

Kryobiologi – nedfrysing og oppbevaring av levende celler og vev

Sammendrag

Bakgrunn. Nedfrysing og oppbevaring av levende celler fra mennesker har en mer enn 300-årig historie. I de senere årene har emnet fått økende aktualitet i medisinen.

Metoder. Det er to hovedprinsipper for nedfrysing av levende celler og vev: Ved programmert nedfrysing kjøles de ned ved et langsomt temperaturfall, vanligvis 1 °C per minutt. Den andre metoden er vitrifisering hvor celler og væske går over i en glassaktig fast fase gjennom raskt temperaturfall. I begge tilfeller har man tilsatt stoffer som hindrer danning av iskrystaller som ellers vil sprengte cellene.

Resultater. Celler og vev kan oppbevares ved -70 °C i opptil seks måneder og i mer enn 10–15 år ved -196 °C, dvs. i flytende nitrogen. Etter optining er viabiliteten som regel over 90 %. Slike fryseteknikker har stor anvendelse innen forskning, in vitro-fertilisering, til oppbevaring av stamceller og til transplantasjon. Celler og små vevsbiter fra ulike organer blir oppbevart i forbindelse med behandling av forskjellige sykdommer, alt fra brannskader til artroser. Store biobanker er under oppbygging både til vitenskapelig, diagnostisk og terapeutisk bruk.

Konklusjon. Moderne fryseteknikker er i ferd med å bli viktige hjelpemidler på alle områder av medisinen hvor man bruker celler og mindre vevsbiter. Hele organer eller individer lar seg imidlertid ikke fryse ned i levedyktig stand. Kryonisering (cryonics) der man mot betaling fryser ned hele mennesker, er useriøst og bare en form for mumifisering.

Engelsk sammendrag finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

Sigrid Solberg

Ole Didrik Lærum

ole.laerum@gades.uib.no

Avdeling for patologi

Gades Institutt

Haukeland Universitetssykehus

5021 Bergen

Nedfrysing og optining av mennesker er omspunnet av mange historier og myter. Det finnes flere eksempler på at folk er blitt funnet livløse ute i kulden og normalt skulle vært ihjelfrosne, men våkner opp etter en stund når de kommer inn i varmen. Sammenblanding av begrepene nedkjøling – hypotermi – og nedfrysing har ført til myten om at pasienter kan fryses ned idet de dør, for siden å bli tint opp når man har funnet en effektiv behandling mot sykdommen de døde av. I filmer som *Sleeper*, *Forever young* og *Vanilla sky* ble det vist hvordan mennesker kan legges på is for senere å tines opp igjen. Det finnes i dag flere firmaer i USA som driver kommersiell nedfrysing av dødssyke mennesker like etter at de trekker sitt siste åndedrag. Det er knyttet sterke økonomiske interesser til kryonisering (cryonics).

Derimot er kryobiologi, læren om programmert nedfrysing og oppbevaring av celler i suspensjon og små vevsbiter, blitt et høyaktuelt emne innen medisinsk forskning og behandling og som har en lang forhistorie (tab 1) (1–3). Forbedring av nedfrysings- og oppbevaringsteknikkene har gjort det mulig å kryopreservere et stort spekter av celletyper og organbiter. Utviklingen av fryseteknikker har ikke bare fått store følger særlig for reproduktiv medisin og veterinærmedisin, men også for medisinsk forskning og blodbankvirksomhet

Ettersom nye terapiformer utvikles, kan kryobiologi få økende praktisk anvendelse. Derfor ønsket vi å presentere en oversikt over dette feltet for norske lesere. Oversikten er basert på litteraturgjennomgang etter søk i Medline og egne erfaringer (tab 2).

Prinsipper for nedfrysing

Det er hovedsakelig to måter å bringe levende celler til dypfrost tilstand på: vitrifisering og langsom, kontrollert nedfrysing (tab 2). Vitrifisering var allerede i 1930-årene omtalt og antatt som den beste metoden for preservering av celler og vev (4), men ennå har man ikke klart å gjøre metoden effektiv for klinisk eller kommersiell bruk. Standardme-

toden som er blitt brukt er derfor langsom, kontrollert nedfrysing (5): Når vannet i en løsning krystalliseres, fryser løsningen. Da alle celler består av om lag $\frac{2}{3}$ vann, vil det ved nedfrysing dannes intracellulære iskrystaller, som ødelegger cellene.

