

TECHNIKI MROŻENIOWE

Pracownia Endokrynologii Zwierząt i Hodowli Tkanek

Wstęp

Utwardzenie materiału biologicznego poprzez zamrożenie jest bardzo wygodną metodą przygotowania tkanek i komórek do dalszych badań. Technika mrożeniowa ma bardzo wiele zalet, a mianowicie nie wymaga wcześniejszego przygotowania (odwadniania, itp.) i zatapiania w substancjach utwardzających.

Techniki mrożeniowe mają coraz częstsze zastosowanie, ponieważ:

a) Można otrzymać gotowy, zamrożony materiał w bardzo krótkim czasie od momentu pobrania go. Wykonanie gotowego preparatu z zamrożonej tkanki w ciągu kilkunastu minut jest szczególnie istotne przy wykonywaniu badań histopatologicznych w trakcie operacji.

b) Podczas zamrażania wszystkie składniki chemiczne pozostają w komórce. Nie ulegają wypłukaniu lipidy, co towarzyszy zwykle zatapianiu tkanki w parafinie.

c) Niska temperatura, w której przebiega, zamrażanie, zapobiega denaturacji białek, a równocześnie zostaje zachowana aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych.

Zawartość wody w tkankach waha się w granicach 10 (kości) do 85% (substancja szara mózgu). Istotą procesu zamrażania jest przemiana wody zawartej w komórce w lód, czyli krystalizacja. Podczas obniżania temperatury w komórce wytwarzają się ośrodki krystalizacji, wokół których gromadzą się powstające kryształki lodu. Powiększające się skupiska kryształków lodu uszkadzają komórkę, powodując jej rozerwanie. W związku z tym należy dążyć do zredukowania rozmiarów tworzących się kompleksów, a w krańcowym przypadku do wyeliminowania procesów krystalizacji. Wiadomo jest, że im więcej powstaje centrów krystalizacji, to tym mniejsze rozmiary osiągają tworzące się kryształy i mniejsze jest prawdopodobieństwo rozerwania komórki. Gwałtowne zamrożenie materiału do jak najniższej temperatury daje największą szansę na utworzenie licznych centrów krystalizacji. Przy odpowiedniej szybkości zamrażania może dojść do tzw. witrifikacji wody, czyli przejścia w stan stały bez procesu krystalizacji. Powstały lód ma postać amorficzną, a nie krystaliczną. Prawdziwą witrifikację można osiągnąć tylko przy tempie schładzania większym niż 2×10^5 °C/sek w krytycznym zakresie temperatur od 20 do -100 °C. Takie tempo zamrażania można osiągnąć jedynie przy bardzo cienkiej warstwie (3 µm) zamrażanej substancji, np. wirusy zawieszone w warstwie cieczy o podanej grubości.

Techniki stosowane do szybkiego mrożenia można podzielić na trzy grupy:

– konwencjonalne gwałtowne zamrażanie z tempem ochładzania pomiędzy -10^3 a -10^4 °C/sek,

- ultraszybkie zamrażanie poniżej -10^4 °C/sek,
- hyperbaryczne zamrażanie, w którym tempo zamrażania jest stosunkowo wolne, ale tworzenie centrów krystalizacji i ich wzrost odbywają się pod zwiększonym ciśnieniem.

Konwencjonalne gwałtowne zamrażanie

Zniszczenia powodowanego przez wzrost kryształków lodu można uniknąć przez stosowanie wolnego schładzania tkanek, które uprzednio zostały przepojone tzw. krioprotektantem. Są to substancje, których wodny roztwór w temperaturze krzepnięcia nie tworzy kryształów, lecz ulega żelifikacji. Najczęściej stosowane są: 20–30% roztwór glicerolu, 15–30% roztwór sacharozy lub 10% roztwór dwumetylosulfotlenku (DMSO). Ten ostatni stosowany jest zawsze w roztworach służących do zamrażania linii komórkowych.

W szczególnych przypadkach, kiedy materiał biologiczny zawiera bardzo niewielkie ilości wody (drożdże, bakterie, skoncentrowane preparaty błon), próbki mogą być zmrożone konwencjonalnymi metodami bez krioprotekcji.

