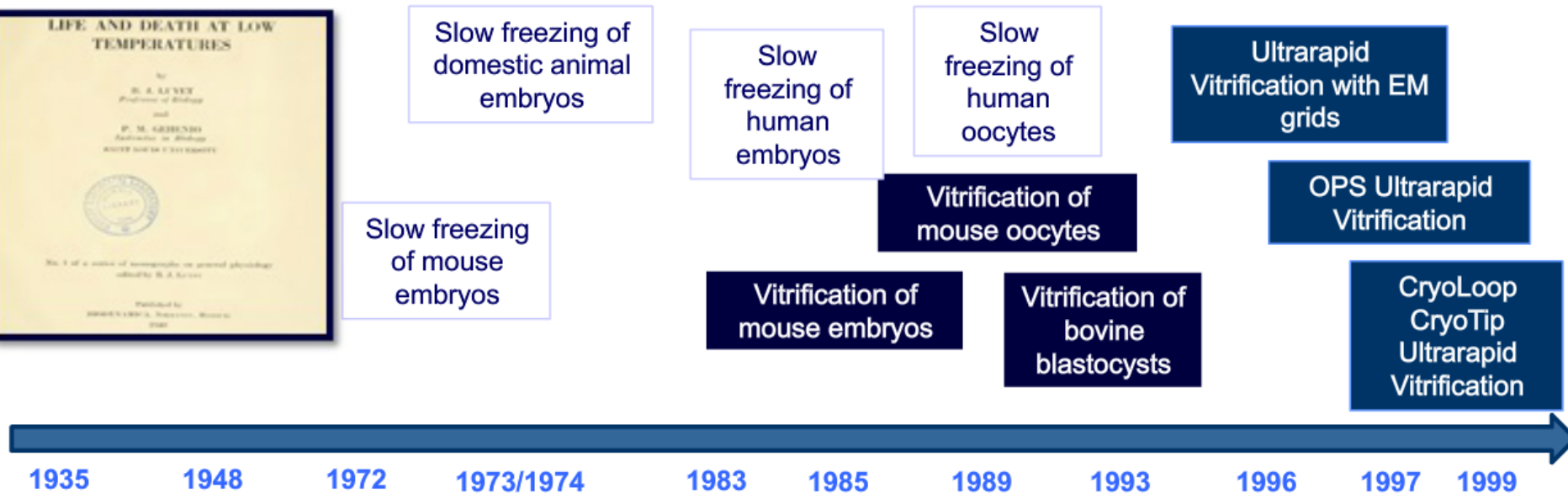
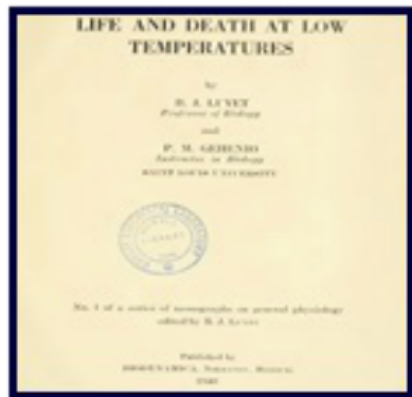
1986 – úspěšné mrazení lidských oocytů, porod dvojčat (australský vědec
Ch. Chen)

1999 – narození prvního dítěte po použití vitrifikovaných oocytů (doktorka
Lilia Kuleshova)



Historie kryokonzervace v IVF

History of cryopreservation in ART

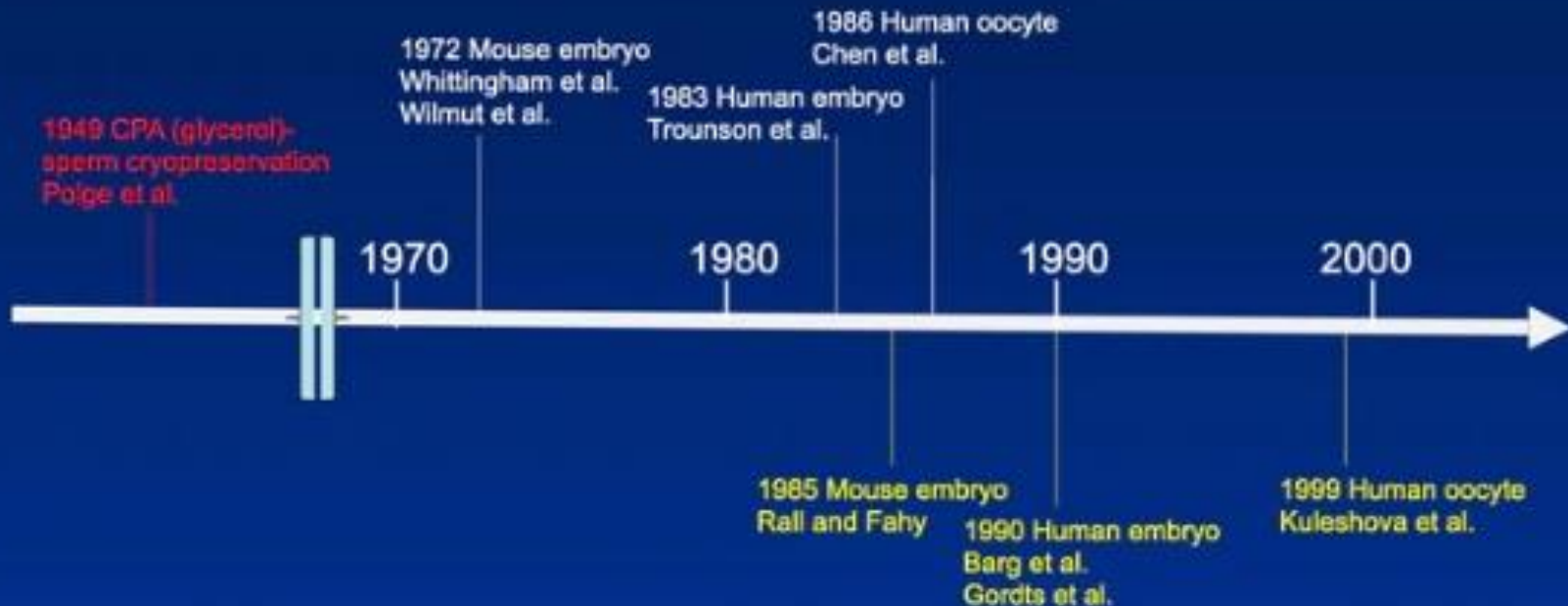


"It is more difficult to destroy a prejudice than an atom"

Albert Einstein

Historie kryokonzervace v IVF

1. Slow freezing (Equilibrium freezing)



2. Vitrification (Non-Equilibrium freezing)

Současnost



- kryokonzervace gamet a embryí je v dnešní době základní, nedílnou a nepostradatelnou součástí léčby neplodnosti nebo zachování plodnosti
- kryokonzervace je nutná pro politiku transferu jednoho embrya a uchování přebytečných embryí
- Nejčastější indikace ke KET:
 - odložení embryotransferu v případě OHSS
 - patologie dělohy
 - suboptimální budování endometria
 - preimplantační genetické testování, PGT (pouze 5. den)
- pokrok v posledních desetiletích umožnil kryokonzervaci lidských oocytů – nejnáročnější proces v kryokonzervaci lidských buněk

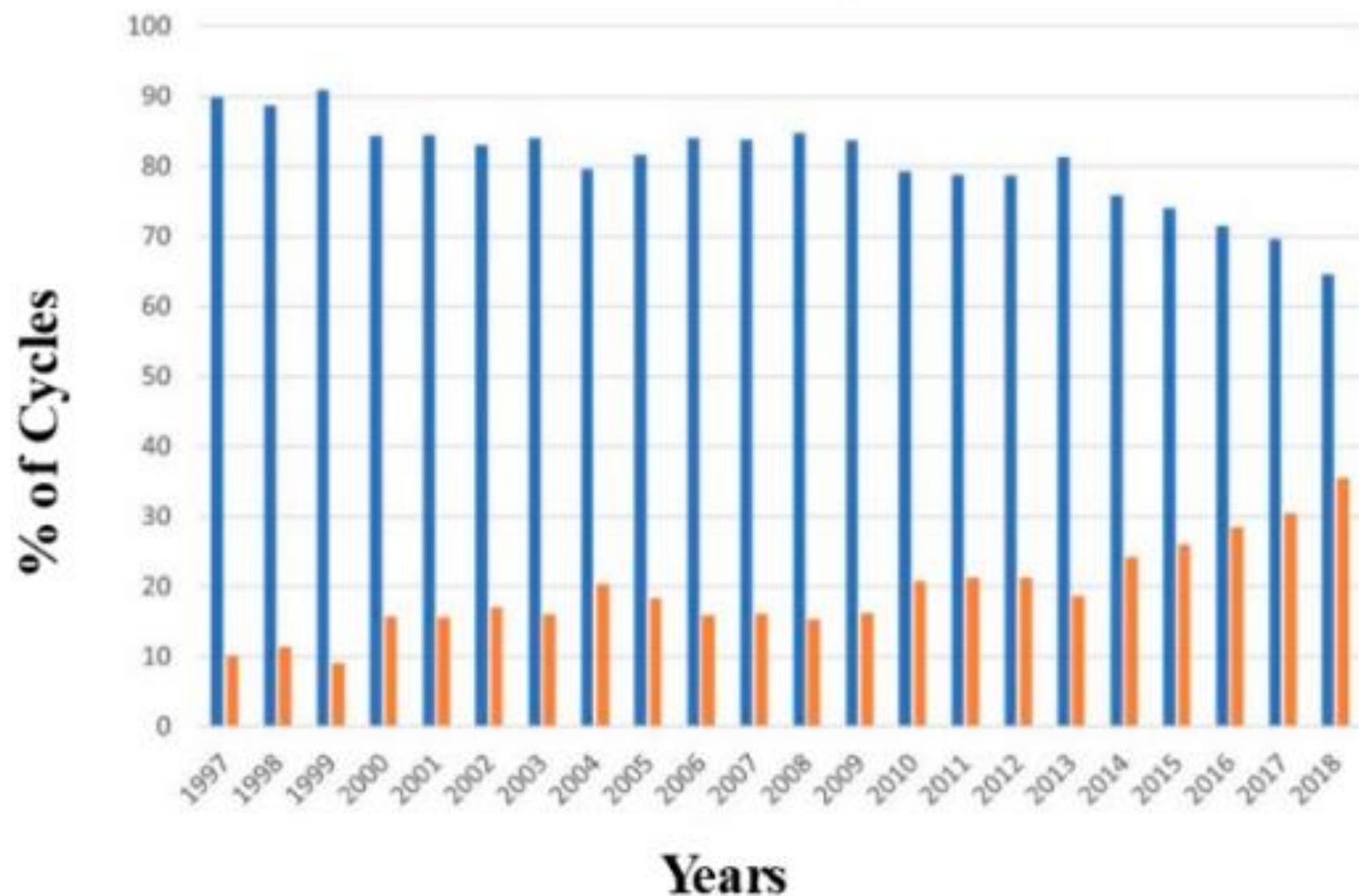
Současnost



- masivní rozšíření kryokonzervace
- technologie vitrifikace již zcela změnila dosah IVF laboratoře s "neuvěřitelným dopadem na každodenní život". Vitrifikace oocytů není "doplněk", ale hraje klíčovou roli v léčbě neplodnosti ve svém bezpečnostním potenciálu (segmentace, přenos jednoho embrya) a aplikaci (banka vajíček pro darování oocytů, zachování plodnosti u pacientů s rakovinou...).