Hvis man sørger for tilstrekkelig langsom nedkjøling og god permeabilitet for vann gjennom cellemembranen, forblir det isfritt intracellulært (6). Dersom nedfrysingen skjer for raskt, vil ikke cellen kunne frakte vann hurtig nok ut, og det blir også dannet intracellulære iskrystaller. Økende kjøle-hastighet gir økt intracellulær isdanning. Ettersom krystallene vokser, fjernes vann fra væskefasen, og konsentrasjonen av elektrolytter og proteiner øker kraftig. Dette utsetter cellene for osmotisk stress, og cellene dehydreres gjennom osmose. På den motsatte siden vil for langsom nedfrysing føre til langvarig eksponering for høye ekstracellulære konsentrasjoner av salter, proteiner og nødvendige tilsetningsstoffer. Både for hurtig og for langsom nedfrysing vil altså kunne skade cellen. Derfor finnes det en optimal nedfrysingshastighet. Dette er hovedprinsippet for den langsomme, kontrollerte nedfrysingen (7) (fig 1). Når cellene er ført til dypfrost tilstand, kan de lagres i et varierende tidsrom, fra bare noen uker ved -20 °C til flere tiår i flytende nitrogen (fig 2).

Skade under fryse-/tineprosessen

I prosessen skades cellene av termiske, mekaniske og kjemiske krefter. Krystaldanningen ekstracellulært kan skade cellene på to måter: direkte ved at cellene sprenges, og indirekte ved at is er et dårlig løsningsmiddel, og proteiner, elektrolytter og frysestoffer konsentreres i den gjenværende væsken når det dannes is.



Hovedbudskap

- Praktisk talt alle typer levende celler og små vevsbiter kan fryses ned og oppbevares levende i flere tiår
- Slik nedfrysing er blitt et viktig hjelpemiddel både til forskning og til klinisk bruk ved transplantasjoner
- Kombinert med biomaterialer vil forbedring av fryseteknikkene og vevskulturmetodene kunne ha stort potensial for bruk ved intervensjonskirurgi til reparasjon og remodellering av syke og defekte organer

Tabell 1 Viktige fremskritt innen kryobiologi

1776	Spermier fryst ned i snø, gjenvinner sin motilitet etter tining	Spallanzani
1866	Nedfrysing av røde blodceller	Ponchet
1898	Vitrifisering beskrives	Tamman
1938	Spermier gjenvinner motilitet etter å ha vært preservert ved $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ eller $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$	Jahnel
1948	Svangerskap hos kanin etter lagring av kaninembryo med kryogene teknikker	Chang
1949	Oppdagelsen av at glyseroltilsetning beskytter mot fryseskade	Polge, Smith & Parkes
1953	Første graviditet etter inseminering av spermier oppbevart ved hjelp av krypteknikk	Bunge & Sherman
1955	Kryopreserverte celler fra milt kan injiseres etter letale strålingsdoser, og gir hematologisk restitusjon hos mus	Barnes & Loutit
1963	Teori om kryogen skade av celler	Mazur
1974	Metode for kontrollert nedfrysing av cornea utvikles. Benyttes kun i kort tid	Sperling
1974	Bruk av ulike krystallhindrende tilsetningsstoffer	Bank & Mauer
1984	Første fødsler etter implantasjon av humant embryo, oppbevart ved hjelp av krypteknikk	Zeilmaker
1994	Ovarialt vev fra sauer oppbevart ved hjelp av kryogene teknikker, og deretter transplantert med påfølgende svangerskap.	Gosden

Tabell 2 Noen sentrale begreper

Kryobiologi	Læren om biologiske forhold ved nedfrysing av levende celler og vev
Kryonisering (cryonics)	Fagfeltet nedfrysing av mennesker
Vitrifisering	Rask nedfrysing i høy konsentrasjon av stoffer som hindrer danning av iskrystaller
Programmert nedfrysing	Jevnt temperaturfall, først langsomt, siden raskt i lav konsentrasjon av stoffer som hindrer danning av iskrystaller
Anhydrobiosis	Visse organismers overlevelse av langvarig inntørring. Frysetørring, eller lyofilisering, er utviklet på bakgrunn av dette prinsippet
Biobank	En systematisert samling av celler eller vev

For eksempel øker NaCl-konsentrasjonen i en isoton løsning 32 ganger fra 4° til $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ (8). Dette vil utsette cellene for osmotisk stress. Ved tilstrekkelig langsom nedfrysing dehydreres cellene ved osmose. Molekyler i cellen med polare deler søker da å danne hydrogenbindinger med andre stoffer enn vann. Dette kan føre til sammenklumping og denaturering av proteiner samt destabilisering av cellemembranen. Dersom det er blitt dannet intracellulær is under nedkjølingen, vil en langsom opptinningsprosess gjøre at iskrystallene vokser og skader cellene ytterligere. Celler som er blitt fryst langsomt ned, har best av å bli tint hurtig opp igjen.

