

Криоконсервация – контролируемая пауза в развитии.



Богданова М. А.

Санкт-Петербург

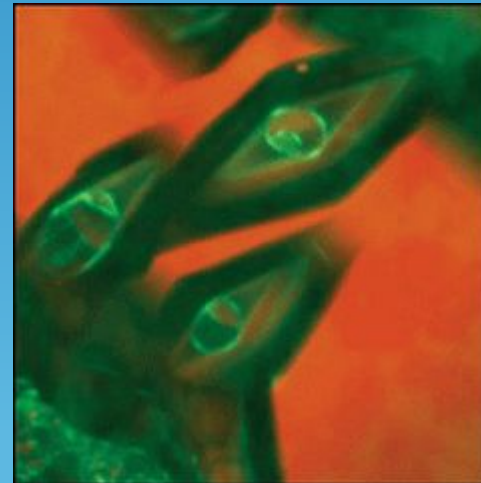
Замедлить или даже остановить онтогенез? Многие это могут!

Анабиоз (лат. anabiosis — оживление, от др.-греч. ανα- — «вновь» и βίος — «жизнь») — состояние живого организма, при котором жизненные процессы (обмен веществ и др.) настолько замедлены, что отсутствуют все видимые проявления жизни.

Термин предложен в 1873 году немецким ученым Вильгельмом Прейером в его сводке по исследованию феномена временного прекращения жизнедеятельности.

«**Белки-антифризы**», или лед-структурирующие белки (ice-structuring proteins — ISPs), естественные криопротекторы, помогают животным оставаться в живых при низких температурах, предотвращая образование острых кристаллов льда, разрушающих структуру тканей.

Вокруг ромбических кристаллов льда наблюдается зеленое свечение флуоресцентно-меченых «белков-антифризов».



Криобиология

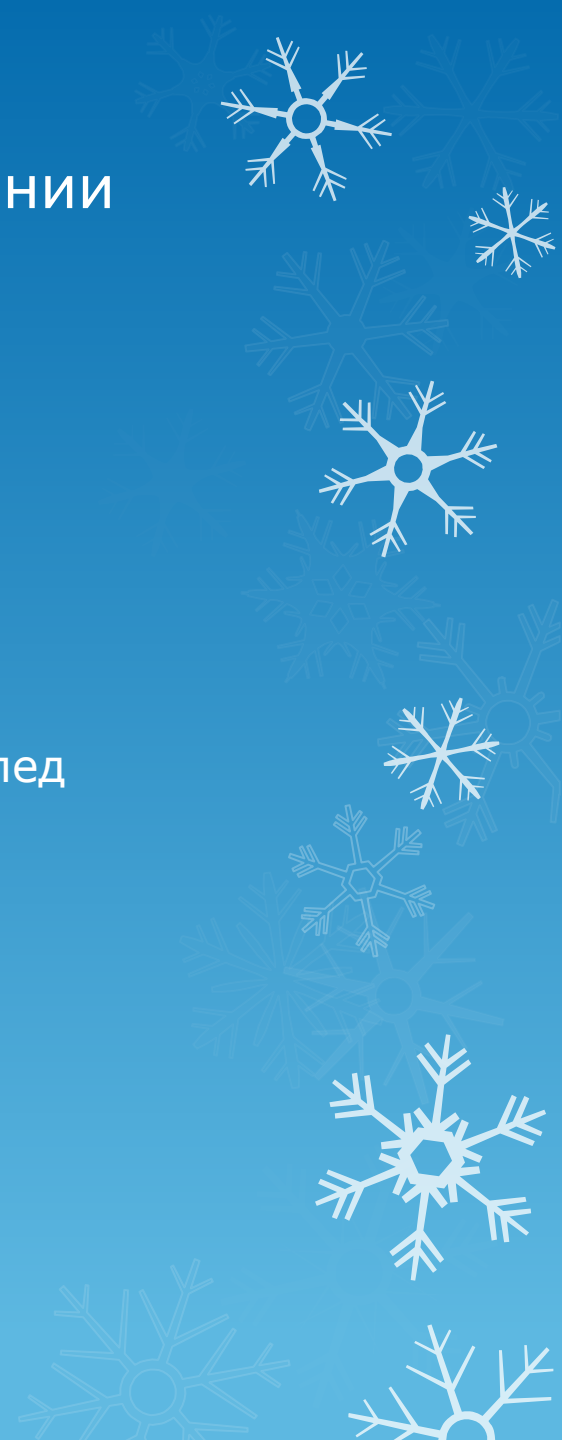
Криобиология (от греч. κρύος — холод, bios — жизнь и logos — наука) — раздел биологии, в котором изучаются эффекты воздействия низких температур на живые организмы. На практике, в рамках криобиологии занимаются исследованиями биологических объектов или систем при температурах ниже нормальных. В качестве объектов могут служить белки, клетки, ткани, органы, или целые организмы. Используются диапазон температур от умеренно низких до криогенных.