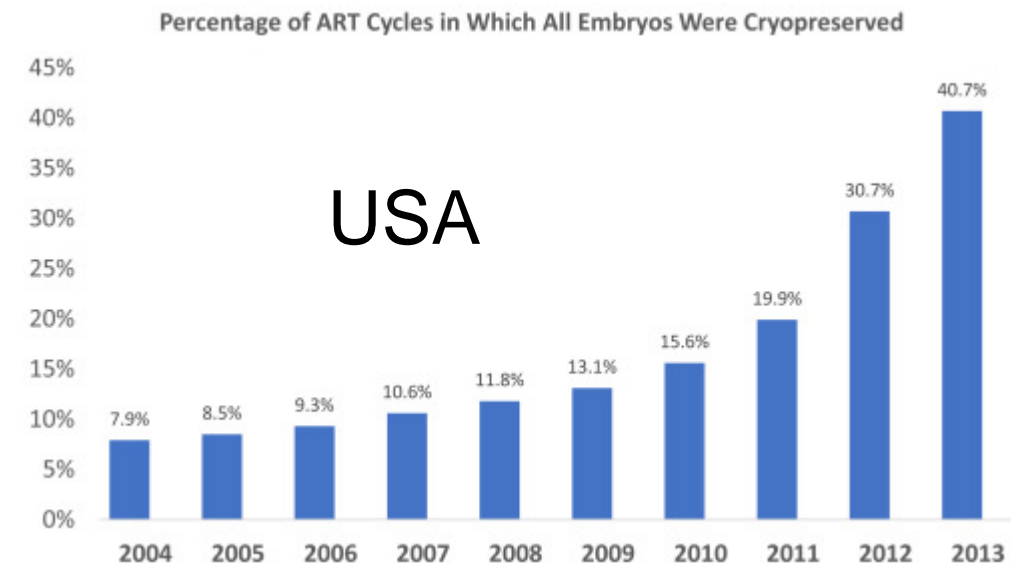
ESHRE Campus, Laura Rienzi 2022

Distribution in Europe of of Fresh Embryo Transfer and Frozen Embryo Transer



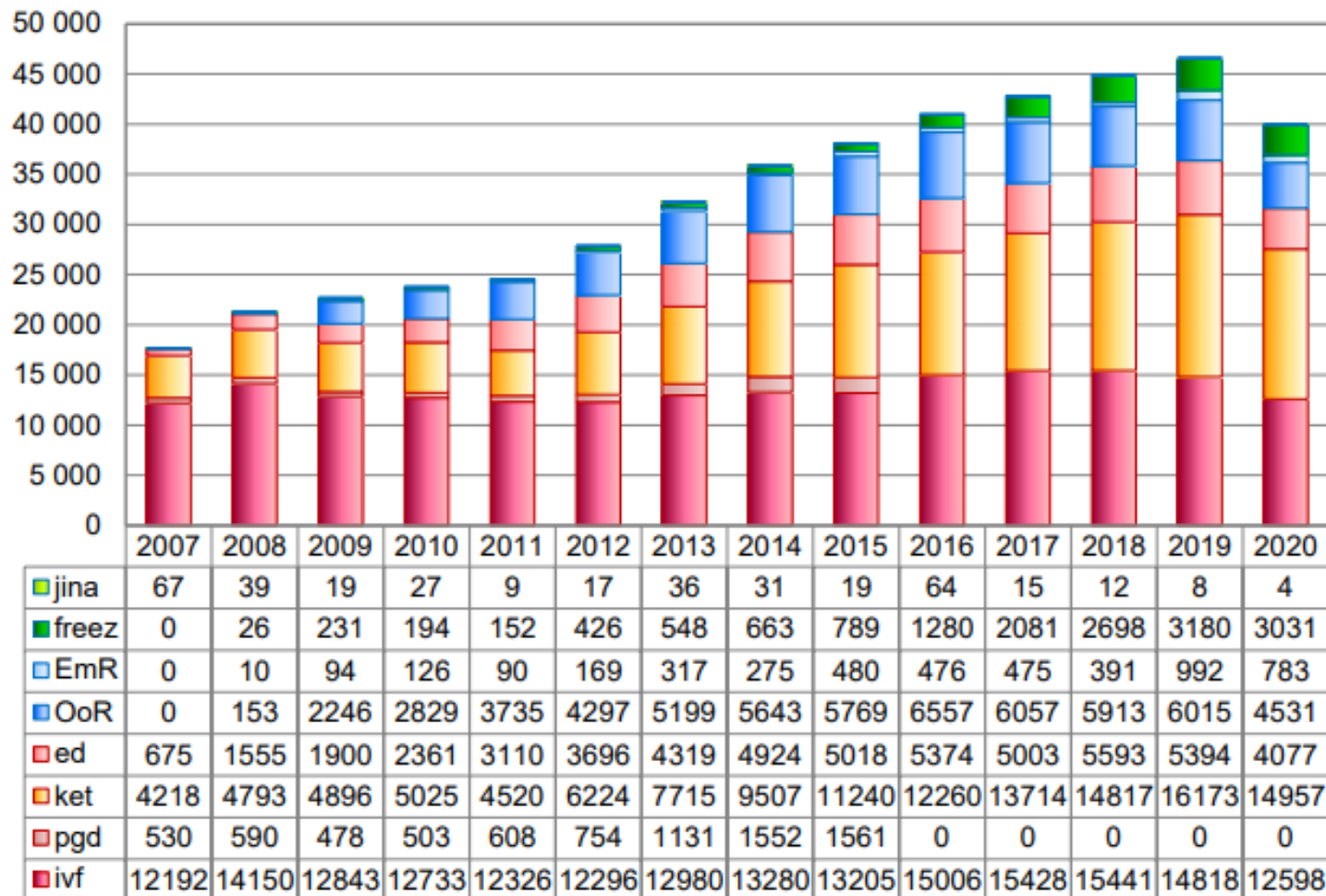
Počet narozených dětí ve světě (ESHRE 2023)

- celkem minimálně 12 milionů dětí od roku 1978
- Čína 900 tis.c., Japonsko 455 tis.c., USA 280 tis.c., Španělsko 129 tis.c.
- celosvětově je víc KET než FET
- v roce 2019 40 % FET a 60 % KET
- v roce 2019 38 % všech aspirací je freeze all

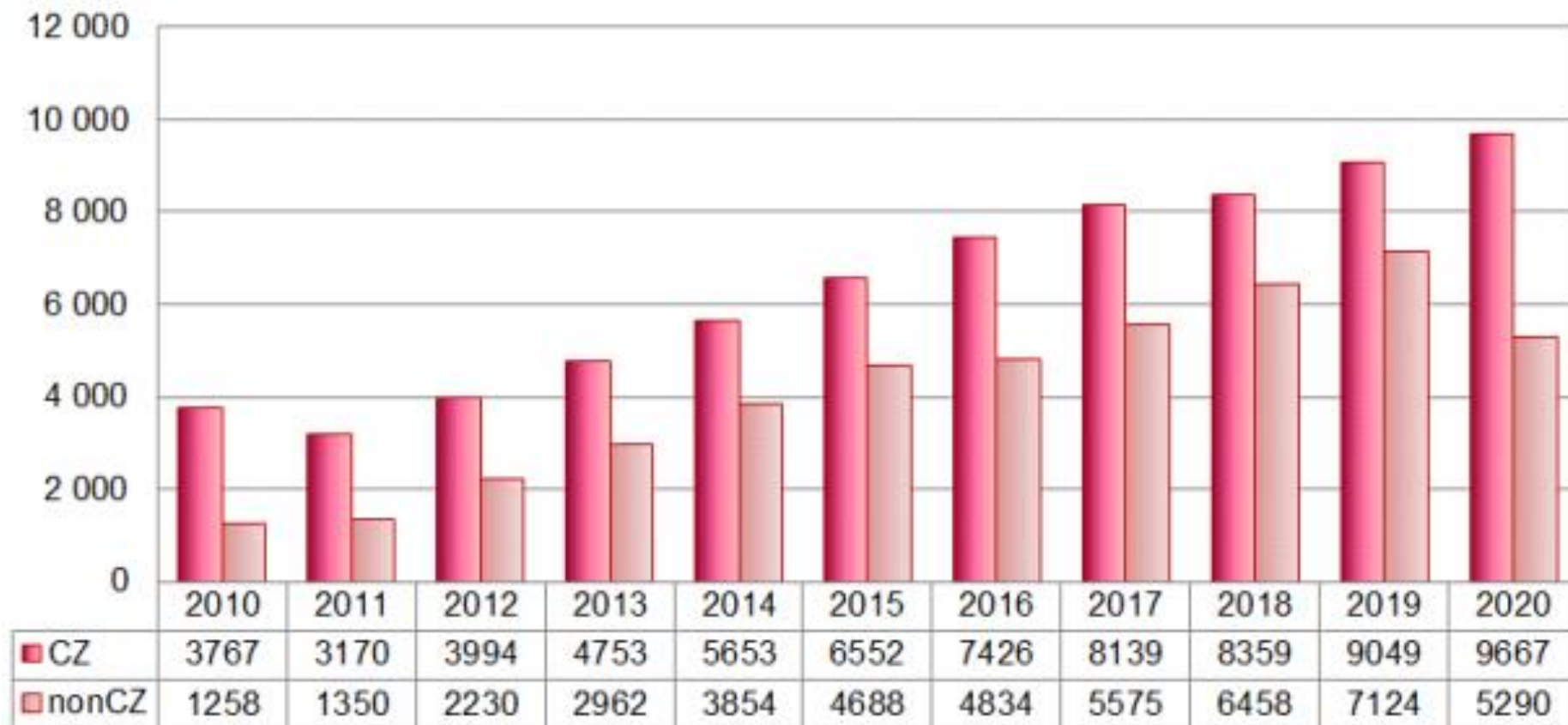


Neustále stoupá počet KET cyklů v ČR

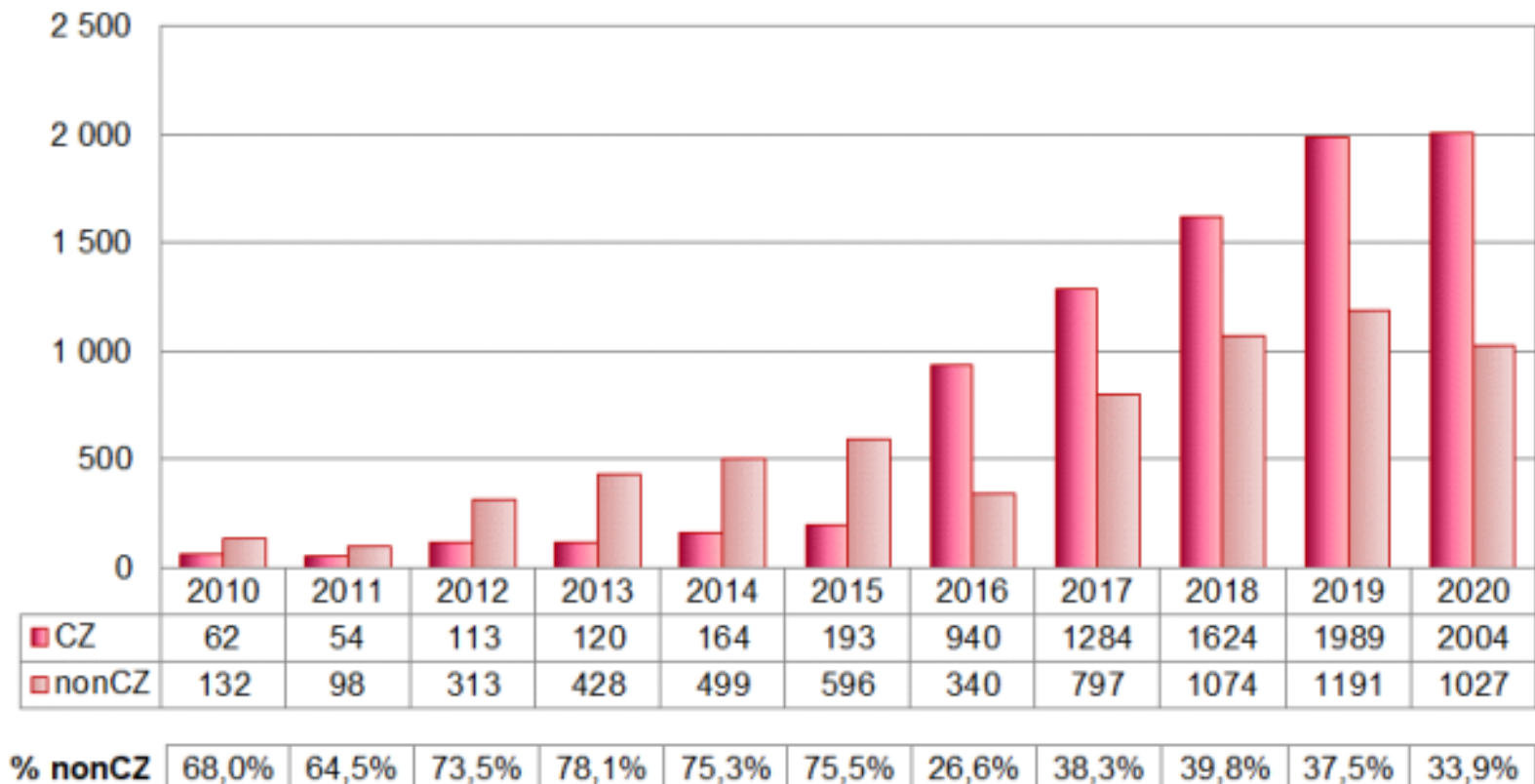
- díky strategii eSET (elektivní single embryo transfer) od roku 2010 narůstá KET
- narůstá počet cyklů freez all



