

«Клеточная инженерия»

Курс лекций кафедры фундаментальной медицины и биологии ВолгГМУ
для студентов медико-биологического факультета

Кость



Натуральный
киллер
НК клетка



Прогениторная
клетка
лимфоидного



T лимфоцит

Нейтрофил



Базофил

Тема лекции:

«Криоконсервация клеточных культур. Проблемы
и задачи криобиологии. Спорность крионики».



При глубоком охлаждении:

На уровне молекул

- Денатурация белков (холодовая и химическая)

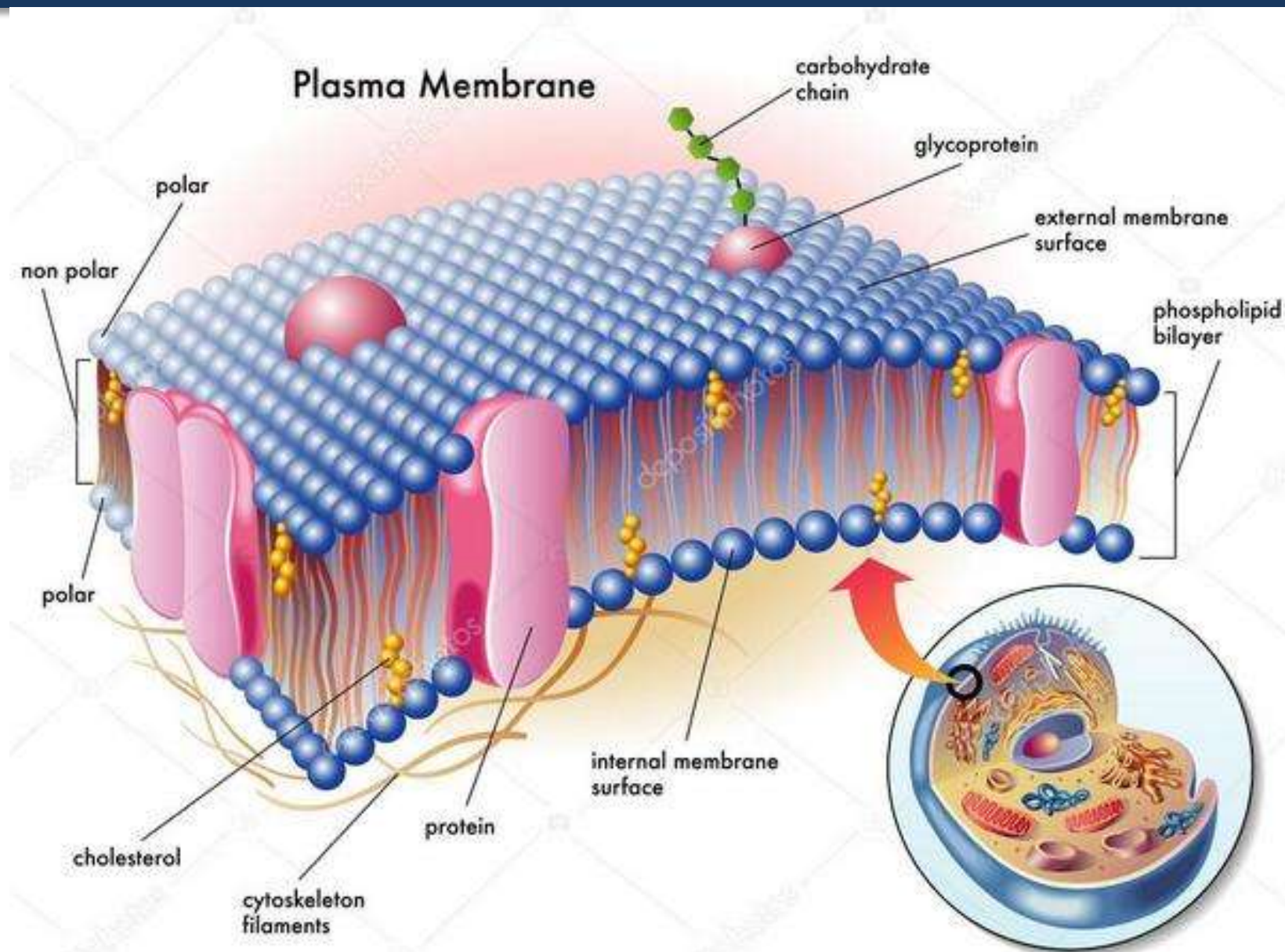
На уровне клеток

- Разрыв мембран

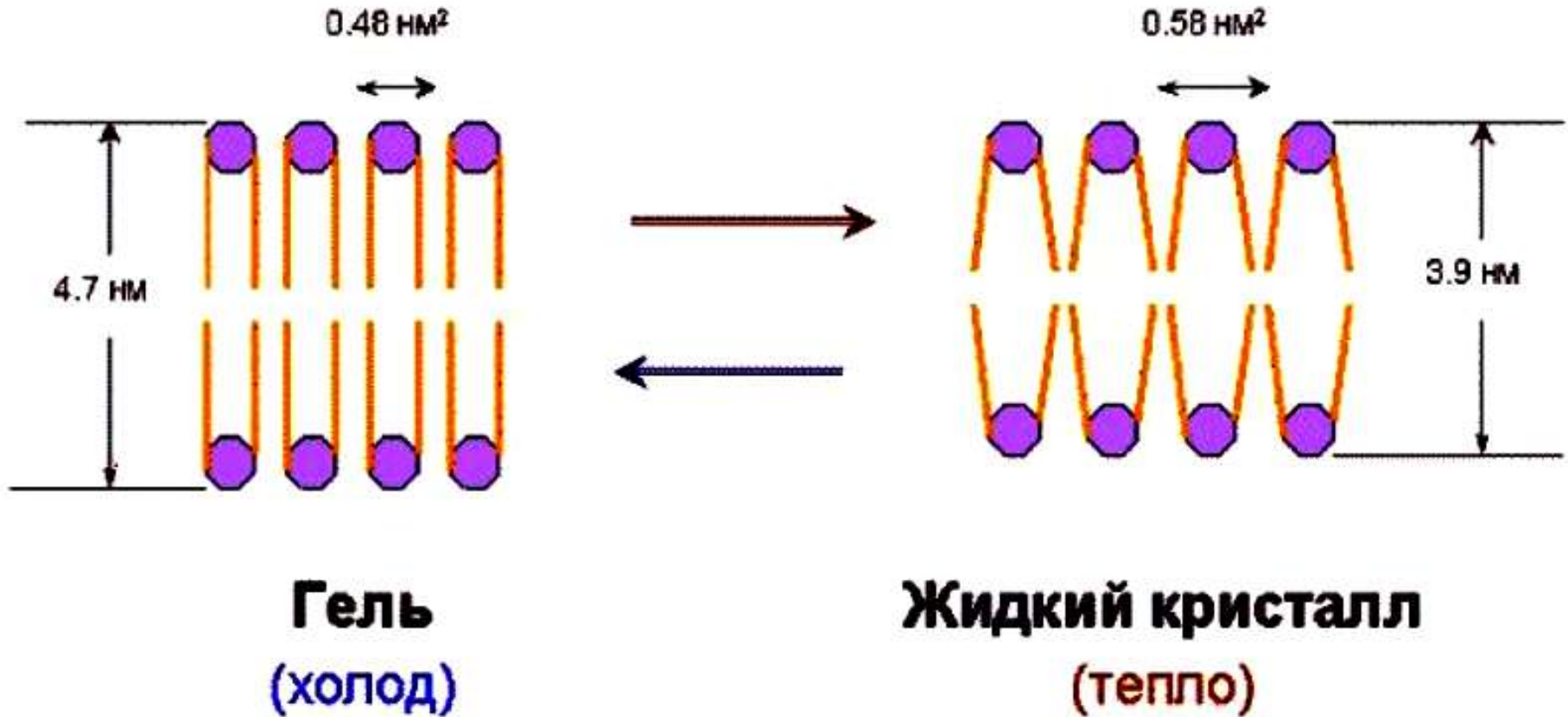
На уровне тканей

- Повреждение межклеточного матрикса
- Микро- и макротрещины

Строение клеточной мембраны



Фазовый переход в мембране



Криоконсервация.

Криоконсервация- замораживание при сверхнизких температурах.