Man forsøker å begrense graden av celledskade ved å tilsette såkalte kryobeskyttende stoffer (5). De skal forhindre skade og øke overlevelse. Deres måte å virke på er ikke fullt klarlagt, men baserer seg på følgende hovedprinsipper:

- Beskytte mot potensielt toksisk elektrolyttkonsentrasjon
- Redusere effekten av dehydrering
- Redusere isdanning
- Stoppe frie radikaler
- Danne hydrogenbindinger med polare molekyler
- Stabilisere cellemembranen

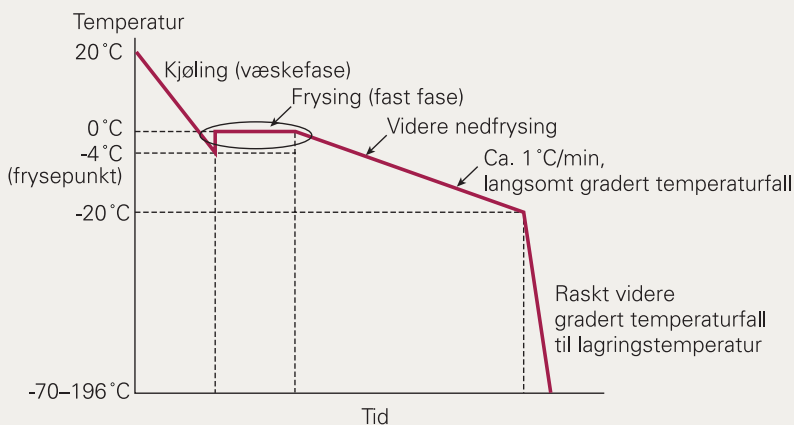
Eksempler på slike stoffer er foruten klassikere glyserol og dimetylsulfoksid (DMSO), nye og lovende stoffer som katalase, propan-1,2-diol og butan-2,3-diol. Gjennom celledskade som opptrer ved slik nedfrysing, hvor både termiske, mekaniske og kjemiske krefter virker på cellen, kan apoptose aktiveres (9). På den bakgrunnen er det gjort forsøk med å tilsette apoptosehemmere i fryseløsningen for å hindre for stor celledød. Derved overlever flere av cellene. Tilsetning av serum, dvs. makromolekyler, til frysemediet er også med på å beskytte cellene.

Vitrifisering fører til glassaktig solidisering av levende celler ved at viskositeten økes slik at væsken kan gå raskt over i fast fase uten at det dannes iskrystaller (10). Vannet går da over i fast fase sammen med cellene, hvor man fullstendig unngår danning av iskrystaller under kjøling og oppvarming, både intracellulært og ekstracellulært. Anvendelsen er vanskelig på grunn av de potensielt toksiske, høye konsentrasjonene og de spesielt høye nedfryshastighetene som er nødvendige. Ved vitrifisering er kjølingshastigheten om lag $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ per minutt, mens ved programmert nedfrysing er den på ca. $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ per minutt inntil man oppnår fullstendig solid vannfase. Deretter skjer nedfrysingen videre med $3\text{--}4\text{ }^{\circ}\text{C}$ per minutt inntil lagringstemperaturen.

Praktisk anvendelse
In vitro-fertilisering/
reproduksjonsmedisin

Det er særlig innen reproduksjonsmedisinen at fryseteknikkene er blitt optimalisert og fått videst anvendelse (11). Ved *in vitro*-fer-

Figur 1



Prinsippet for programmert nedfrysing: Ved kjøling til frysepunktet avgis varme inntil celler og væske er over i fast fase. Når all væsken er over i fast fase, fortsetter nedkjølingen. Deretter skjer programmert temperaturfall på ca. $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ per minutt ned til $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, og siden raskt temperaturfall, dvs. $3\text{--}4\text{ }^{\circ}\text{C}$ per minutt inntil man når lagringstemperaturen



Figur 2 Frysetank til oppbevaring av levende celler i flytende nitrogen. Foto Gades Institutt

tilisering fryser man ned tiloversblitte befruktede egg for senere bruk dersom implan- tasjon ikke skulle bli vellykket. Dette med- fører at alle embryoer teoretisk sett kan bli brukt.