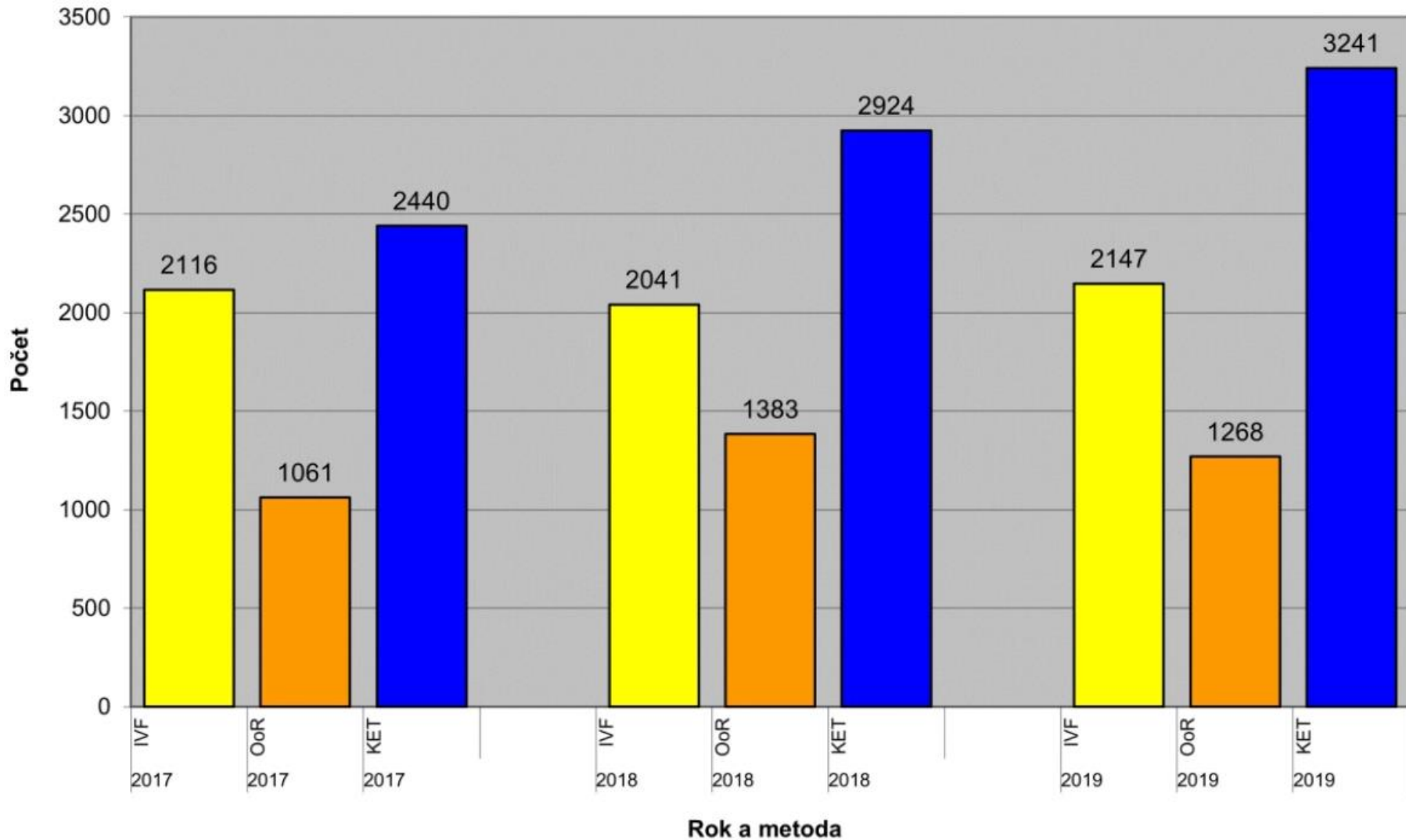
Cykly KET v ČR



Freeze all v ČR



Počet narozených dětí v ČR po IVF



Cycle segmentation

- freeze all "zmrazení všech" všech oocytů/embryí

optimalizována stimulace vaječníků, včetně konečného zrání oocytů spouštěného agonistou GnRH v antagonistickém cyklu (nevýhodou je časný nástup luteolýzy)

- všechny oocyty a/nebo embrya jsou kryokonzervovány ([segment A](#))
- přeneseny do receptivního endometria v následujícím cyklu ([segment B](#))

- touto strategií lze riziko OHSS téměř eliminovat
- zlepšení klinické míry těhotenství při použití kryokonzervovaných ve srovnání s čerstvými embryi
- kryokonzervace nemůže zaručit přežití všech embryí, ale tyto výsledky jasně podtrhují užitečnost kryokonzervace při zvyšování bezpečnosti IVF léčby

Metody kryokonzervace



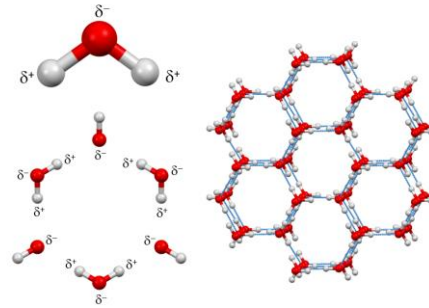
- původní hypotéza byla založená na tom, že se snižující se teplotou se zpomalují biologické děje a že tedy při zamrazení dojde k zastavení dějů, které se následně **po rozmrazení obnoví**
- bylo však zjištěno, že buňky během mražení a rozmražení **odumírají**
- dochází k poškození buněk vlivem krystalizace ledu a každá buňka má svůj optimální postup mražení rozmražení.

pokud je to příliš rychlé – krystalky buňku zabijí
pokud příliš pomalu – vážné poškození dehydratací

je obtížné mrazit orgány, kde je více typů buněk

- nadějí se proto stala vitrifikace – molekuly vody vůbec nemrznou a nevznikají krystaly, jen prostě ztuhnou ve svém neuspořádaném stavu – solidifikace, zeskelnění
- pro toto potřebujeme velice rychlé zamražení a velice vysokou koncentraci kryoprotektiv – vzorek je pak viskózní a nevzniknou ledové krystaly

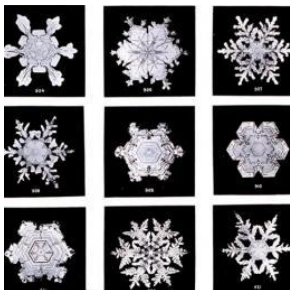
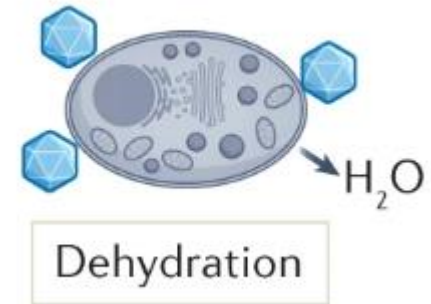
Krystalizace vody



- maximální hustota vody je při 4°C
- krystalizace na různých defektech (např. prachové částice)
- destilovanou vodu lze zchladit na -15°C bez krystalizace
- malý podnět způsobí její krystalizaci, T_g je -137 °C
- krystalizace v hexagonální soustavě, lomenný tvar molekuly vody s úhlem 105°
- uspořádávají do šestiúhelníkového tvaru tak, že na jednu molekulu vody se vážou celkem čtyři další
- vznik skla – vitrifikace – **ztráta rotačních a translačních stupňů volnosti** za zachování pouze vazebných vibrací uvnitř pevné molekulární struktury

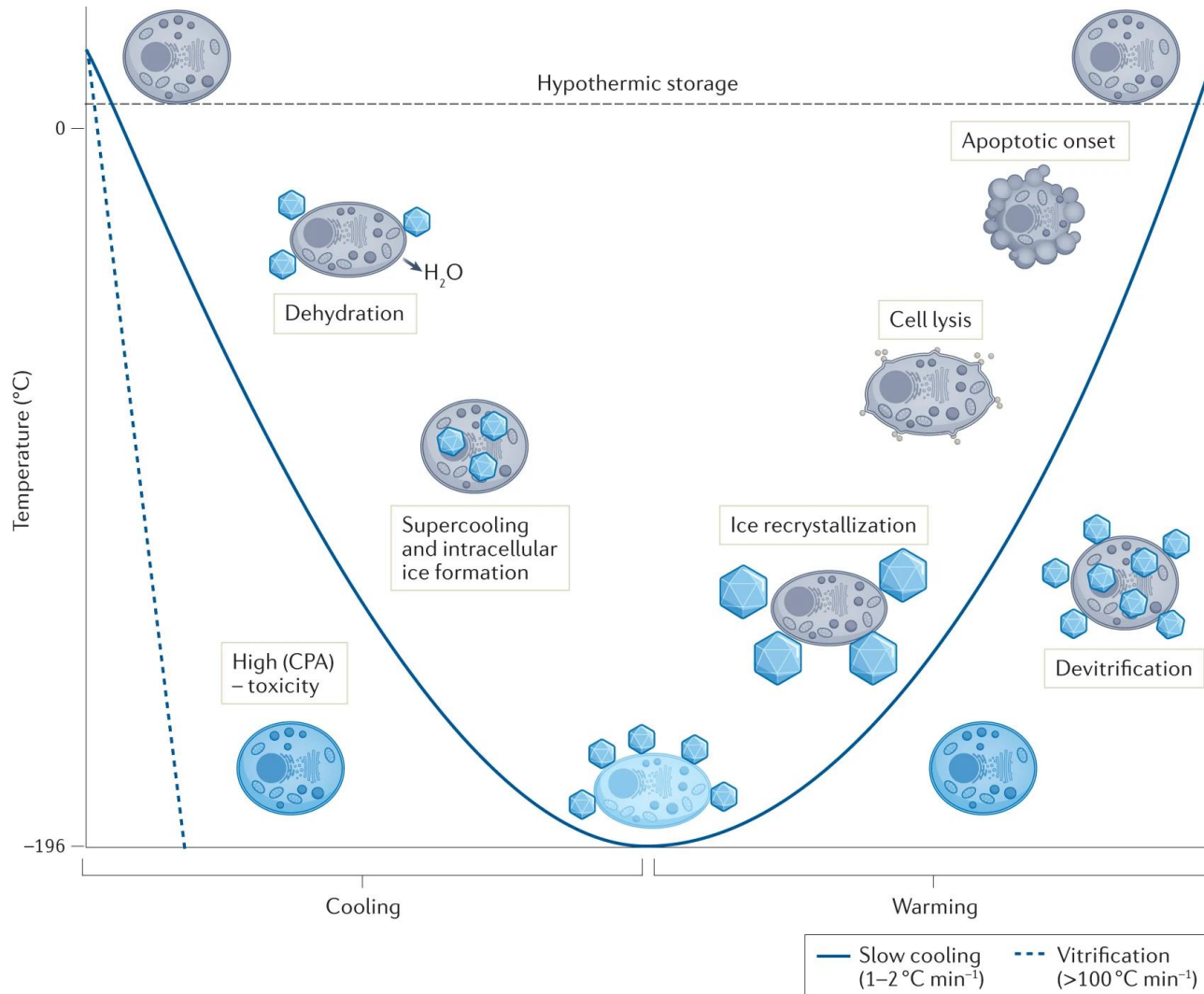
Krystalizace vody v buňkách

- buňky cca 90 % vody
- nejprve krystalizace extracelulární tekutiny
- zvyšuje se koncentrace látek extracelulární nezmrzlé frakci a tím vzniká **osmotický gradient** mezi intra a extracelulárním prostorem
- buňka se to snaží vyrovnat vypuzováním vody – dojde k **buněčné dehydrataci** vedoucí k strukturním změnám buněčné membrány
- membrána je poškozená a buňka umírá
- intracelulární krystalizace vede k poškození buňky
- pokud ovšem je ochlazení příliš rychlé, tak se buňka vody nezaví a vzniknou intracelulární krystaly