Важнейшие направления исследований

- ? Исследование адаптаций к холоду микроорганизмов, растений и животных
- ? Криоконсервация клеток, тканей, гамет и эмбрионов животного и человеческого происхождения для длительного сохранения в медицинских целях.
- ? Сохранение органов в гипотермических условиях для трансплантации
- ? Лиофилизация фармацевтических препаратов
- ? Криохирurgia — хирургия с использованием криогенных газов/жидкостей для разрушения тканей

Факторы, препятствующие сохранности биологических объектов при замораживании

- ? Образование кристаллов льда внутри клеток
- ? Образование кристаллов льда вне клеток
- ? Перегрев клеток в момент фазового перехода вода/лед
- ? Фазовые переходы в липидном бислое мембран
- ? Холодовой шок



Кристаллообразование – включает два процесса:

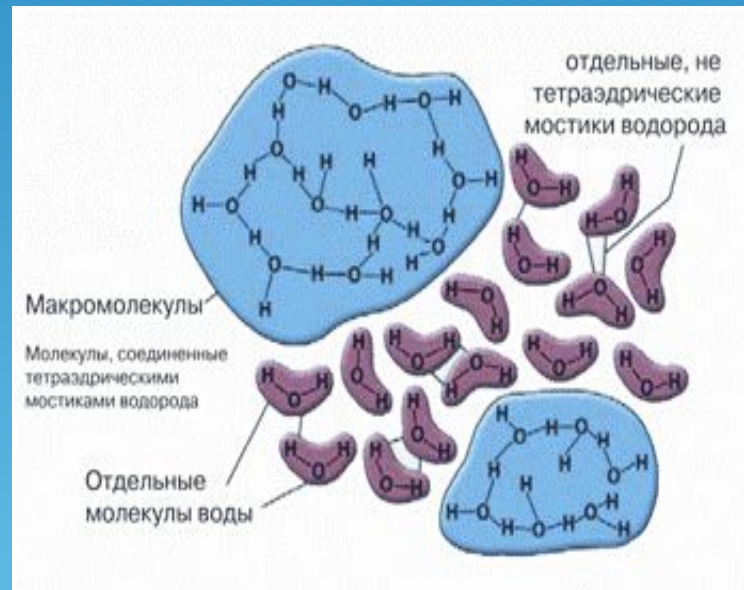
I. Формирование центров кристаллизации

Кластерная модель структуры воды, предложенная Х. Фрэнком и В. Уэном в 1957 г., согласно которой в жидкой воде постоянно появляются и распадаются кластеры (относительно устойчивые ассоциаты) молекул. Чем ниже температура, тем больше молекул воды входит в состав одного кластера. Таким образом, еще до формирования структуры льда в воде существуют структурно устойчивые льдоподобные образования, которые, достигая критического размера, запускают рост кристаллов льда

Формирование центров кристаллизации наиболее активно происходит при температурах, близких к $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Образование кластера воды.

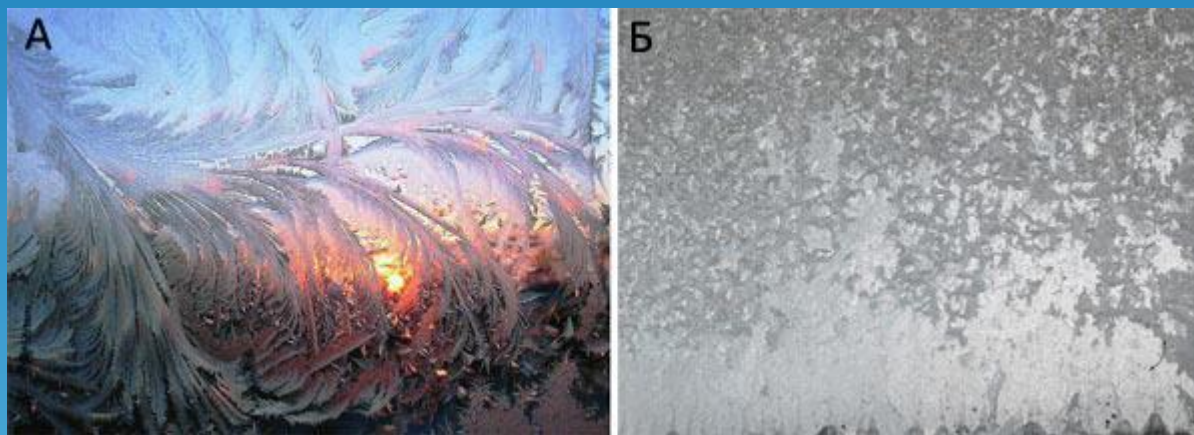
Самопроизвольно возникающее повышение степени организации молекул жидкости — будущий центр кристаллизации при охлаждении раствора.



II. Рост кристаллов

Рост кристаллов льда интенсивней всего происходит при более высоких температурах: $-2..-10$ °С.

Напротив, при -30 °С скорость роста кристаллов воды достаточно мала.



Рост кристаллов льда на стеклах трамвая или автобуса зимой.

А. При небольшом морозе, когда трамвай выходит на маршрут из теплого депо, на его стеклах образуются причудливые и очень красивые узоры из огромных кристаллов льда — мало центров кристаллизации, но идеальные условия для роста кристаллов.