Обычно его проводят в жидком азоте, при температуре -196°C .

При этом существуют определенные требования, которые следует выполнить до того, как клеточная линия будет подготовлена для криоконсервации

Требования к культуре перед замораживанием

| | | |
|-----------------------|-------------------------------|--|
| Приобретение | Конечная клеточная линия | Замораживание при ранних пассажах (<5 субкультур) |
| | Постоянная клеточная линия | Клонирование, селекция, и характеристика; амплификация. |
| Стандартизация | Среда | Выбор оптимальной среды, и твердо придерживаться этой среды). |
| | Сыворотка (если используется) | Выбор партии для использования на всех стадиях |
| | Субстрат | Стандартизируют по одному типу и поставщику, хотя необязательно по размеру для конфигурации. |
| Валидация | Происхождение | Записи деталей происхождения, истории жизни и свойств. |
| | Аутентификация | Проверка характеристик клеточной линии в сравнении с источником и происхождением |
| | Трансформация | Определение трансформированного состояния |
| | Контаминация | Микробиологическое исследование |

Оптимальное замораживание клеток для сохранения максимальной жизнеспособности при восстановлении после размораживания зависит от минимизации образования внутриклеточных кристаллов льда, а также предотвращения образования очагов высокой концентрации солей, возникающих при замораживании внутриклеточной воды. Это достигается путем:

медленного замораживания, так чтобы позволить воде покинуть клетку, но не настолько медленно, чтобы спровоцировать рост ледяных кристаллов;

использования гидрофильных криопротекторов для уменьшения содержания воды;

хранения клеток при самой низкой температуре, какую только возможно достигнуть, для того чтобы минимизировать действие высокой концентрации солей на денатурацию белков в мицеллах внутри льда;

быстрого размораживания для того, чтобы минимизировать рост кристаллов льда и появление градиента солей, образующегося в процессе таяния остаточного внутриклеточного льда.