Supercooling and intracellular ice formation

Poškození buněk při mražení



Kryoprotektiva - CPA

- vznikají v tělech arktických a antarktických zvířat (hmyz, ryby, obojživelníci) aby minimalizovaly poškození mrazem během zimní periody roku
- kryoprotektivum by mělo být vysoce solubilní, penetrující a minimálně toxické
- cílem kryoprotektiv je oddělit maximální množství vody od buněk před samotným zamrazením
- voda je v embryonálních buňkách nahrazována permeabilními roztoky kryoprotektiv na základě rozdílné koncentrace mezi extra a intracelulárním médiem - tím se redukuje vznik nitrobuněčných ledových krystalů
- během výměny látek dochází k mírnému **osmotickému smršťování**, které ale nepoškozuje embryo
- velmi **dlouhé vystavení embrya hyperosmotickému roztoku** může vést k silné dehydrataci a toxicitě

Kryoprotektiva v přírodě

- některé druhy hmyzu hromadí kryoprotektiva ve svém těle před nástupem zimy
- larva drozofilní mouchy *Chymomyza costata* je pravděpodobně nejsložitějším organismem, který dokáže přežít ponoření do kapalného dusíku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) v plně hydratovaném stavu.
- larva pakomára *Chironomus* například obsahuje nezmrazenou tekutinu ještě při $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$
- parazitická vosa *Brochon cepti* si vytváří glycerol, jehož koncentrace se v zimě zvyšuje. Glycerol snižuje bod tuhnutí na $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$, ale je známo, že larvy přežily ochlazení až na $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$
- krev arktických ryb *Trematomus* zase obsahuje glykoproteinovou nemrznoucí směs, která je 200 až 500krát účinnější než sůl. Snižuje teplotu, za které se ledové krystalky zvětšují



AFP – antifreeze proteins, AFGP – antifreeze glycopeptides

- snižují bod tuhnutí vody a **zabraňují růstu ledových krystalů** ve zmrzlém stádiu, brání rekrystalizaci
- lze nalézt v různých zdrojích, jako jsou **ryby, kvasinky, rostliny, bakterie a hmyz**
- AFP mají široké uplatnění při mrazení potravin, ochranu mrazových rostlin, kryochirurgii a kryokonzervaci buněk a tkání
- **AFGP8** z aljašské tresky *Boreogadus saida* zlepšil kryotoleranci bovinních blastocyst a oocytů
- AFP/AFGP jsou testovány jako kryoprotektiva pro mrazení spermií



Kryoprotektiva

- zmrazovací techniky jsou založeny na použití jedné, nebo více ochranných látek proti zmrznutí – kryoprotektiv (CPA)

Způsoby působení:

- **vážou vodu** a tím redukuje toxické vlivy vysokých koncentrací dalších sloučenin
- **ochraňují buňky** během pomalého mražení, kdy jsou buňky velmi dehydrované a jsou obklopeny koncentrovanými solemi
- ve vysokých koncentracích **minimalizují poškození** způsobené vznikem ledových krystalů

pro procesy pomalého mražení se používají koncentrace kryoprotektiv okolo 1,5 M, pro vitrifikaci i více než 4 M

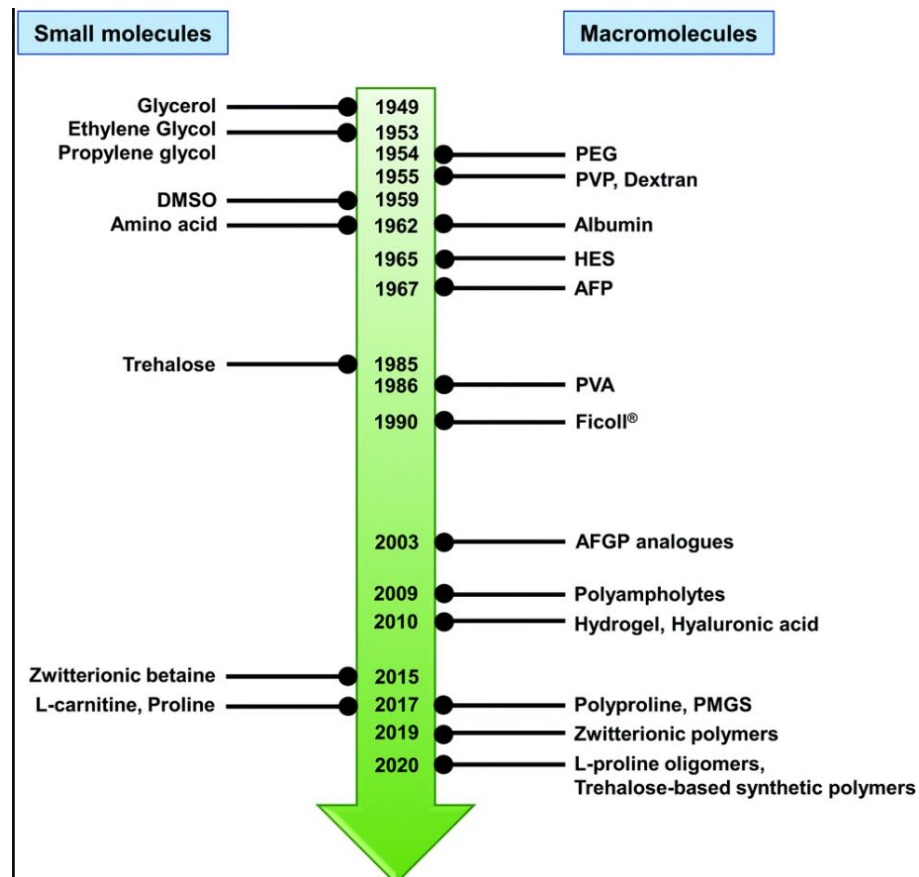
Objev kryoprotektiv:

1949 – Christopher Polge realizuje své experimenty na kohoutích spermích, kdy přidával glycerol do vzorků aby zvýšil viskozitu vzorků a studoval pohyb spermíí, zároveň používal kapalný dusík pro sledování dalších vzorků a sledování jejich struktury, omylem dal vzorek spermíí v glycerolu do kapalného dusíku (záměna lahviček v lednici) !! Poté co vzorek zahřál byl překvapen, že se spermie stále hýbou.

- tak byl objeven kryoprotektivní efekt glycerolu, který zabraňuje tvorbě krystalů během mražení cestou dehydratace buněk



Historie objevů kryoprotektiv



Kryoprotektiva - působení

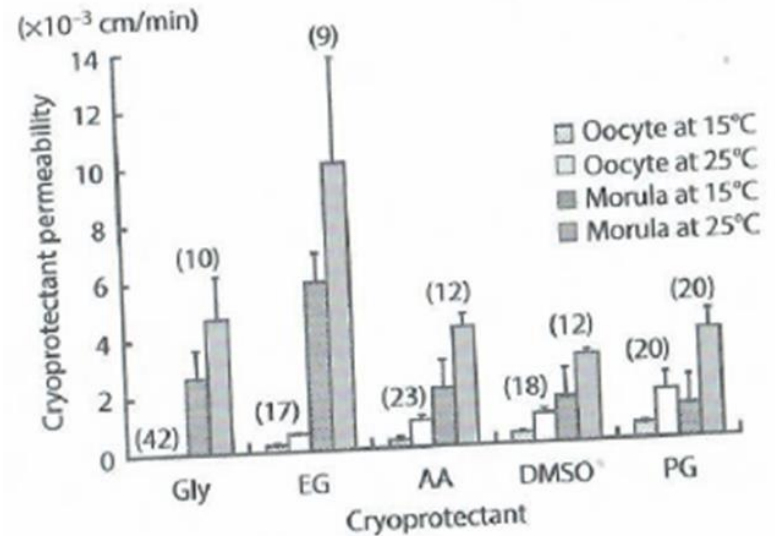
Kryoprotekce působí dvěma způsoby:

- má vliv na fázový přechod roztoku do pevného stavu
- obalí membránu buňky a chrání ji před mechanickým poškozením krystaly z extracelulárního prostoru

Z hlediska vlivu na fázový přechod, resp. vznik krystalické fáze roztoku můžeme kryoprezervační materiály rozdělit:

1. **třída**: například, dimethylsulfoxid (DMSO), trehalóza, či sacharóza, které upravují termodynamiku procesu mražení
2. **třída**: například antifreeze proteiny (AFP), které se dokáží navázat na rostoucí krystal ledu a zamezit dalšímu růstu.

Kryoprotektiva



různorodá skupina látek, které se liší toxicitou, rychlostí přechodu do buňky a bodem tání (T_m) a bodem solidifikace (T_g)
propustnost membrán pro kryoprotektiva se liší u oocytů, embryí a blastocyst,
proto jsou pro mrazení jednotlivých stádií vhodná různá kryoprotektiva

Chemická kryoprotektiva se dělí:

- **Penetrující:** ovlivňují biochemické a strukturální vlastnosti membrán, čímž zvyšují toleranci k mrazu, stabilizují proteiny a DNA, minimalizují osmotické změny (ethylenglykol, DMSO, 1,2-propandiol)
- **Nepenetrující:** fungují jako osmoticky dehydratační, minimalizují toxický efekt penetrujících, zvyšují osmotický tlak okolí, dehydratují (trehalóza, sacharóza, PVP)

Penetrující

Glycerol, DMSO (dimethylsulfoxid), Ethylenglykol, 1,2-propandiol (CG exocytóza)

vysoká polarita, tvoří vodíkové vazby s molekulou vody (DMSO)
 snadno pronikají do buněk osmózou přes akvaporinové kanály
 část intracelulární vody je nahrazena CPA
 některé zhoršují permeabilitu pro vodu – horší dehydratace

Způsobují zvýšení viskozity vedoucí k:

- zpomalení pohybů vody
- zpoždění jevu nukleace
- snížení rychlosti růstu ledových krystalů
- omezení velikosti krystalů mezi T_m a T_g
- zhoršení tvorby krystalů

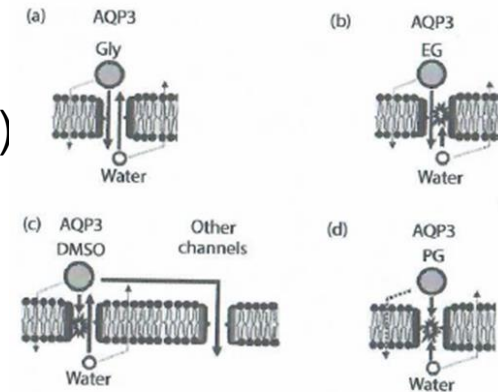


Figure 5.4 Schematic representation of the pathway for the movement of cell-permeating cryoprotectants and water in the presence of cryoprotectants across the plasma membrane of mouse oocytes and morulae. Solid lines indicate the movement of water and cryoprotectants across the plasma membrane by facilitated diffusion via channel pathways, whereas dotted lines indicate the movement of water and cryoprotectants by simple diffusion. (a) The movement of water and glycerol (Gly). (b) The movement of water and ethylene glycol (EG). (c) The movement of water and dimethyl sulfoxide (DMSO). (d) The movement of water and propylene glycol (PG). "Other channels" refers to DMSO-permeable channels. Open circles represent water molecules; shaded circles represent cryoprotectant molecules. (AQP3 = aquaporin 3.) (Modified from Kasai M, Edashige K. *Fertility Cryopreservation*. Cambridge University Press: Cambridge, 2010. p. 16–23.)