Б. При сильном морозе стекла становятся матовыми — без узоров мороза, и, присмотревшись, мы сможем различить множество очень мелких кристалликов на них: есть множество центров кристаллизации, но условия роста кристаллов льда не подходящие.

Факторы, препятствующие сохранности биологических объектов при размораживании

? Лавинообразное образование внутриклеточных кристаллов льда

Увеличивая температуру, мы снова проходим температуру, наиболее благоприятную для формирования центров кристаллизации ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Продолжая нагревание, приближаемся к оптимуму роста кристаллов ($-10..-2\text{ }^{\circ}\text{C}$), и получаем лавинообразное образование кристаллов льда, интенсивно растущих и разрывающих клетки.

Поэтому процесс размораживания требует максимально быстрого повышения температуры, что снижает вероятность роста кристаллов льда внутри клеток.

? Гипотонический шок клеток

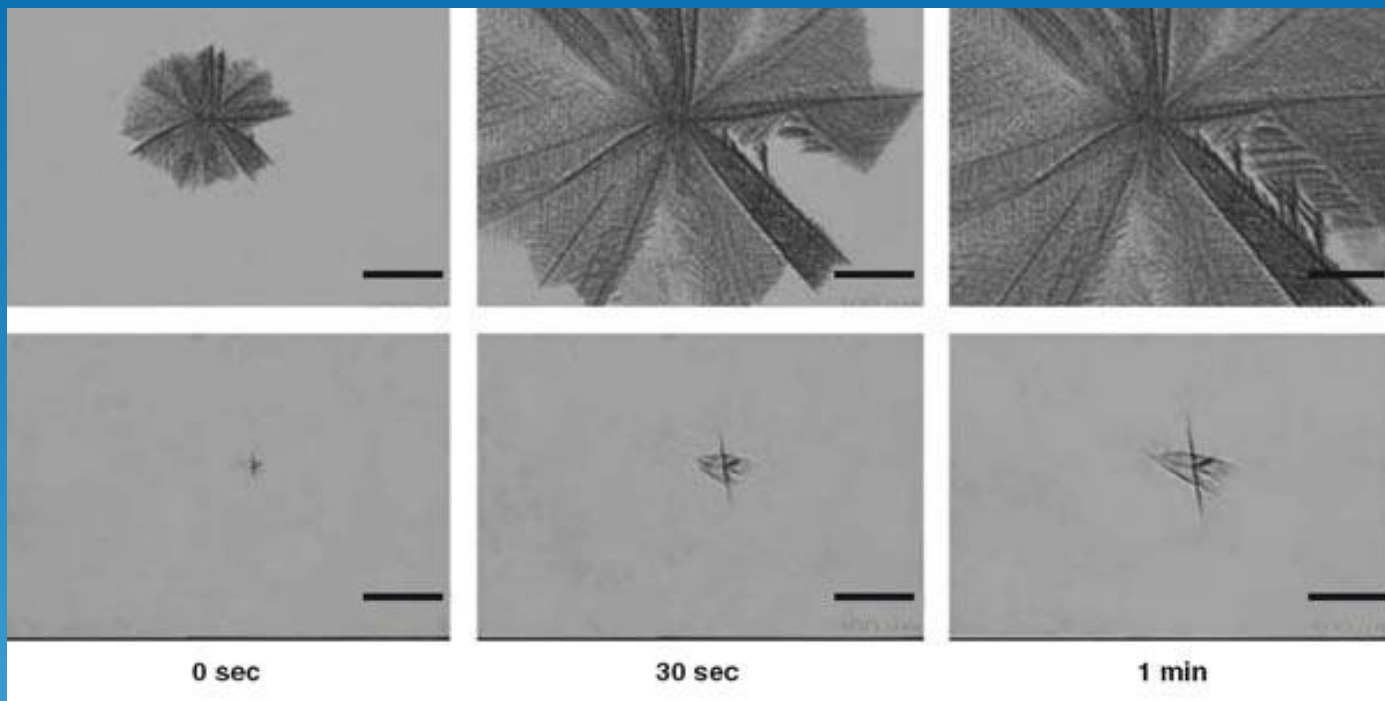
При плавлении внеклеточного льда в процессе размораживания возникает избыток свободной воды и, как следствие, резкое снижение осмолярности раствора.

Криопротекторы - это вещества, способные снизить повреждающее действие физико-химических факторов при криоконсервации.

Криопротекторы разделяют на **проникающие** - низкомолекулярные вещества с молекулярной массой менее 300 Да, такие как, метилформамид, пропандиол, глицерин, этиленгликоль, метанол, диметилсульфосид, 2-метил-2,4-пентандиол и **непроникающие** двух типов

- высокомолекулярные вещества: альбумин, фикол, поливинилпиралидон, полиэтиленоксид, гидроксипэтилкрахмал, поливинилальдегид, полиэтиленгликоль желток куриного яйца
- низкомолекулярные вещества: олигосахариды, чаще всего используют сахарозу и трегалозу

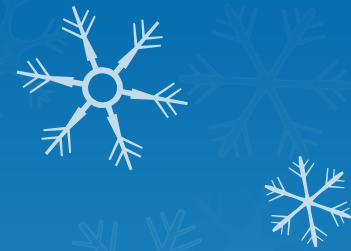




Защитное действие криопротекторов. При отсутствии криопротектора в растворе, охлажденном ниже точки его замерзания, уже через минуту формируются кристаллы льда (верхний ряд), которые, несмотря на свою привлекательность, губительны для клеток.