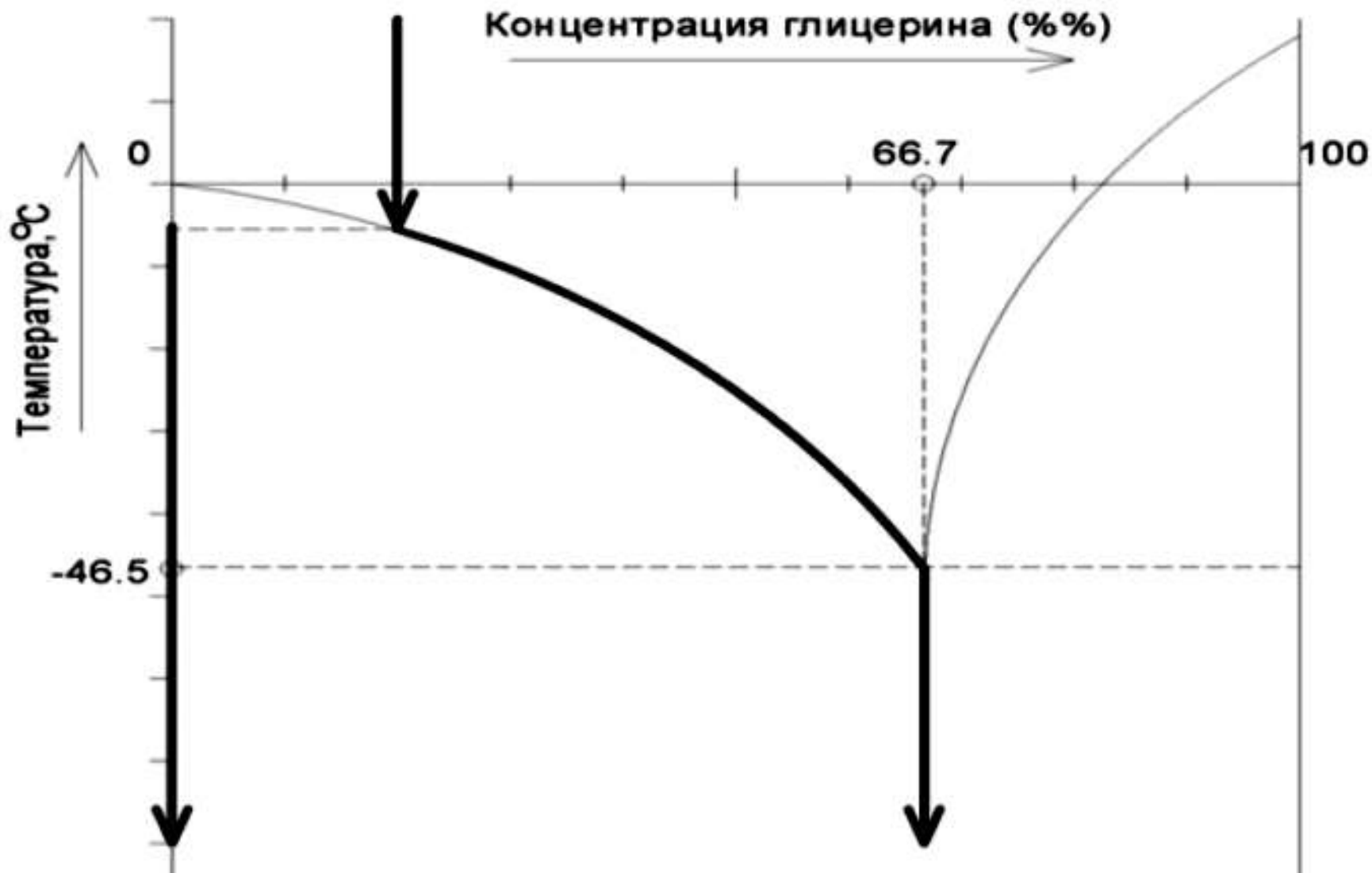
Среда для замораживания



DMSO должен быть бесцветным, его следует хранить в стеклянном или пропиленовом флаконе, поскольку он является сильным растворителем и выщелачивает примеси из резины и некоторых пластмасс.

Глицерин должен быть не старше одного года, при более продолжительном хранении он может стать токсичным.

Механизм действия криопротектора



Скорость охлаждения

Большинство культивированных клеток лучше выживают, если они охлаждаются со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Возможно, эта скорость является компромиссом между быстрым замораживанием, минимизирующим рост кристаллов, и медленным охлаждением, способствующим миграции воды из клеток.

Вид кривой охлаждения определяется:

1. температурой окружающей среды;
2. наличием изоляционного материала вокруг клеток, включая ампулу;
3. специфической теплоемкостью и объемом содержимого ампулы;
4. поглощением теплоты фазового перехода.

Кривая замораживания



Программируемый замораживатель

Если выживаемость клеток низкая, можно изменить среднюю скорость замораживания, используя программируемый замораживатель с зондом, определяющим температуру в ампуле, и с добавлением жидкого азота в морозильную камеру с необходимой частотой, чтобы обеспечить предварительно определенную скорость охлаждения и быстрое охлаждение после достижения эвтектической точки. Различные темпы охлаждения в разных фазах кривой охлаждения, экспериментально оптимизированные для конкретных клеток, могут быть запрограммированы путем внесения соответствующих изменений в кривую. Таким образом, программируемые замораживатели позволяют проводить полный контроль процесса

замораживания образца, осуществляя программируемое, контролируемое, протоколируемое и серийно воспроизводимое охлаждение до заданной температуры в парах жидкого азоте.



Научные достижения

ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30224180

An updated version of PubMed is now available.
Come see the new improvements to the interface!

Format: Abstract ▾

Send to ▾

Early Hum Dev. 2018 Nov;126:6-9. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2018.08.016. Epub 2018 Sep 14.

Science of cryopreservation in reproductive medicine - Embryos and oocytes as exemplars.

Yurchuk T¹, Petrushko M², Fuller B³.