Nepenetrující

Sacharóza, Manitol, Sorbitol, Trehalóza

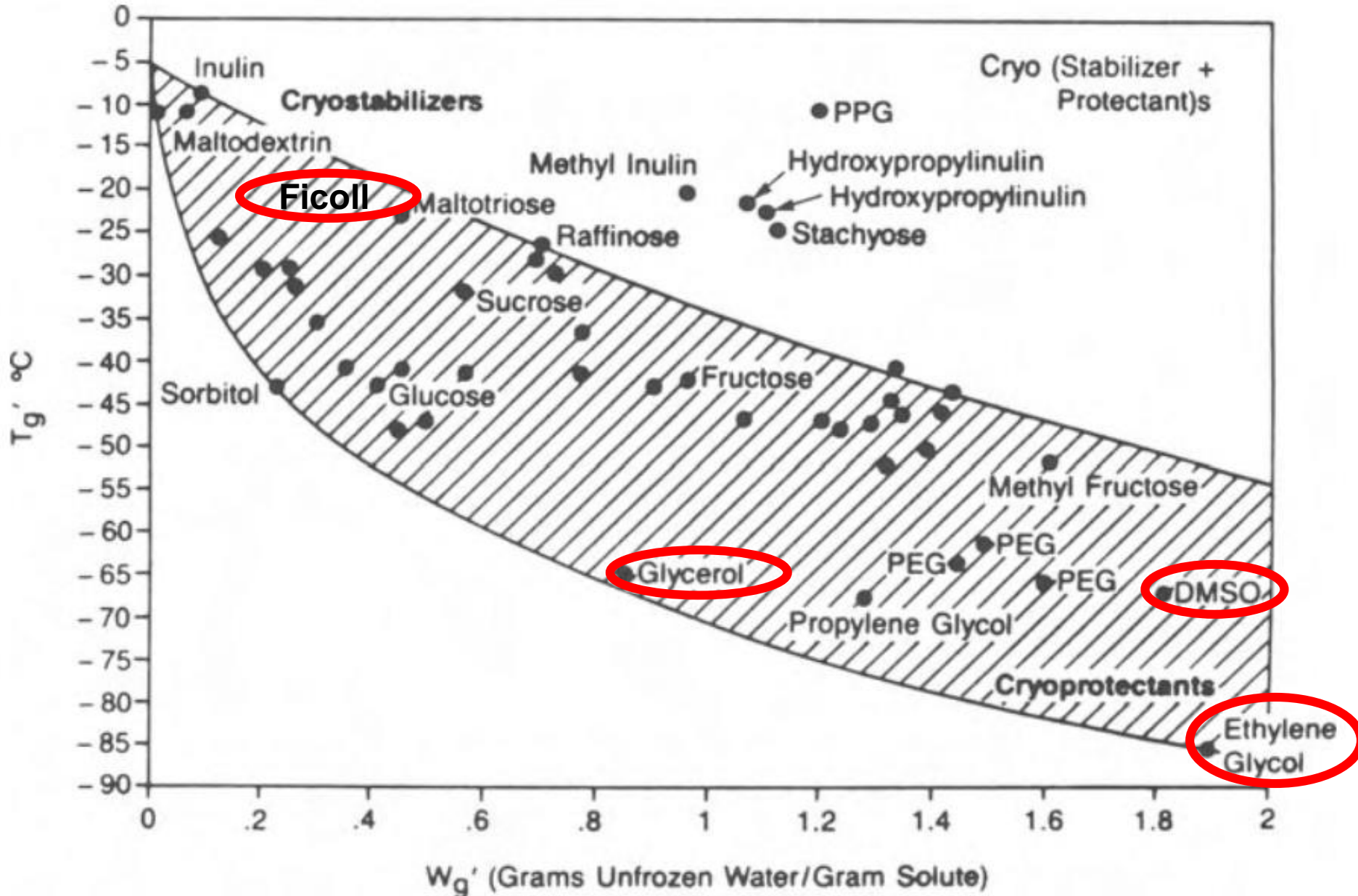
vysokomolekulární látky, Ficoll, polyvinylpyrrolidon (PVP)

hyaluronan, dextran, polyethylenglykol

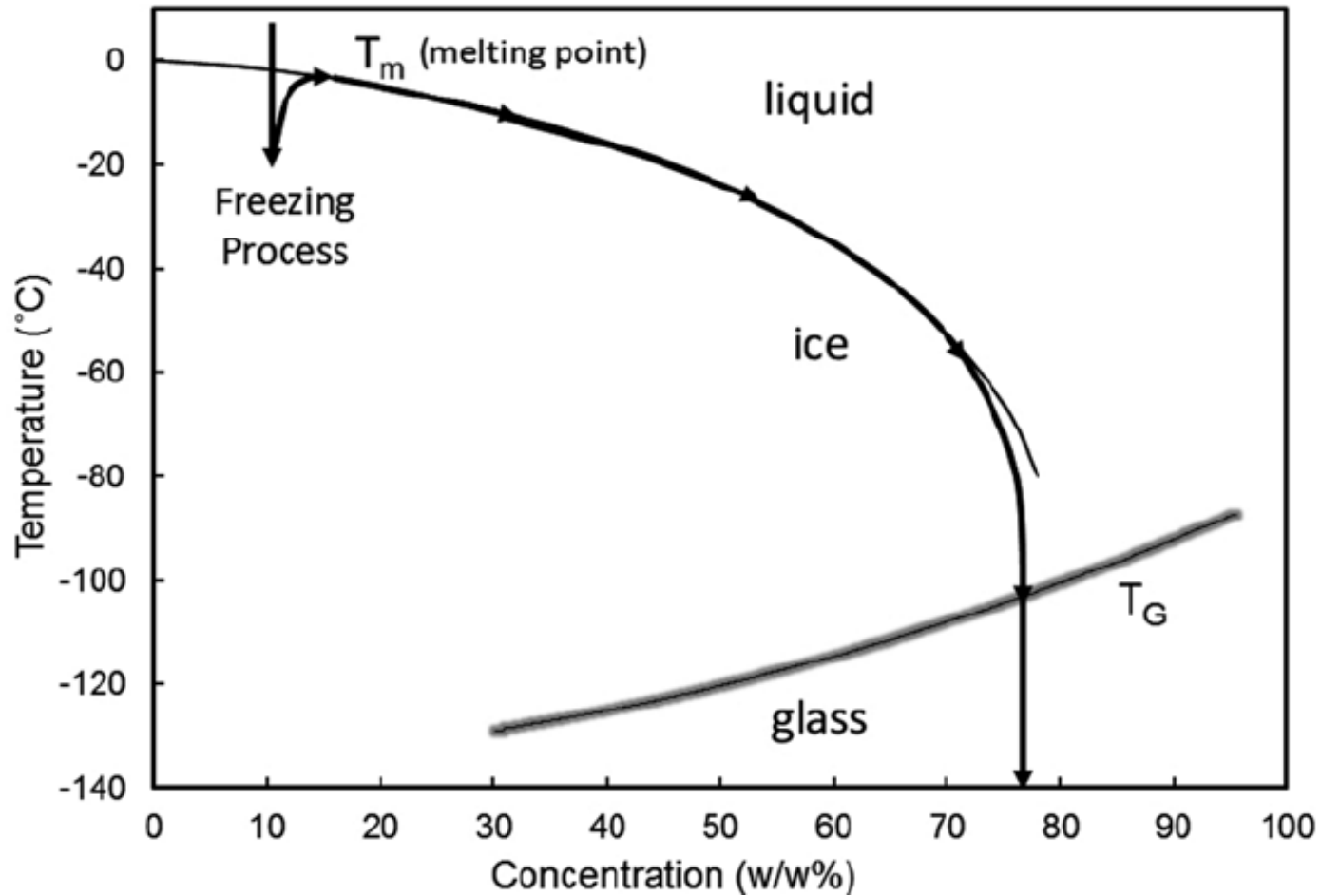
polyvinylalkohol, sérum a jeho složky

- vytváří osmotický tlak na membrány buněk
- podporují dehydrataci buněk, netoxické
- chrání membrány před poškozením extracelulárními krystaly
- častou součástí rozmrazovacích médií, chrání před osmotickým šokem

Teplotní bod solidifikace T_g



Roztok glycerolu během mražení

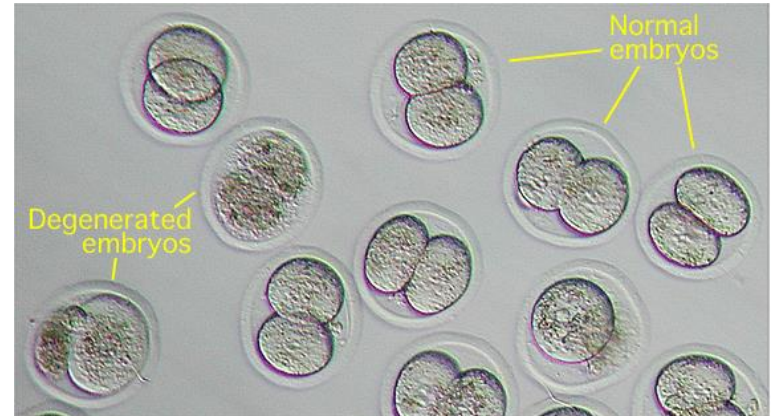


CPA - přehled

Table 1. Cryoprotective agents.

Alcohols and Derivatives	Sugars & Sugar alcohols	Polymers	Sulfoxides & Amides	Amines
Methanol ^b	Glucose ^b	Polyethylene glycol (PEG) ^c	Dimethyl sulfoxide ^e	Proline ^c
Ethanol ^a	Galactose ^b	Polyvinyl pyrrolidone (PVP) ^b	Acetamide ^b	Glutamine ^b
Glycerol ^d	Lactose ^a	Dextrans ^c	Formamide ^b	Betaine ^b
Propylene glycol ^c	Sucrose ^{ac}	Ficoll ^c	Dimethyl acetamide ^a	
Ethylene glycol ^c	Trehalose ^c	Hydroxyethyl starch ^c		
	Raffinose ^c	Serum proteins (complex mix) ^c		
	Mannitol ^{ab}	Milk proteins (complex mix) ^{ab}		
	Sorbitol ^a	Peptones ^a		

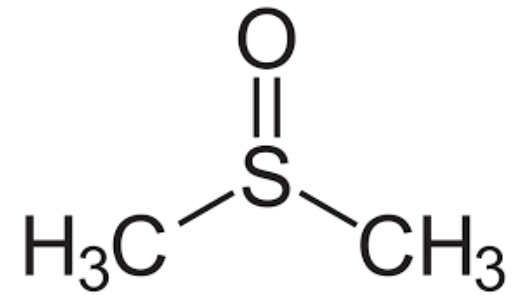
Ochrana buněk při kryokonzervaci



Poškození v důsledku:

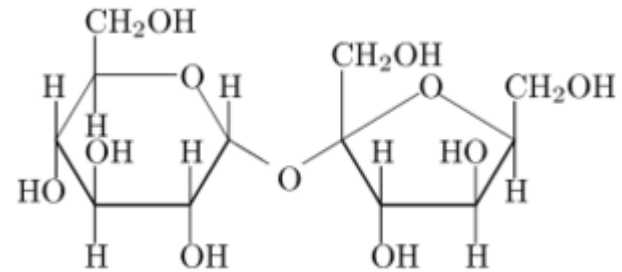
- použití CPA o příliš vysoké koncentraci nebo po příliš dlouhou dobu
- použití nevhodných CPA
- špatný postup zamrazování
- nevhodná teplota při mražení, uchovávání či rozmražení
- špatný průběh ochlazování či zahřátí
- kontaminace infekčním agens