Напротив, при добавлении криопротекторов происходит подавление роста кристаллов в растворе (нижний ряд).

Проникающие криопротекторы.



- ? способны попасть внутрь клетки
- ? препятствуют формированию кристаллов льда за счет формирования водородных связей с молекулами воды
- ? замещают воду, что предотвращая криодеструкции биологически важных макромолекул
- ? связывают некоторое количество свободной воды, уменьшая общую дегидратацию клеток
- ? образуют водородные связи с макромолекулами клетки, что стабилизирует их структуру



Проникновение низкомолекулярных криопротекторов внутрь клетки осуществляется либо путем диффузии, либо, как было показано для глицерина, через специальные белковые каналы — аквапорины.

Kuleshova L.L., MacFarlane D.R., Trounson A.O., Shaw J.M. (1999). **Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes.** Cryobiology 38, 119–130

Проникающие криопротекторы – две стороны одной медали.

Для реализации своей функции — защиты клетки от повреждающего воздействия замораживания/размораживания — проникающим криопротекторам необходимо некоторое время для насыщения клетки.

Чем больше криопротектора будет внутри клетки, тем эффективнее будет ее защита от кристаллов льда, однако большинство криопротекторов достаточно токсичны.

Наибольшим токсическим эффектом обладают проникающие криопротекторы, поскольку они образуют неспецифические водородные связи не только с водой (защищая клетку от деструктивного действия кристаллов льда), но и с жизненно важными макромолекулами клетки (ДНК, РНК, ферментные системы), что приводит к нарушению их функционирования.

Поэтому необходимо подбирать индивидуальные параметры насыщения того или иного типа клеток на разных стадиях развития растворами криопротекторов, варьируя их **концентрацию** и **время экспозиции**.

Непроникающие криопротекторы



- ? не могут пройти через цитоплазматическую мембрану
- ? препятствуют осмотическим перепадам при замораживании
- ? препятствуют росту кристаллов внеклеточного льда
- ? позволяют снизить концентрацию проникающих криопротекторов, часто оказывающих токсическое влияние на клетку
- ? Отмечено защитное действие непроникающих криопротекторов на фосфолипидный компонент плазматической мембраны клетки

Villarreal M.A., Diaz S.B., Disalvo E.A., Montich G.G. (2004). **Molecular dynamics simulation study of the interaction of trehalose with lipid membranes.** Langmuir 20, 7844–7851

Patist A., Zoerb H. (2005). **Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems.** Colloids Surf. B Biointerfaces 40, 107–113;

Непроникающие криопротекторы: один в поле не воин.

Использование непроникающих криопротекторов в отсутствие проникающих неэффективно, то есть непроникающие криопротекторы являются дополнительными компонентами в растворах проникающих криопротекторов.

Наиболее эффективно использование комбинации проникающих и непроникающих криопротекторов: это значительно снижает токсичность раствора для криоконсервации.

В качестве проникающих криопротекторов могут быть использованы дисахариды или этиленгликоль, всего 11–15% которого в присутствии непроникающих криопротекторов позволяет и при небольших скоростях охлаждения добиться витрификации.

Boutron P., Peyridieu J.F. (1994). **Reduction in toxicity for red blood cells in buffered solutions containing high concentrations of 2,3-butanediol by trehalose, sucrose, sorbitol, or mannitol.** *Cryobiology* 31, 367–373
Kuleshova L.L., Shaw J.M., Trounson A.O. (2001). **Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation.** *Cryobiology* 43, 21–31

Два метода криоконсервации:



Быстро или медленно? Сравнение стратегий **медленного замораживания**, где необходимая концентрация криопротекторов достигается при постепенно контролируемом падении температуры среды с эмбрионами и ультрабыстрого снижения температуры при изначально высоком содержании в среде криопротекторов, приводящее к **витрификации** образца. То, как быстро изображенные на фото пингвины окажутся в водах океана, наглядно характеризует время, в течение которого криоконсервируемый образец подвергается охлаждению.

Медленное замораживание.



Заморозка осуществляется с помощью программируемых приборов для замораживания, например Planer, Cryologic, Biotronics, Asymptote.



Trounson A, Mohr L. Nature. 1983 Oct 20-26;305(5936):707-9. **Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo.**

Базовая программа для замораживания зигот - эмбрионов.

- ? Охлаждение со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до стартовой температуры примерно 20°C и остановка на 5 мин для уравнивания температуры образцов.
- ? Охлаждение со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -7°C .
- ? Остановка при -7°C для уравнивания температур всех образцов.
- ? Производится мануальное введение затравки при температуре от $-6,5$ до -7°C .
- ? Медленное охлаждение со скоростью $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -30°C .
- ? Быстрое охлаждение до -100°C
- ? Образцы помещают в жидкий азот для длительного хранения.