⊕ Author information

Abstract

The modern successes of reproductive medicine are based on the achievements in the fields of artificial fertilization and cryobiology over the last 50 years. Cryopreservation of oocytes makes it possible to preserve their reproductive potential after surgical interventions, treatment of cancer, for delayed pregnancy and to use cells for donation. Cryopreservation of embryos allows not only to reduce the multiple pregnancies rate and to increase the cumulative pregnancy rate as a result of embryo transfer in the following favorable cycles of the patient, but is also a necessary procedure in case of genetic diagnosis or in the case of contraindications for embryo transfer in the stimulated cycle due to possible complications. However, the viability of cryopreserved oocytes and embryos depends on the degree of their cryo damage during the process of freeze-warming. In this regard, it is very important to develop such freezing protocols that minimize the damages caused by the intra- and extracellular ice crystal formation, toxic effect of high concentrations of cryoprotectants and osmotic stresses. The effectiveness of cryopreservation of gametes and embryos is assessed on the basis of morphological, functional and genetic changes in the cells after warming. Special attention should be paid to the ethical issues of assisted reproductive technology, including cryobiotech technologies, which in many countries remain open and in need of settlement.

Copyright © 2018. Published by Elsevier B.V.

PMID: 30224180 DOI: [10.1016/j.earlhumdev.2018.08.016](https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2018.08.016)

Indexed for MEDLINE

Научные достижения

ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32187691

An updated version of PubMed is now available.
Come see the new improvements to the interface!

Format: Abstract ▾

Send to ▾

Transfusion. 2020 Mar 18. doi: 10.1111/trf.15759. [Epub ahead of print]

Inhibition of ice recrystallization during cryopreservation of cord blood grafts improves platelet engraftment.

Jahan S^{1,2}, Adam MK³, Manesia JK¹, Doxtator E¹, Ben RN³, Pineault N^{1,2}.

⊕ Author information

Abstract

BACKGROUND: Platelet engraftment following cord blood (CB) transplantation remains a significant hurdle to this day. The uncontrolled growth of ice, a process referred to as ice recrystallization, is one of several mechanisms that lead to cell loss and decreased potency during freezing and thawing. We hypothesized that reducing cell damage induced by ice recrystallization in CB units (CBUs) would reduce losses of stem and progenitor cells and therefore improve engraftment. We previously demonstrated that the ice recrystallization inhibitor (IRI) N-(2-fluorophenyl)-D-gluconamide (IRI 2) increases the postthaw recovery of CB progenitors. Herein, we set out to ascertain whether IRI 2 can enhance platelet and bone marrow engraftment activity of hematopoietic stem cells (HSCs) in cryopreserved CBUs using a serial transplantation model.

STUDY DESIGN AND METHODS: CBUs were processed following standard volume/red blood cell reduction procedure and portions frozen with dimethyl sulfoxide (DMSO) supplemented or not with IRI 2. Thawed CB samples were serially transplanted into immunodeficient mice.

RESULTS: Our results show that supplementation of DMSO with IRI 2 had several beneficial effects. Specifically, higher levels of human platelets were observed in the peripheral blood ($p < 0.05$; $n = 4$) upon transplant of CBUs preserved with the IRIs. In addition, human BM chimerism and the number of human CFU progenitors in the bone marrow were superior in IRI 2 recipients compared to DMSO recipients. Moreover, IRI 2 had no negative impact on the multilineage differentiation and self-renewal activities of HSCs.

DISCUSSION: Taken together, these results demonstrate that supplementation of a hematopoietic graft with IRI can improve the postthaw engraftment activities of HSCs.

© 2020 AABB.

PMID: 32187691 DOI: [10.1111/trf.15759](https://doi.org/10.1111/trf.15759)

Научные достижения

ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32156543

An updated version of PubMed is now available.
Come see the new improvements to the interface!

Format: Abstract ▾

Send to ▾

Int J Biol Macromol. 2020 Mar 7. pii: S0141-8130(19)40672-7. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.039. [Epub ahead of print]

Gelatin carrageenan sericin hydrogel composites improves cell viability of cryopreserved SaOS-2 cells.

Ashe S¹, Behera S¹, Dash P¹, Nayak D¹, Nayak B².