Dimethyl sulfoxid - DMSO



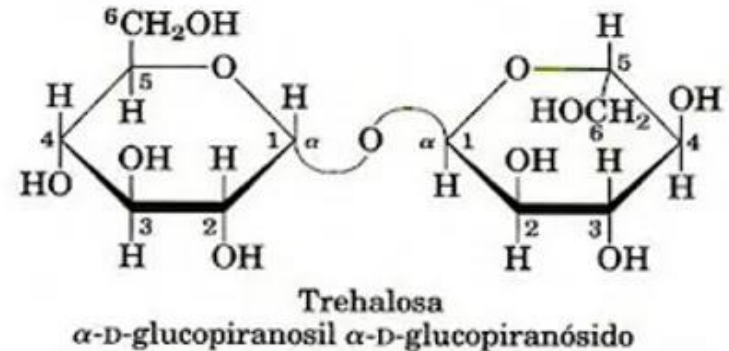
- významné polární rozpouštědlo
- bezbarvá, hyroskopická kapalina, prakticky bez zápachu či s lehkým česnekovým odérem, s nasládlou chutí
- MW 78,13 g/mol, Tg -65°C, Tm 19°C
- DMSO je **běžné kryoprotektivum**, v současnosti je nejčastěji součástí kryoprotektivních směsí, například s EG tvoří dobře rozpustitelnou směs, u které bylo dosaženo výborných kryoprotektivních výsledků u embryí
- **cytotoxické** pro některé bunky (koncentrace nad 10 w/w%)
- spojována s toxicitou na buněčných membránách
- možný vliv na epigenetický profil buňky, snadno proniká kůží, narkotické účinky
- kryoprotektiva s malou molekulou (jako DMSO), jsou obecně výhodnější, **rychleji prostupují do buněk a zkracují expoziční dobu**. Při rozmražení se DMSO rychle dostává z buněk, buňky mohou rychle nabýt na svém původním objemu a předejít osmotickému poškození

Sacharóza



- $C_{12}H_{22}O_{11}$
- MW 342,3g/mol, Tg 60°C, Tm 186 °C
- bílá krystalická látka se sladkou chutí, rozpustná ve vodě
- běžně používaný kryoprotektant
- velkou molekulu patří mezi nepronikající kryoprotektiva a její vlastností je osmoticky dehydratovat buňku a tím jí chránit před krystalizací, která by poškodila buněčné membrány
- požitelný sacharid, není toxická, nedráždí, není genotoxická

Trehalóza



- $C_{12}H_{22}O_{11}$
- MW 342,3 g/mol, **Tg 106°C !!**, Tm 203°C
- bílá krystalická látka se sladkou chutí, rozpustná ve vodě, ethanolu, benzenu a dimethyletheru
- je více **účinný kryoprotektant** než běžně používané kryoprotektanty (sacharóza, matlóza)
- velkou molekulu patří mezi nepronikající kryoprotektiva a její vlastností je **osmoticky dehydratovat buňku** a tím jí chránit před krystalizací, která by poškodila buněčné membrány
- požitelný sacharid, není toxická, nedráždí, není genotoxická
- se zvyšující se koncentrací trehalózy se snižuje schopnost vody tvořit celistvé krystaly, vytváří se polyamorfní krystality

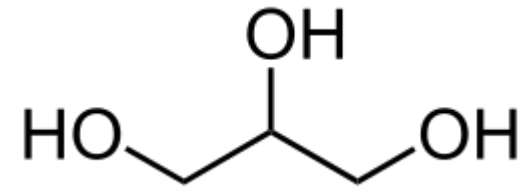
Ethylenglykol



- ethan-1,2-diol (nebo 1,2-ethandiol)
- MW 62,07 g/mol
- teplota varu 197,3°C
- teplota tání -12,9°C, Tg -85°C
- pro myší embrya a blastocysty je málo toxický a rychle difunduje skrz zona pellucida a přes membrány
- nejméně toxický pro buňky ze všech penetrujících CPA
- velice často používaná na embrya
- chladící kapaliny, sladká chuť, velice jedovatý pro člověka (příčinou toxicity není ethylenglykol samotný, nýbrž jeho metabolity), otrava častá (100 ml smrtelná dávka)

– *po požití Fridexu podat otrávenému větší množství tvrdého alkoholu (např. vodky), tím utlumíme metabolismus ethylenglykolu, protože tělo bude přednostně odbourávat ethanol z vodky.*

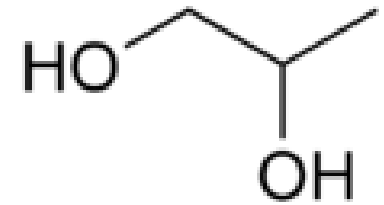
Glycerol



- první objevené kryoprotektivum
 - Tg -65 °C, bod tání 17,8 °C, MW 92,1 g/mol
 - pomaleji prostupující než DMSO či propandiol
 - tříuhlíkatý cukerný alkohol
 - bezbarvá viskózní kapalina bez zápachu, sladké chuti
 - propan-1,2,3-triol
 - často v kosmetice
 - glycerinové čípky
-
- velice nízká toxicita oproti ostatním penetrujícím CPA
 - vyšší osmotická lýza oproti DMSO



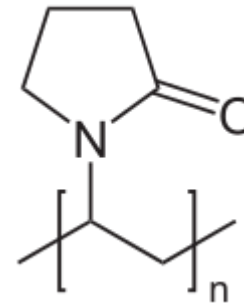
Propandiol



- často používané na mražení časných embryí
- propan-1,2-diol, propylenglykol
- MW 76,1 g/mol
- bod tání -59 °C, Tg -68 °C
- tradiční CPA, jedno z nejdéle používaných kryoprotektiv
- menší toxicita než DMSO
- málo dráždivý, není kancerogenní a genotoxický
- hlavní součást deodorantů, e-cigaret, vonné oleje
- lékařský lubrikant, chladící médium



Polyvinylpyrolidon PVP



- neprostupující CPA, stabilizátor potravin E1201
- MW 2 500 – 25 000 000 g/mol, bod tání 130 °C
- může ovlivnit integritu nukleových kyselin

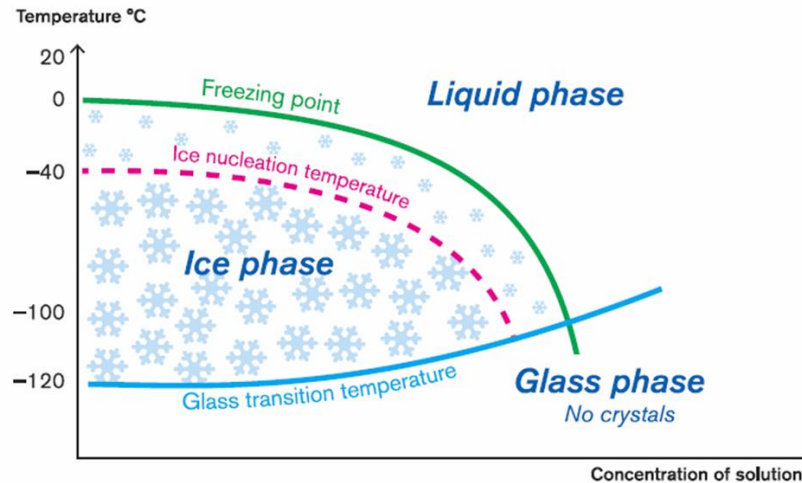
- makromolekuly, jako je polyEG, Ficoll nebo polyvinylpyrrolidon, které se používají jako doplňky ve vitrifikačním médiu, podporují vitrifikaci s nižšími koncentracemi CPA

- dalším zvýšením rychlosti ochlazování (>10 000 °C/min), která je potřebná pro úspěšnou vitrifikaci oocytů/embryí, se konečný objem vitrifikačních mikrokapiček snížil a to až na 1 µl.

Polymerní CPA

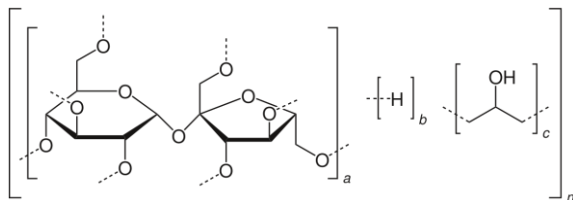
- vyšší T_g než penetrující
- jejich použití zvyšuje viskozitu roztoku zvyšuje T_g a snižuje teplotu tání T_m
- tyto CPA tak zkracují dobu změny teploty T_m až T_g - která je obecně dobou kdy dochází k tvorbě škodlivých extracelulárních krystalů
- zmírňují negativní dopad penetrujících makromolekul na buňky