В качестве криопротекторов используют 1,5 М пропандиол+0,1М сахарозу+20% сыворотки

Размораживание эмбрионов.

Достать соломинки из жидкого азота на 40 секунд при комнатной температуре. Опустить в водяную баню +30°C на 1 минуту

Инкубация при комнатной температуре в

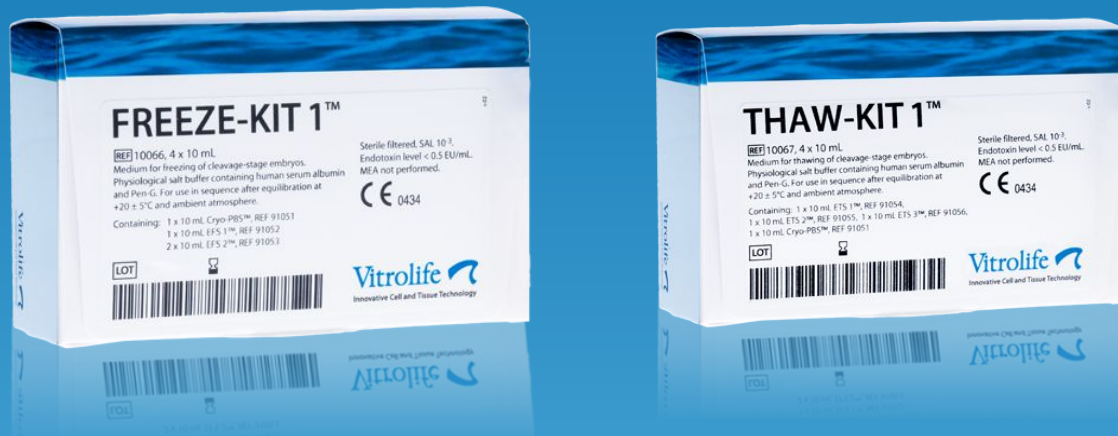
1М пропандиол/0,2М сахара + 20% сыворотки 5 минут

0,5М пропандиол/0,2М сахара + 20% сыворотки 5 минут

0,2 сахара + 20% сыворотки 5 минут

Трижды отмыть в культуральной среде, поместить для дальнейшего культивирования в инкубатор.

Наборы для медленной заморозки эмбрионов Vitrolife.



Подходят для криоконсервации 8-ми клеточных эмбрионов .
В качестве криопротекторов содержит 1,2-пропандиол и сахарозу.

В буфере MOPS присутствуют аминокислоты и углеводы необходимые для развития и успешного функционирования бластоцист.

Используется при комнатной температуре.

Lassalle B, Testart J, Renard JP. Fertil Steril. 1985 Nov;44(5):645-51.
Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol.

Наборы для медленной заморозки blastocист Vitrolife.



Подходят для криоконсервации blastocист.
В качестве криопротекторов содержит глицерин и сахарозу.
В буфере MOPS присутствуют аминокислоты и углеводы необходимые для развития и успешного функционирования blastocист.
Используется при комнатной температуре.

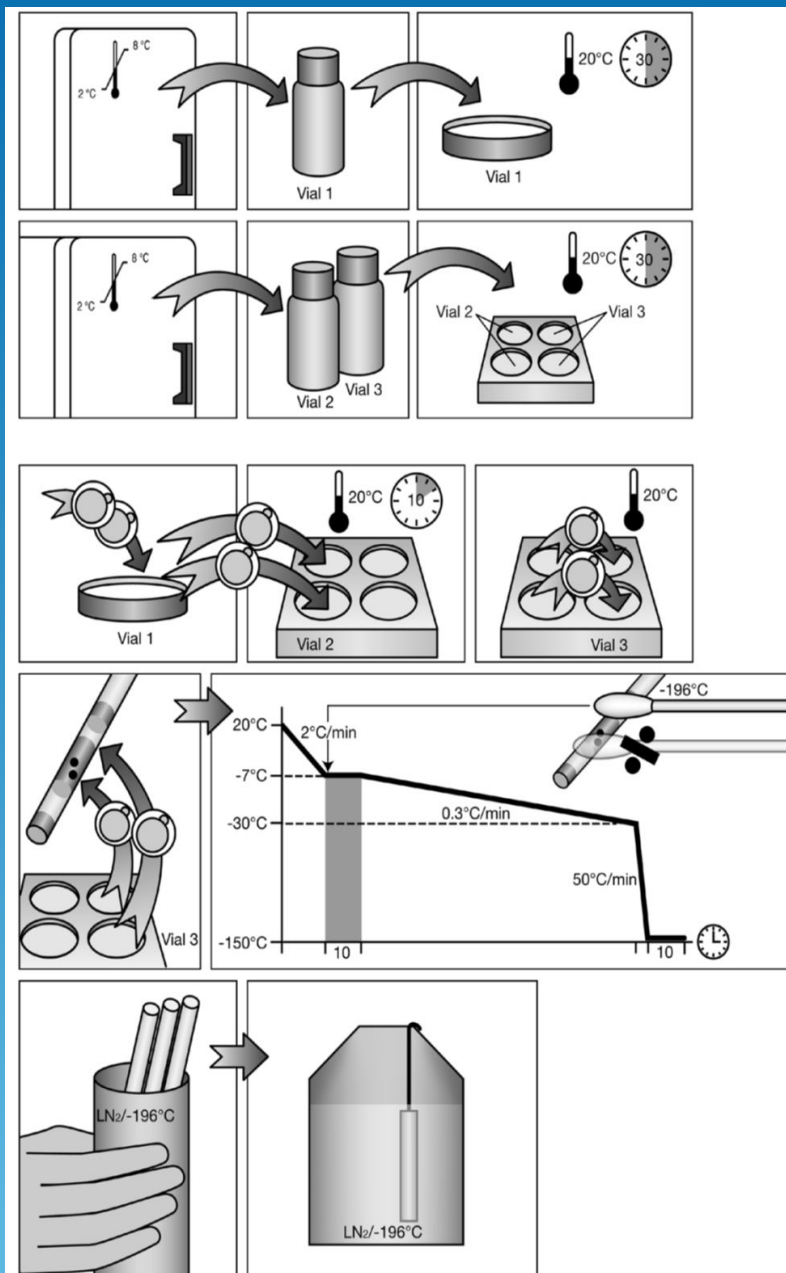
Набор для медленной заморозки ооцитов OocyteFreeze, Origio.