Fryst sæd har vært brukt i stor utstrekning innen veterinærmedisinen. En viss klinisk bruk i Norge skjer ved at sædceller fra pa- sienter med testikkelkreft blir nedfryst før pasientene får kjemoterapi og bestråling. Det er mange eksempler på normal graviditet med bruk av fryselaget sæd (12, 13).

Ettersom mange cytostatika er beinmarg- stoksiske, kan høydose cytostatikabehand- ling ved maligne hematologiske tilstander og solide tumorer føre til dødelig bein- margssvikt. Ved å oppbevare fryste stamcel- ler utenfor organismen mens behandlingen gis, kan cellene tines opp og sprøytes tilbake i pasientene (14).

Nedfrysing av små hudbiter er blitt et vik- tig verktøy i behandlingen av forbrenninger og i plastisk/rekonstruktiv kirurgi. Sammen- liknet med ferske hudtransplantater, kan nedfryste hudbiter lagres i opptil fem år uten signifikant tap av kvalitet. Langerhanske øyer holder seg også viable etter lagring i nitrogen. Lagring av organer ved hjelp av kryoteknikker er imidlertid bare i utviklings- fasen, ettersom størrelse på vevsbiter som kan fryses ned, er begrenset.

Bruk i forskning

Nedfrysing av celler og vevsbiter er blitt et viktig verktøy i eksperimentell medisinsk forskning. Det gjelder ikke minst innen kreftforskningen, der kreftceller av ulike ty- per og med ulike biologiske egenskaper kan fryses ned og oppbevares levende i 10–20 år. Det gjelder også kreftceller fra mennes- ker, der man i biobanker kan oppbevare store kvanta av levende celler fra pasienter med forskjellige typer sykdommer. Med en slik biobank har man et stort antall ulike kreft-

celler til rådighet, ofte i mange år etter at pa- sienten er død av sykdommen.

Verdifulle cellekulturer kan oppbevares nedfryst, slik at man ikke er avhengig av å dyr- ke dem kontinuerlig i cellekultur. Det samme gjelder en rekke forskjellige transplantable svulster hos forsøksdyr, inklusive kreftsvulster fra mennesker som blir transplantert på im- mundefekte dyr. Moderne kreftforskning er utenkelig uten bruk av slike fryseteknikker.

Biobanker for stamceller fra navle- strengsblod har fått særlig stor aktualitet et- ter oppdagelsen av at ulike stamceller har stor grad av plastisitet, og at hemopoetiske stamceller trolig kan medvirke til å danne andre vevstyper, for eksempel hjerneceller, lever- og bindevevsceller. Det er mulig å dyrke stamceller eller vanlige celler i små «støpeformer» av biomaterialer, slik at man får dannet organfragmenter i vevskultur. Dette kan enten brukes direkte eller fryses ned for siden å settes inn i pasienter og re- modellere et defekt organ. Fordi stamceller har nesten ubegrenset delingsevne, gir kom- binasjonen av disse teknikkene ufattelige muligheter. Derfor tyder alt på at biobanker, cellekultur, stamceller, og kryobiologi i kombinasjon vil bli potente verktøy i be- handling av sykdommer i fremtiden. Celle- og vevsterapi kombinert med mikrokirurgi er høyaktuelle nye fagfelter (15).

Forventninger til fremtidig kryopreservering

Fortsatt er det et stort behov for større kunns- kap om molekylære mekanismer for celle- skade under nedfrysing, ettersom verktøyene man har for lagring av levende celler og vev ligger langt etter den medisinske utviklingen ellers. Mye gjenstår også i overføring fra teori til praktisk klinisk bruk. Samtidig er det behov for større forståelse av fysiokjemiske prosesser som fører til celledskade og mer kunnskap om hvorledes ulike organismer overlever ekstrem kulde eller dehydrering. Foreløpig er ødele- gelse av ekstracellulære strukturer gjennom dannelse av is hovedproblemet. Effektive meto- der for vitrifisering vil derfor kunne løse pro- blemene. Wang og medarbeidere har allerede beskrevet vellykket transplantasjon av ovarier og tuber hos rotter etter bruk av slik frysetek- nikk (16), og nye tilsetningsstoffer vil kunne forbedre resultatene ytterligere (17).