mnoho typů makromolekul s kryoprotektivním účinkem

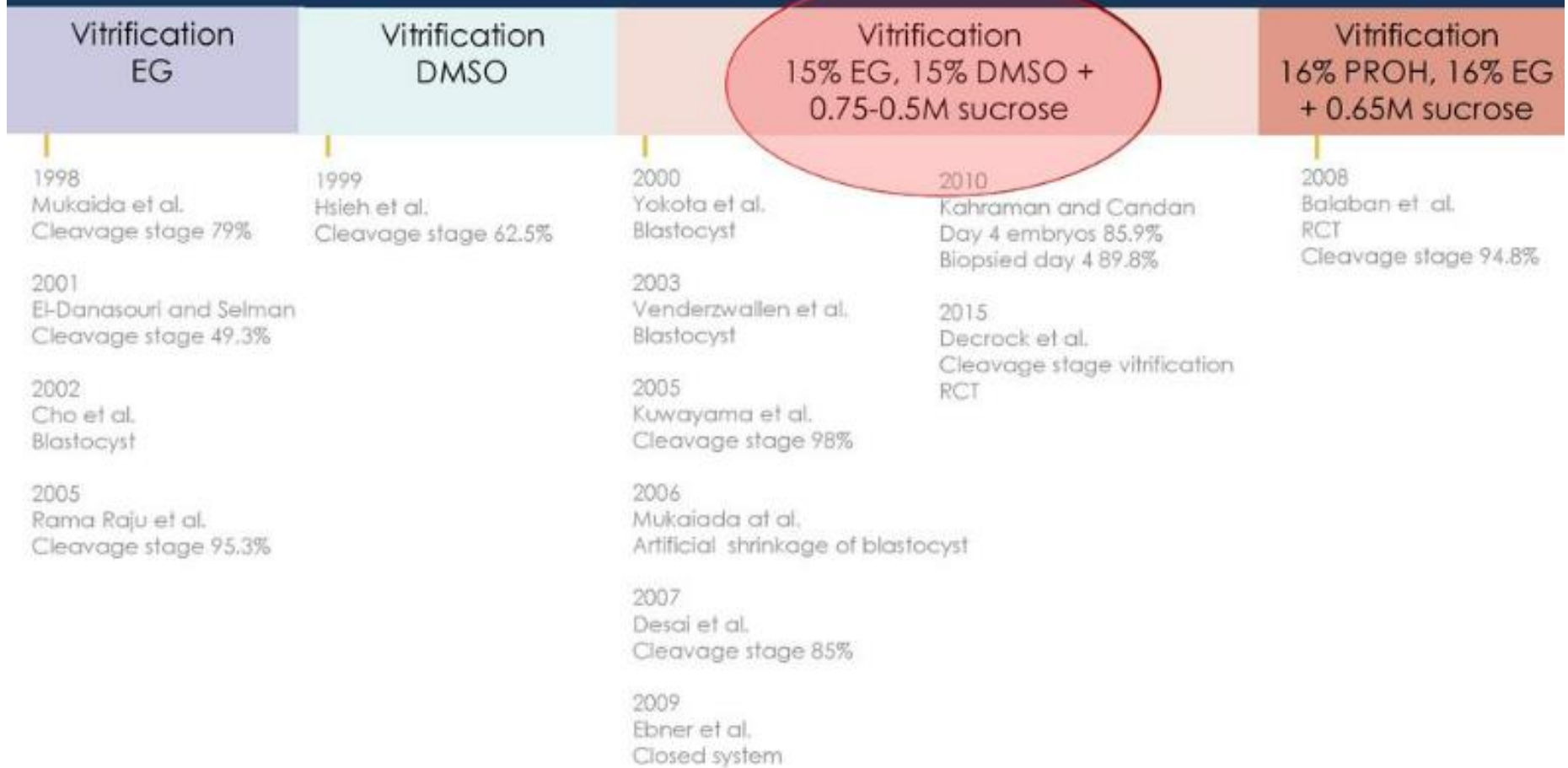


CPA makromolekuly

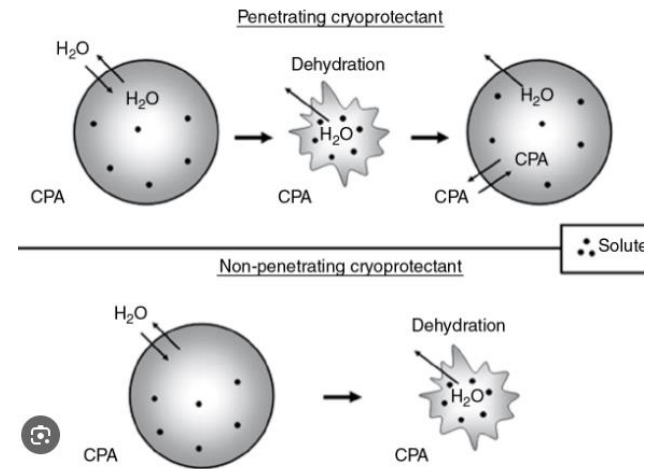
- Přírodní makromolekuly: HA, dextran
- Semisyntetické makromolekuly: HES, semisyntetické deriváty celulózy
- Syntetické makromolekuly: Ficoll®, PEG, PVP, PVA, trehalose-based polyetery, polyampholyty



PRONUCLEAR, CLEAVAGE STAGE and BLASTOCYST VITRIFICATION HISTORY



Osmotická toxicita



- osmotická toxicita může nastat v souvislosti s přidáváním kryoprotektiv s narůstající koncentrací. Pokud molekuly vody začnou pronikat přes plazmatickou membránu z buňky rychleji než kryoprotektiva dovnitř, nastane **objemový kolaps** buňky.
- při **rozmrazovacím** procesu však může nastat děj opačný. Promýváním buněk v izotonickém roztoku pronikají kryoprotektiva z buňky přes plazmatickou membránu pomaleji, dochází tak rychle k **nadměrnému bobtnání** buňky.

Mrazicí roztoky – obecné složení

- základem je většinou fosfátový pufr nebo HEPES
- kryoprotektiva (penetrující+nepenetrující)
- pomocné složky jako sérový albumin, vaječný žloutek, Ficoll
- vzestupná koncentrace kryoprotektiv

- postupným zvyšováním koncentrací je ustálena osmotická rovnováha

- v dnešní době se doporučuje **míchat různé CPA**, aby se předešlo potenciálnímu riziku toxicity - kombinace CPA umožňuje snížení jednotlivých složek pod jejich toxický práh a zkracuje na minimum dobu expozice oocytů/embryí roztoku

Mrazicí roztoky - kryoprotektiva

- nejčastěji používané zmrazovací roztoky se skládají z penetrujících (např. ethylenglykolu, glycerolu, dimethylsulfoxidu, propylenglykolu, acetamidu; <4 M) a nepenetrujících (např. sacharóza, trehalóza; <0,5 M)
- nepoužívanější protokol pro oocyty i embrya zahrnuje kombinaci 15 % DMSO, 15 % EG a 0,5 M sacharózy při minimálním objemu $\leq 1 \mu\text{l}$
- často je používána kombinace DMSO a sacharóza, zatímco DMSO snižuje koncentraci rozpuštěné látky, vyšší podíl sacharózy má přímý vliv na zvýšení hodnoty T_g , a tím zvyšuje bezpečnou skladovací teplotu vzorku

Mrazicí roztoky – pomocné látky



Kromě médií a CPA obsahují další pomocné látky

- **hydroxypropylcelulóza** derivát celulózy – ochrana membrán
- **pufry** stabilizace pH jako v médiích
- **antibiotika** nejčastěji gentamicin, nemá negativní vliv na gonocyty či embrya
- **albumin** MW 67 000, snižuje přilnavost buněk k nástrojům
- **vaječný žloutek** dnes pouze v některých médiích pro spermie, může být zdrojem kontaminace

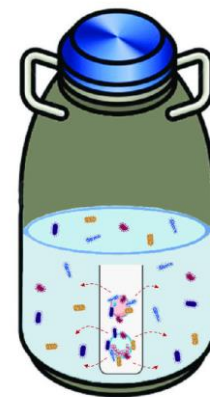
CPA pro oocyty



- pokud jde o vitrifikaci oocytů, bylo v průběhu let vyvinuto několik řešení a protokolů pro rychlé mrazení
- varianty protokolu založeného na DMSO byly poprvé představeny v roce 1998
- kromě protokolu založeného na DMSO byl vyvinut vitrificační systém skládající se z fosfátem pufovaného média doplněného o 20 % lidského sérového albuminu (HSA) a G a/nebo EG ve zvyšujících se koncentracích
- absence DMSO umožňuje pomalejší ochlazování, větší objemy mikrokapiček a různé nosiče

Kryogenní médium

- dusík málo reaktivní plyn, teplota varu $-195,8^{\circ}\text{C}$
- MW 28 g/mol, hustota 0,8g/ml
- kapalný dusík při atmosférickém tlaku je vroucí, průhledná kapalina
- výroba zkapalněním vzduchu pomocí kryogenních zařízení
- vytěsňuje kyslík ze vzduchu – nebezpečí udušení v nevětraných místnostech
- speciální efekty – při odpaření strhne vodní páru
- výrazná změna objemu: plyn až 694x větší objem než kapalina
- pozor na zatavení kapalného dusíku do pejety !
- rychle se odpařuje – vhodná obuv při manipulaci



Způsoby kryokonzervace

Klasické mražení

ledové krystaly



Vitrifikace

„tvorba skla“



Pomalé mražení - slow freezing

- metoda zavedena v 80. letech
- náročný postup trvající hodiny
- dodnes celosvětově nejpoužívanější metoda mražení buněk
- mrazící přístroj – řídicí jednotka, mrazící komora, zásobník kapalného dusíku

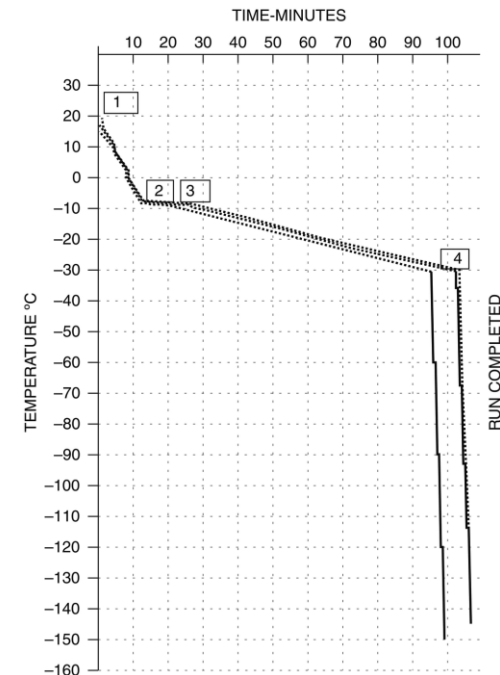
- během dehydratace je nežádoucí **odstraňovat příliš** mnoho intracelulární **vody**, protože dehydratace může mít za následek zvýšení koncentrace intracelulárních látek až na **toxické koncentrace**
- nejkritičtějším momentem během fáze zmrazování a rozmrazování je přechodná teplotní zóna (-15 až -60 °C)



Slow freezing – postup mražení

- buňky jsou nejprve postupně inkubovány v médiích se vzrůstající koncentrací CPA (nízké koncentrace 10-15%) a dlouhé intervaly inkubace buněk
- poté nasáty do slávek (cca 200 ul) a zataveny konce, na jednom konci vatová zátka, která zatvrdne
- poté se postupně ochlazují: rychlostí 1-2 °C/min, na teplotu -7 °C poté 5-10 minut stabilizace potřeba provést seeding
- nastává kritická fáze pokles teplot velmi pomalu 0,3/min až do -30 °C
- dále 50 °C/min až do -150 °C
- celý proces trvá 2,5-3 hodiny

STEP	FREEZING RATE
START: 20 °C	
1°	-2 °C/min until at -7 °C
2°	Hold -7 °C for 10 min. Seeding time after 3 min
3°	-0,3 °C/min until -30 °C
4°	-50 °C/min until -150 °C
5°	Hold -150 °C for 2 hours

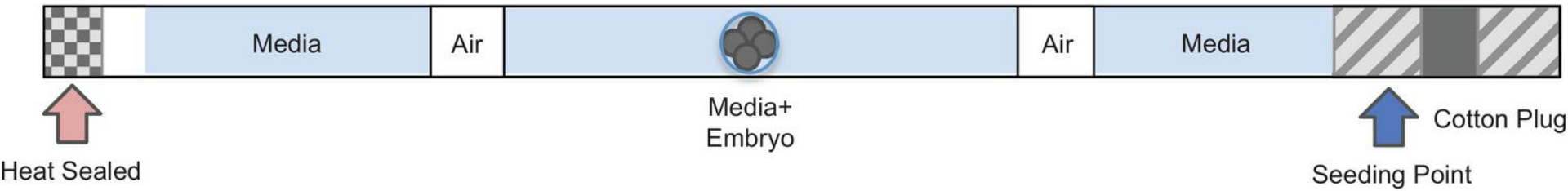


Supercooling









- přestože teplota tání ledu je $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ tak voda mrzne při nižších teplotách
- je to ovlivněno celou řadou faktorů jako je složení roztoku, jeho objem, tlak...
- někdy i při teplotě $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ stále nedojde k tvorbě krystalů !
- pokud je roztok tekutý při teplotách pod bodem mrazu, tak nedochází ke správné dehydrataci buněk (nevznikají krystaly vně buněk)
- roztoky pod bodem mrazu jsou velice nestabilní a krystaly vzniknou i při malém kontaktu s chladnějším prostředím
- slow freezing je **system řízené tvorby ledu**, tak aby krystaly vznikaly extracelulárně
- proto je klíčový seeding, kdy se nastartuje tvorba krystalů
- podchlazenou pinzetou se dotkneme slámky – začne růst krystalů

Seeding

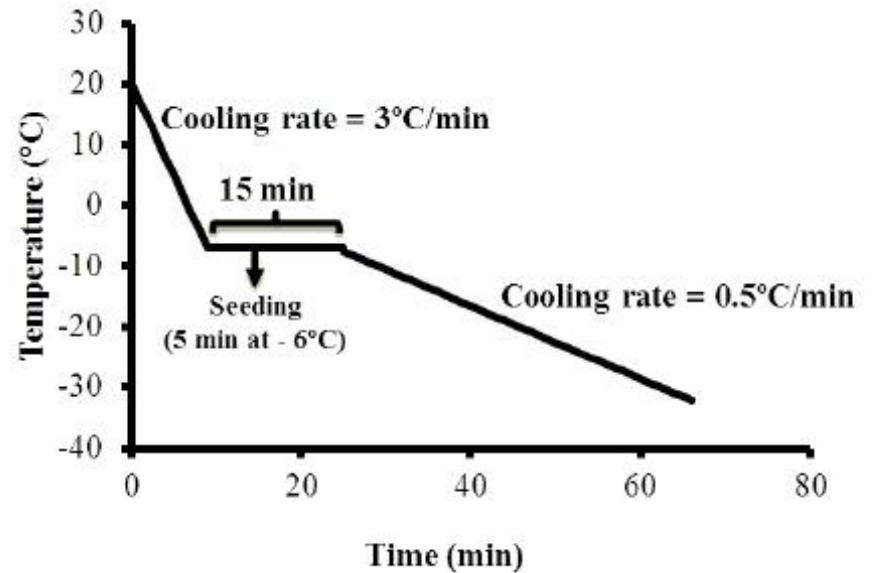


(A)