В качестве криопротекторов содержит пропиленгликоль (2-ый и 3-ий флаконы) и сахарозу (только 3-ий флакон). В фосфатном буфере присутствуют белковые фракции плазмы человека.

Используется при комнатной температуре. Не помещать в CO₂-инкубатор.

Продукт предназначен для однократного использования.



- промойте ооциты в 3 мл среды 1
- 10 минут в 0,5 мл среды 2
- перенесите в 0,5 мл среды 3 и быстро загрузите ооциты в соломины
- поместите криосоломины в замораживатель и охладите до -7°C со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, проведите сидинг вручную
- инкубируйте 10 минут при -7°C
- Охладите до -30°C со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$
- Охладите с -30°C до 150°C со скоростью $50^{\circ}\text{C}/\text{мин}$
- Стабилизируйте в течении 10-15 минут, перенесите соломины в жидкий азот и храните при -196

Набор для медленной заморозки эмбрионов Embryo Freezing Pack, Origio.

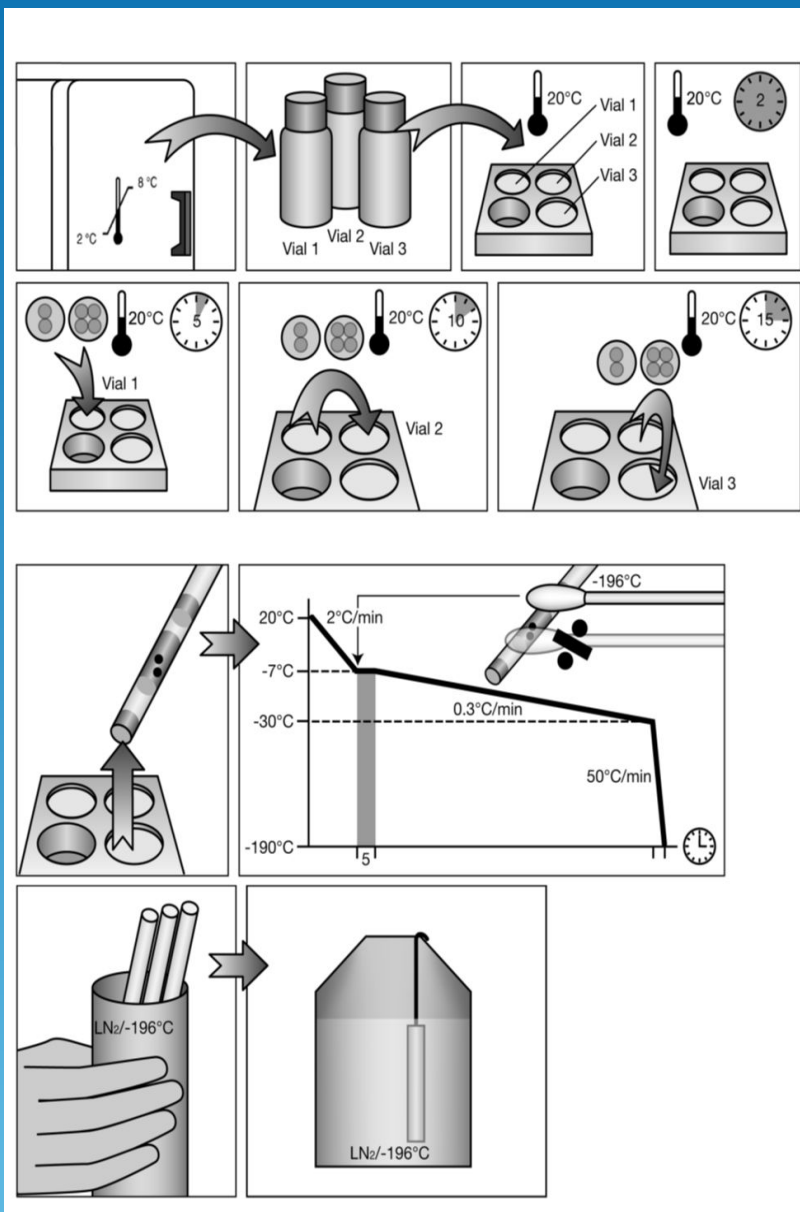


Предназначен для замораживания человеческих зигот и эмбрионов на стадии дробления.