+ Author information

Abstract

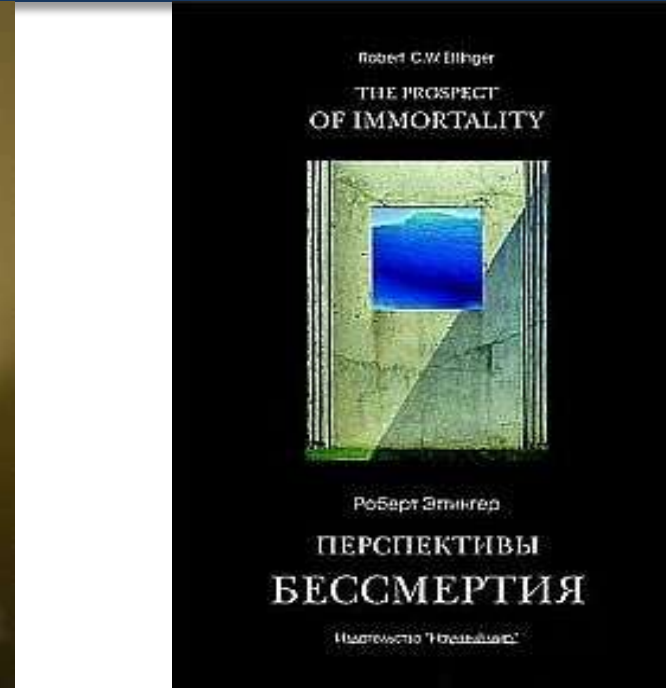
Cryopreservation and the low revival rate of cryopreserved cells remains a major challenge in cell based bone regeneration therapies. In our current study we aimed to develop a sericin based hydrogel composite incorporating various drugs and growth factors to enhance cell attachment, cryopreservation to increase the cellular viability upon revival. Sericin, gelatin and carrageenan blended hydrogel composites were prepared and explored for their physicochemical properties. The hydrogels prepared were porous and showed higher biocompatibility. Further, silver nanoparticles, alendronate and insulin like growth factor (IGF-1) were incorporated into the hybrid hydrogels individually and checked for sustained drug release profile. IGF-1 incorporated hydrogels composites showed better osteogenic cell attachment, proliferation and cell revival upon cryopreservation. The clonogenic potential of seeded cells upon 30 days of cryopreservation was also evaluated which was 55% in IGF-1 incorporated scaffold cells. A flow cytometry based staining protocol using Annexin V was developed which showed a live cell population up to 80% even after 30 days of cryopreservation. These results validate the potential of our formulated hydrogels as cell based systems aimed for increasing cell survival upon cryopreservation and thus has a great potential for bone repair and regeneration.

Copyright © 2020. Published by Elsevier B.V.

KEYWORDS: Bone regeneration; Cellular viability; Cryopreservation; Hydrogel; Sericin

PMID: 32156543 DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2020.03.039](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.039)

Крионика



В 1962 Роберт Эттингер выпустил книгу «Перспективы бессмертия» (The Prospect Of Immortality), которая привлекла внимание общественности и послужила началом формирования крионического движения.

В 1968 было создано Крионическое общество Мичигана, в наши дни известное как Имморталистическое общество (Immortals Society).

В 1972 написал книгу «Man Into Superman». В 1976 участвовал в создании Института Крионики. Возглавлял оба общества до 2003 года

Цель крионики

Перенос терминальных (обреченных на смерть) пациентов в тот момент в будущем, когда будет доступна технология для репарации клеток/тканей и будет возможно восстановление всех функций организма и здоровья в целом. Такой технологией, по всей вероятности, будет нанотехнология и, в частности, разработанные в ее рамках молекулярные роботы.

Крионика - это область научно-практической деятельности, которая интегрирует в себя криобиологию, криогенную инженерию и практику клинической медицины с целью разработки и применения криостаза .

Криостазом называют консервацию людей путем их замораживания до ультранизких (криогенных) температур.

Этапы крионического процесса

1. *Подготовительный (прижизненный)*

2. Подготовительный (посмертный)

3. Замораживание

4. Хранение

5. *Восстановление*

Посмертная подготовка

1. Охлаждение

2. Введение гепарина, тромболитиков, антиоксидантов, мембранопротекторов, ингибиторов апоптоза, хелаторов, антибиотиков и др

3. Перфузия раствором криопротектора

Повреждения на этапах 2-4

1. Разрушение нейронов вследствие аутолиза, апоптоза и др

2. Осмотический шок

3. Токсичность криопротектора

4. Холодовая денатурация белков

5. Повреждения кристаллами льда

Аспекты крионики

Этический

Философский

Религиозный

Естественнонаучный

Финансовый

Правовой

Технический