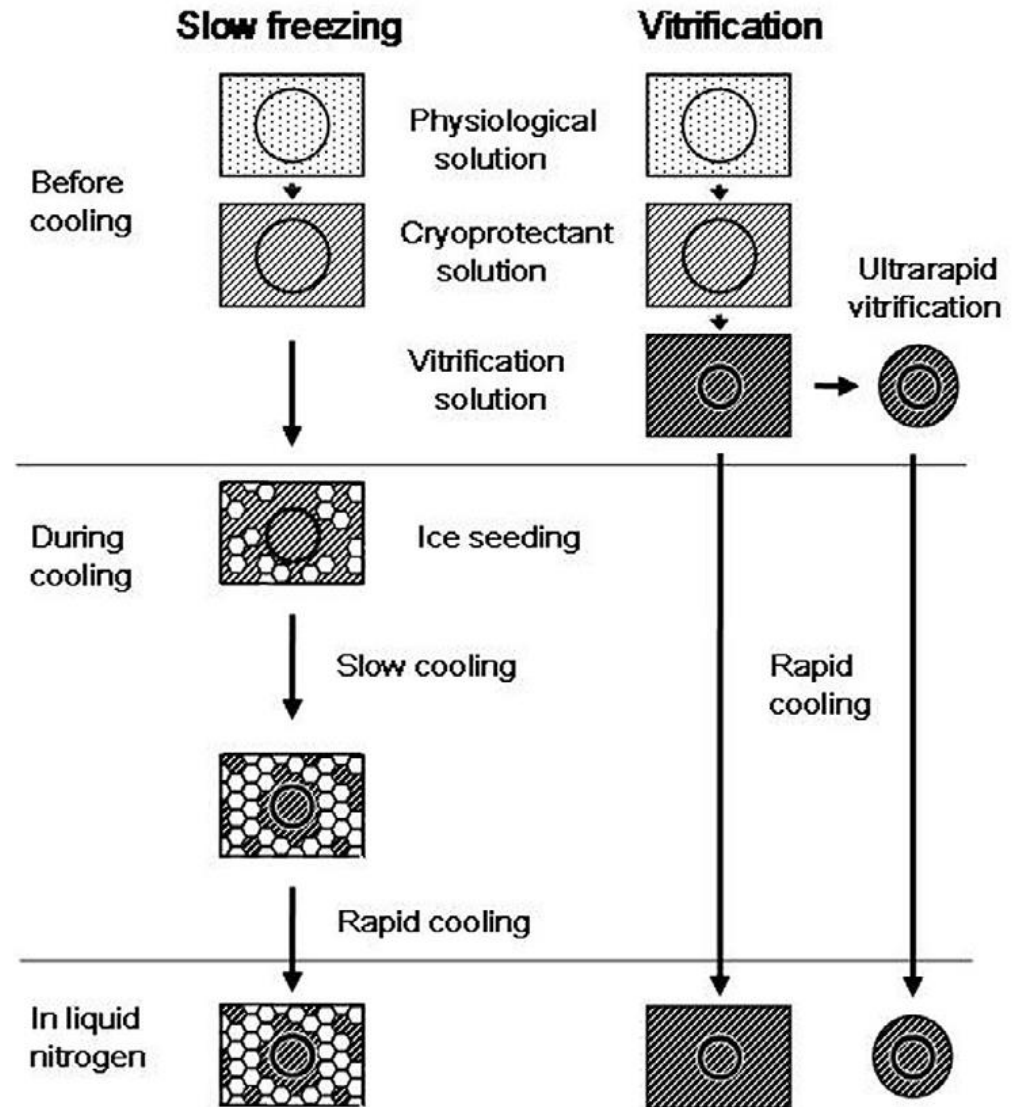
-  Straw seal (bushing/seal)
-  Solution PBS 20% FBS
-  Air bubbles
-  Ethylene glycol solution 1.5 M (10 min equilibrium)
-  Straw seal (heating)
-  Embryo

(B)



Seeding

- ručně nebo automaticky se dělá seeding při teplotě -6 až -8 °C, což umožňuje pomalý růst velkých ledových krystalů
- udržuje velmi křehkou rovnováhu mezi faktory, které mohou vést k poškození většinou krystalizací ledu



Pomalé mražení

- za podmínek pomalého mražení je možné částečně **zabránit tvorbě intracelulárního ledu**, protože koncentrace intracelulárních rozpuštěných látek je během dehydratace o něco vyšší v okolí, čímž se snižuje bod tuhnutí uvnitř buňky
- v důsledku přítomnosti **extracelulárního ledu** dochází k podchlazení vnitřku buňky
- dehydratace v několika stupních
- funguje při nízkých koncentracích toxických CPA, nahrazují vodu
- zahrnuje pre-ekvilibrační krok s CPA do 10 %
- koncentrace CPA 1,5 M
- vhodnější pro kryokonzervaci ovariální tkáně

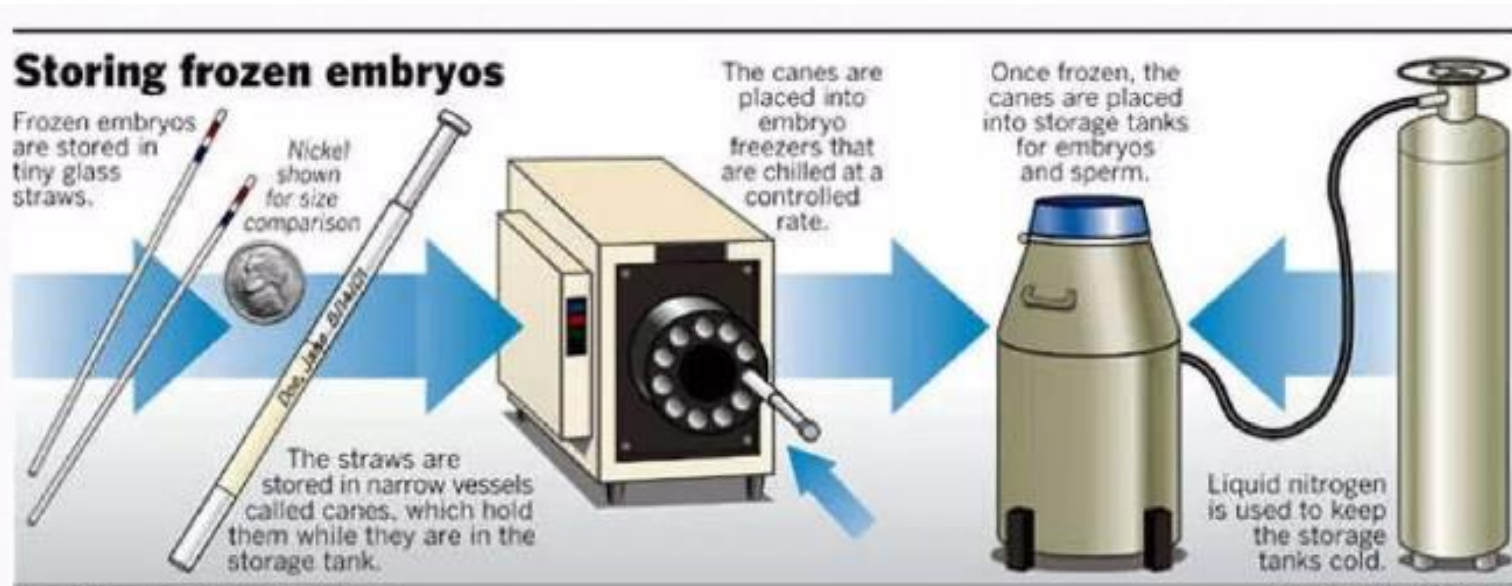
Pomalé mrazení - rozmražování

- rychlé ponoření pejety do vodní lázně 30-31 °C
- vypuštění embryí do prvního rozmrazovacího média
- postupná rehydratace buněk
- následují další roztoky se sestupnou koncentrací CPA
- rozhodující je převedení zmrzlého roztoku z tekutého dusíku do RT tak aby **nevznikly ledové krystaly** a nedošlo k poškození membrán
- může nastat **osmotický stres** – absorpce nadměrného množství vody a prasknutí buněk
- poslední roztok a pak jsou embrya převedeny do kultivačního média



Pomalé mrazení

- během pomalého mrazení dochází k poškozování buněk v důsledku vytvoření krystalů, které poškozují organely a membrány
- před zahájením pomalého chlazení v programovatelném řízeném systému je dosaženo rovnováhy embrya při relativně nízké koncentraci kryoprotektiva (~1,5 mol/l) a dochází k progresivní dehydrataci, smršťování a zvyšování koncentrace intracelulární rozpuštěné látky v důsledku rostoucí osmolarity v extracelulárním roztoku během procesu ochlazování (0,3–2 °C/min).



Pomalé mražení - úspěšnost

- první porod dítěte po transferu kryokonzervovaného embrya byl získán standardní technikou pomalého zmrazení (1986)
- tato technika byla široce a úspěšně aplikována na dělicí se embrya, ale také na oplodněné oocyty (zygoty), **úspěšnost kolem 50-70%**
- použití této techniky pro neoploďněné oocyty však v následujících 15 letech vykazovalo špatné výsledky a použití bylo pouze na vzácné a naléhavé indikace (např. onkologické pacientky).
- pacientky musely být informovány o experimentálním charakteru kryokonzervace oocytů a o tom, že nelze zaručit úspěšnost zákroku v dlouhodobém horizontu
- dále pomalé mražení embryí ve stádiu blastocysty ukázalo špatné výsledky - nízká míra přežití po rozmražení

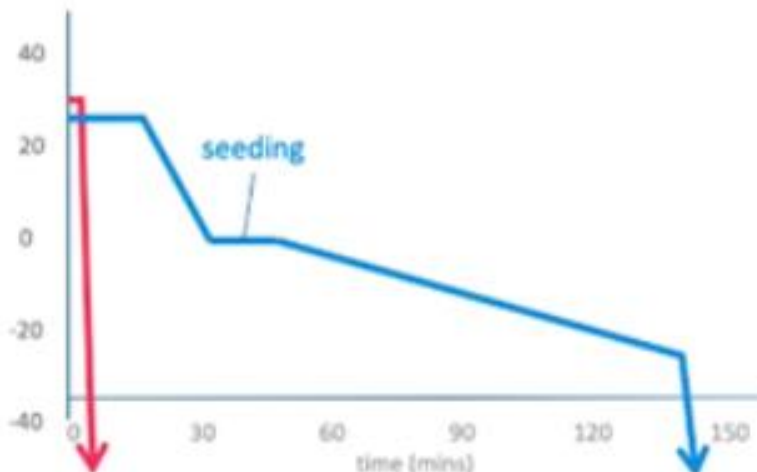
Slow freezing limity

- z předchozích studií vyplývá, že společným jmenovatelem, který negativně ovlivňuje přežití po rozmrazení, je nekontrolovaná tvorba ledových krystalů uvnitř i vně buňky
- toto je rozhodující faktor přímo ovlivňující úspěšnost techniky pomalého zmrazování
- komplikované, potřeba zmrazovače
- časově náročné – obtížná organizace práce při vyšším provozu laboratoře (mražení spermií, embryí – komplikované)

Pomalé mražení x vitrifikace

- zatímco při konvenčním pomalém zmrazování je koncentrace kryoprotektiva nízká, tak rychlost ochlazování je velmi pomalá, aby se zabránilo krystalizaci ledu
- vitrifikace je naopak ultrarychlá chladicí technika, která vyžaduje vysokou koncentraci kryoprotektiva

Vitrification



Slow-freeze



MUNI
MED

Děkuji Vám za pozornost !