В качестве криопротекторов содержит пропиленгликоль (2-ый и 3-ий флаконы) и сахарозу (только 3-ий флакон). В фосфатном буфере присутствует альбумин человека.

Используется при комнатной температуре. Не помещать в CO₂-инкубатор.

Продукт предназначен для однократного использования.



- Поместите эмбрионы в 0,5 мл среды 1 на 5 минут
 - 10 минут в 0,5 мл среды 2
 - 15 минут в 0,5 мл среды 3 и быстро загрузите эмбрионы в соломины

- поместите криосоломины в замораживатель и охладите до -7°C со скоростью 2°C/мин, инкубируйте 5 минут при -7°C проведите сидинг вручную

Охладите до -30°C со скоростью 0,3°C/мин

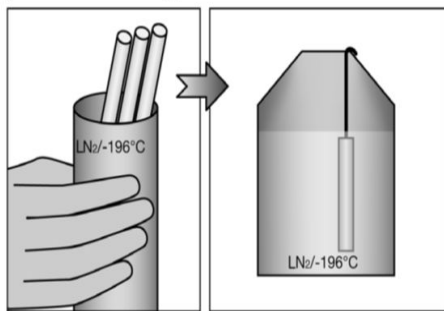
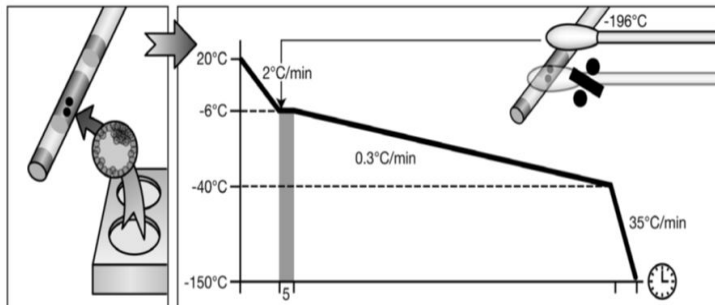
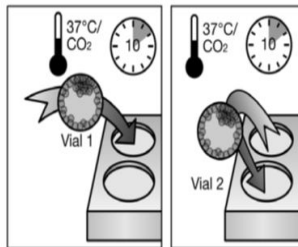
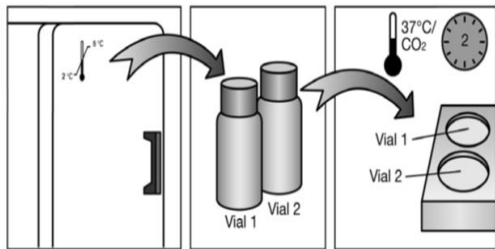
Охладите с -30°C до 190°C со скоростью 50°C/мин

Стабилизируйте в течении 10-12 минут, перенесите соломины в жидкий азот и храните при -196

Набор для замораживания бластоцист BlastFreeze, Origio



Предназначен для замораживания человеческих бластоцист. В качестве криопротекторов содержит глицерин и сахарозу (только 3-ий флакон). В буфере присутствуют альбумин человека и феноловый красный. Используется при температуре +37°C. Уравновешивать в инкубаторе в атмосфере 5-6% CO₂. Продукт предназначен для однократного использования.



- Поместите эмбрионы в 0,5 мл среды 1 на 10 минут в CO₂-инкубатор
- 10 минут в 0,5 мл среды 2 в CO₂-инкубатор
- загрузите эмбрионы в соломины

- поместите криосоломины в замораживатель и охладите до -6°C со скоростью 2°C/мин, проведите сидинг вручную

Охладите до -40°C со скоростью 0,3°C/мин

Охладите с -40°C до 150°C со скоростью 35°C/мин

Перенесите соломины в жидкий азот и храните при -196

Наборы размораживания Origio.



Существуют в трех вариантах соответственно.
Разморозка ооцитов и эмбрионов проводится при $+30^{\circ}\text{C}$,
бластоцист при комнатной температуре.
Продукты предназначены для однократного использования.

Организация криобанка.

Показаниями для криоконсервации половых клеток и/или тканей репродуктивных органов являются:

- ? необходимость хранения половых клеток и/или тканей репродуктивных органов) до начала проведения химио и/или лучевой терапии;
- ? необходимость хранения половых клеток и/или тканей репродуктивных органов с целью дальнейшего использования при лечении бесплодия, в том числе в программах ВРТ;
- ? необходимость хранения половых клеток анонимных доноров для использования при лечении бесплодия в том числе в программах ВРТ;
- ? хранение половых клеток и/или тканей репродуктивных органов по желанию пациента.

