

Problematika konservace buněk, tkání a orgánů hlubokým zmrazením

Celostátní seminář

Liblice 28. — 30. ledna 1969

**KRYOBIOLOGICKÁ LABORATOŘ ÚSTAVU EXPERIMENTÁLNÍ
BIOLOGIE A GENETIKY ČSAV**

Vydavatel

F. B ö h m

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE A GENETIKY ČSAV

Praha, květen 1969

Poznámka ke konzervaci protozoí hlubokým zrazením

Chýle P., Chýle M., Patočka F.

Ústav pro lékařskou mikrobiologii a imunologii PVL KU,
Praha

Ústav experimentální biologie a genetiky ČSAV, Praha

Zmrazování biologického materiálu za účelem konzervace bez přidání určitých látek s ochranným účinkem není možné. Látky s ochranným účinkem proti poškození mrazem byly objeveny v podstatě empiricky a dosud o souborném mechanismu jejich účinku je mnoho dohadů. Přesto konzervace biologických systémů /t.j. mikrobů, spermií, krevních elementů a živočišných buněčných kultur, ale i kvasinek a prvoků/ se jeví jako otázka stále naléhavější, a to z důvodů jak referenčních tak i z důvodů technického zvládnutí množství zpracovávaného materiálu nebo z důvodů ekonomie udržování experimentálních systémů.

Záhy po náhodném objevu Polgeho se spolupracovníky /1949/ o ochranném účinku přísadky glycerolu při konzervaci zrazením, roku 1953 Fulton a Smithová byli poněkud úspěšní v konzervaci měňavky Entamoeba histolytica pomocí glycerolu, avšak měli neúspěch s Amoeba foetus. Rok nato McEntegart zmrazuje trichomonády s přísadou glycerolu. V roce 1955 Levine a Marquardt ukázali, že široce kolísalo procento přežívajících Trichomonas foetus s 10% glycerolu při pomalém zmrazování /1°C za minutu do hodnoty -20°C/; že bez ochranného účinku glycerolu všechny hynuly a že při rychlém zrazení /t.j. přímým ponořením do -76°C/ ani glycerol žádné neochránil před zničením. Roku 1960 Polge a Soltys zdůrazňují důležitost určitého zředění séra solným roztokem /Alseverovým/ pro přežívání trypanosomat, kdy zrazení přežívá 50% parazitů ať je rychlost zmrazování

jakákoli, kdežte při přidání glycerolu pomalejší průběh zmrázování zvyšuje počet přežívajících jedinců. V roce 1961 Diamond se spolupracovníky používá DMSO /dimethylsulfoxyd/ při chladové konservaci Entamoeba histolytica, trypanosomat a trichomonád. Roku 1964 Diamond konzervuje prvky Entamoeba invadens v 15% DMSO pomalým zmrázováním 1°C za minutu do minus 50°C; rychlé zmrazení /t.j. 8°C za minutu/ je ničící. Hwang se spolupracovníky /1964/ konzervuje nálevníky Tetrahymena pyriformis deseti procenty DMSO s 20% až 50% přežitím při rychlosti ochlazování 2°C za minutu, kdežte již rychlost 3°C za minutu je pro tento biologický systém smrtící.

Konservovali jsme kmen Trichomonas vaginalis /od Dr Petrá z Parasitologického ústavu KU v Praze/ kultivovaný v Diamondově půdě s 10% nativního koňského séra /Bioveta, Ivanovice na Hané/. Pro obtížnost získání čistého netoxického glycerolu, bylo použito jako kryoprotektiva pouze DMSO, a to ve třech koncentracích: 5, 10, 15% k Diamondově půdě. 72 hodinové kultury trichomonád /s polooviční výměnou media v 48. hodině/ byly pozvolna smíchány rovným dílem s půdou s dvojnásobnou koncentrací DMSO. Výsledná suspenze o hustotě 2-5 x 10⁵ buněk na ml v zatavených 1 ml ampulkách byla ponořena do alkoholové lázně vychlazené na plus 10°C a teplota snižována nanejvýše po 1°C za minutu v dvoukomorové zmrazovací skříní s konstantním teplotním spádem se suchým ledem /CO₂/ v ethylalkoholu. Rozmrazování vzorků prováděno v proudící vodě při asi 38°C za stálého pohybu.

Testované vzorky byly rozmrazeny a inokulovány do Diamondovy kultivační půdy za 24 hodiny a za 199 dní, kdy se ukázala 5% koncentrace DMSO jako nejvhodnější. Zmrázovaná suspenze obsahovala 70% živých trichomonád a při rozmrazování tento počet klesl na 40%, což odpovídá asi 60%nímu přežívání konservovaných buněk. Růst byl makroskopicky odečitatelný již za 48 hodin po inokulaci 0,075, 0,15

a 0,2 ml testované suspenze do 5 ml média. Pod mikroskopem živé trychomonády nevykazovaly morfologických změn. Pokud se ovšem týká subtilních fyziologických změn, lze plným právem očekávat, neb jak se zdá dle nálezů v jiných biologických systémech /Böhm 1968/, dosavadní procedury pravděpodobně přece jenom vyvíjejí na zmrazovanou populaci buněk určitý selekční tlak ve prospěch jen těch nejživotaschopnějších jedinců.

S úspěchem jsme vyzkoušeli kombinaci ochranného účinku DMSO se sérem koňským při zmrazování bičíkovce Trichomona vaginalis a můžeme uzavřít, že metodika konzervace zmrazováním již poměrně široce uplatňovaná ve virologii a v zootechnice je též vhodná a principiálně i prakticky dostupná pro pracoviště protistologická.

Literatura

- Böhm F. Kandidátská disertační práce, ÚEBG Praha 1968
Diamond L.S., Cryobiol. 1: 95, 1964
Diamond L.S., Meryman H.T., Kafig E. J. Parasitol. 47 Supp.
Fulton J.D., Smith A.U. Ann. Trop. Med. Parasit. 47:240, 1953
Hwang S., Davis E.E., Alexander M.T. Science 144:64, 1964
McEntegart M.G. J. Hyg. Camb. 52:545, 1954
Levine N.D., Marquardt W.C. J. Protozool. 2:100, 1955
Polge C., Soltys M.A. ve sb. Recent Research in Freezing
and Drying - Oxford 1960
Polge C., Smith A.U., Parkes A.S. Nature 164:666, 1949