Utvikling av frysetørring på bakgrunn av prinsippet for anhydrobiosis kan gi oss en ny og effektiv metode for oppbevaring av leven- de celler (18). Anhydrobiosis går ut på at organismer som plantefrø, bakterier og sopp kan overleve langvarig inntørking. Metoden har allerede i lang tid vært benyttet i mikro- biologien for oppbevaring av ulike mikrober.

Transplantasjoner er i dag begrenset av tilgangen til friske donerte organer, og av den korte tiden de holder seg levedyktige et- ter at de er operert ut fra donor. Denne delen av medisinen kunne revolusjoneres dersom organene overlevde nedfrysing. Man kunne da oppbevare organer i påvente av en pas-

sende mottaker, i stedet for å la mottaker vente på et passende organ.

For tiden er det store forventninger til klin- isk bruk av store biobanker, og ikke minst til forbedring av selve metodene. Hvis stør- relsen på vevsbiter som overlevde nedfry- sing kunne økes med 10–100 ganger, ville dette kunne føre til et stort terapeutisk poten- sial. Hvis man kombinerer frysepreservering med vevskulturteknikker og biomaterialer, vil man med bruk av intervensjonskirurgi kunne remodellere ødelagte organer i stor stil. Fortrinnsvis bør pasientens egne celler brukes, men også tilbudet på allotransplan- tasjon ville kunne økes betydelig. Likevel tror vi det er usannsynlig innen overskuelig fremtid at man skal kunne fryse ned hele or- ganer og større kroppsdelar og oppbevare dem levende. Nedfrysing og oppbevaring av hele mennesker er å betrakte som mumifise- ring og er en useriøs behandlingsmetode.

Litteratur

1. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164: 666.
2. Barnes DWH, Loutit JF. The radiation recovery factor: preservation by the Polge-Smith-Parks technique. *J Natl Cancer Inst* 1955; 15: 901.
3. Rowley S. Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. *J Hematother* 1992; 1: 233–50.
4. Luyet B. The vitrification of organic colloids and protoplasm. *Biodynamica* 1937; 1: 1–14.
5. Hubel A. Parameters of cell freezing: implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfus Med Rev* 1997; 11: 224–33.
6. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at sub-zero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47: 347–69.
7. Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Sem Reprod Med* 2002; 20: 5–13.
8. Lovelock J. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953; 10: 414–26.
9. Abrahamsen J, Bakken AM, Bruserud Ø et al. Flow cytometric measurement of apoptosis and necrosis in cryopreserved PBPC concentrates from patients with malignant diseases. *Bone Marrow Transplant* 2002; 92: 165–71.
10. Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favourable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002; 78: 449–54.
11. Ludwig M, Al-Hasani S, Felberbaum R et al. New aspects of cryopreservation of oocytes and embryos assisted reproduction and future perspectives. *Hum Reprod* 1999; 14 (suppl 1): 162–85.
12. Kliesch S, Kamischke A, Nieschlag E. Cryopreservation of human semen. I: Nieschlag E, Behre HM, red. *Andrology: male reproductive health and dysfunction*. New York: Springer, 1997: 348–56.
13. Jacobsen KD, Fosså SD, Bjørø TP et al. Gonadal function and fertility in patients with bilateral testicular germ cell malignancy. *Eur Urol* 2002; 42: 229–38.
14. Abrahamsen J, Bakken AM, Bruserud Ø. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+cells. *Transfusion* 2002; 42: 1573–80.
15. Palsson B, Hubbel JA, Plonsey R et al. Tissue engineering. Boca Raton: CRP Press, 2003.
16. Wang X, Chen H, Yin H et al. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 2002; 415: 385.
17. Zhang X, Li K, Tau KH et al. Trehalose ameliorates the cryopreservation of cord blood in a preclinical system and increases the recovery of CFUx, long-term culture-initiating cells, and nonobese diabetic-SCID repopulating cells. *Transfusion* 2003; 43: 265–72.
18. Wolkers WF, Crowe JH. From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells. *Comp Biochem Physiol* 2002; 131: 535–43.