ВАЖНО:

- ? Криоконсервация половых клеток и/или тканей репродуктивных органов проводится на основе **информированного добровольного согласия**.
- ? Выбор оптимального метода замораживания и размораживания половых клеток и тканей репродуктивных органов определяется **индивидуально**
- ? Медицинская организация **несет ответственность** за хранение и качество криоконсервации половых клеток, тканей репродуктивных органов и эмбрионов.
- ? Транспортировка половых клеток, тканей репродуктивных органов и эмбрионов осуществляется медицинской организацией, имеющей **лицензию** на осуществление медицинской деятельности «по транспортировке половых клеток и тканей репродуктивных органов».



Использование ооцитов донора

Донорами ооцитов имеют право быть граждане в возрасте от восемнадцати до тридцати пяти лет, физически и психически здоровые, прошедшие медико-генетическое обследование.

Показаниями для использования ооцитов донора в программах ВРТ являются:

- ? отсутствие ооцитов, обусловленное естественной менопаузой, синдромом преждевременного истощения яичников, синдромом резистентных яичников, состоянием после овариоэктомии, радио- или химиотерапии, генетическая патология;
- ? неудачные повторные попытки проведения программы ЭКО/ИКСИ при недостаточном ответе яичников на стимуляцию суперовуляции, неоднократном получении эмбрионов низкого качества, перенос которых не приводит к наступлению беременности, снижение овариального резерва.

Донация ооцитов осуществляется при наличии **информированного добровольного согласия** донора на проведение стимуляции суперовуляции, пункции яичников и использование ее ооцитов для других пациентов.

Использование донорских эмбрионов

Эмбрионы для донации могут быть получены в результате оплодотворения ооцитов донора спермой донора.

С целью донации могут быть использованы эмбрионы, оставшиеся после проведения ЭКО пациентам при условии их **письменного согласия**.

Разрешается применение свежих и криоконсервированных донорских эмбрионов.

При использовании донорских эмбрионов реципиентам должна быть представлена информация о внешних данных, а также результатах медицинского, медико-генетического обследования доноров, их расе и национальности.

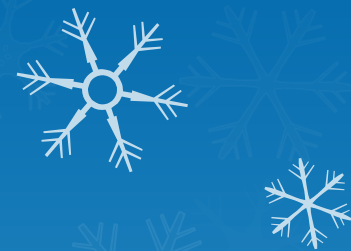
Показаниями для проведения ЭКО с использованием донорских эмбрионов являются:

- ? отсутствие у партнеров собственных половых клеток;
- ? неблагоприятный медико-генетический прогноз;
- ? неоднократное получение эмбрионов низкого качества, перенос которых не приводит к наступлению беременности.

Реципиентам проводится обследование, как и при проведении программы ЭКО.

Информированное добровольное согласие на:

- ? Информированное добровольное согласие на оказание медицинской помощи с использованием вспомогательных репродуктивных технологий и **донорских эмбрионов**
- ? Информированное добровольное согласие на оказание медицинской помощи с использованием вспомогательных репродуктивных технологий и **ооцитов анонимного донора**
- ? Информированное добровольное согласие на оказание медицинской помощи с использованием вспомогательных репродуктивных технологий и **ооцитов неанонимного донора**
- ? Информированное добровольное согласие на **донорство ооцитов**
- ? Информированное добровольное согласие на **криоконсервацию ооцитов**
- ? Информированное добровольное согласие на **криоконсервацию эмбрионов**
- ? Информированное добровольное согласие на **размораживание ооцитов**
- ? Информированное добровольное согласие на **размораживание и перенос эмбрионов**



Протоколирование и архивация

- ? Криоконсервация эмбрионов/ ооцитов - вкладыш в медицинскую карту амбулаторного больного
- ? При выдаче биоматериала для транспортировки необходимо оформление **сопроводительного письма**
- ? ЖУРНАЛ УЧЕТА, ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ООЦИТОВ ДОНОРОВ
- ? ЖУРНАЛ УЧЕТА, ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ООЦИТОВ ПАЦИЕНТОК
- ? ЖУРНАЛУ ЧЕТА, ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭМБРИОНОВ
- ? ИНДИВИДУАЛЬНАЯ КАРТА ДОНОРА ООЦИТОВ:
 - Анкета донора ооцитов
 - Карта обследования донора ооцитов

Помещение криохранилища

№ п/п	Наименование
1.	Оборудование для криоконсервации биоматериала
2.	Сосуды Дьюара для хранения криоконсервированных половых клеток и тканей репродуктивных органов
3.	Сосуды Дьюара для транспортировки криоконсервированных половых клеток и тканей репродуктивных органов (для медицинских организаций, оказывающих услуги по транспортировке половых клеток и тканей репродуктивных органов)
4.	Сосуды Дьюара с запасом жидкого азота
5.	Контейнеры для биоматериала
6.	Транспортировочные тележки
7.	Датчики для контроля содержания в помещении кислорода