Zamrażanie materiału biologicznego odbywa się przez zanurzenie go w ciekłych gazach. Najczęściej do tego celu używa się ciekłego azotu (temperatura wrzenia -196°C), który jest łatwo dostępny i stosunkowo tani. Niestety zanurzenie tkanki bezpośrednio w ciekłym azocie nie jest korzystne dla zachowania ultrastruktury komórki, ponieważ w ten sposób można osiągnąć tylko wolne tempo zamrażania (-10^3 °C/sek). W rezultacie następuje istotne zniszczenie struktury przez tworzące się bardzo duże kryształy. Dzieje się tak dlatego, że ciepło wydzielane przez zanurzaną ciepłą tkankę wytwarza izolującą warstwę parującego azotu na jej powierzchni i w ten sposób zwalnia tempo obniżania temperatury warstw tkanki położonej głębiej. Lepsze rezultaty można otrzymać, stosując mieszaninę stałego i ciekłego azotu (-208°C). Kłopotliwe jest jednak to, że nie ma łatwo dostępnego ciekłego gazu, który mógłby służyć do ochładzania opisanej mieszaniny.

Dlatego standardową metodą zamrażania jest zanurzenie próbek w cieczy do zamrażania, chłodzonej do temperatury w pobliżu krzepnięcia przez ciekły azot. Takie wtórne ciecze do zamrażania łączą w sobie idealnie wysokie przewodnictwo cieplne, wysoką pojemność cieplną, punkt zamarzania bliski punktowi wrzenia ciekłego azotu i dużą różnicę temperatur pomiędzy punktami zamarzania i wrzenia. Freon 22 (chlorodifluorometan CHClF_2 , punkt topnienia -155°C , punkt wrzenia -40°C) jest najczęściej używanym wtórnym ciekłym gazem do zamrażania materiału biologicznego. Jest on idealnym, ponieważ jest czysty, niepalny i nietoksyczny. Freon 12 (CCl_2F_2 , punkt topnienia -155°C , punkt wrzenia -30°C) jest również często używany. Inne ciekłe gazy używane do zamrażania to izopropan (-189°C , -42°C) i hel (-269°C , -89°C). Zastosowanie ciekłego helu umożliwia najdoskonalsze zachowanie struktury komórki, ale zastosowanie jest ograniczone ze względu na wysoką cenę i trudności w otrzymaniu. Mrożenie w ciekłym helu stosuje się do mikroskopii elektronowej.

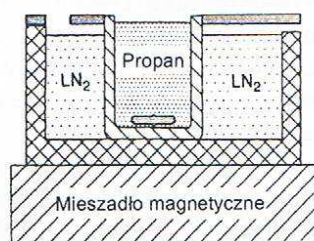
Ultraszybkie zamrażanie

Ultraszybkie zamrażanie pozwala na badanie tkanek, które zostały zamrożone bezpośrednio po pobraniu bez wcześniejszego traktowania chemicznego. Istnieją cztery główne metody umożliwiające zachowanie ultrastruktury komórki poprzez niezwykle gwałtowne zamrażanie

bez zastosowania krioprotekcji. We wszystkich tych wypadkach dobrze zachowana ultrastruktura ogranicza się od 10 do 20 μm na powierzchni tkanki. W głębszych warstwach obserwowane są zmiany i zniszczenia struktury, podobne do tych, jakie występują w tkankach zamrażanych przez zanurzenie w ciekłych gazach, bez stosowania krioprotekcji.

a) Zamrażanie przez zatapianie (*Plunge freezing*)

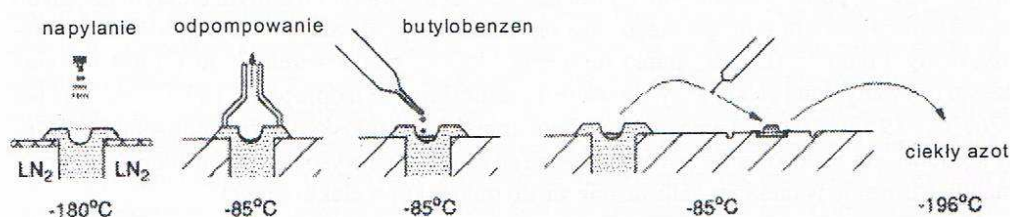
Podstawą efektywności tego typu zamrażania jest zachowanie odpowiedniej proporcji zamrażanej powierzchni do objętości ciekłego gazu, w którym zachodzi ten proces. Mieszany kriogen znajduje się w głębokim pojemniku i zamrażana tkanka umieszczona na delikatnym i cienkim uchwycie jest całkowicie ochładzana. Do tej metody najczęściej stosuje się ciekły propan lub etan.



Rys. 1

b) Zamrażanie przez rozpylanie (*Spray freezing*)

Jest to wersja zamrażania przez zanurzenie, ale aby ciepło było gwałtownie utracone przez materiał, zamrażane fragmenty tkanek są zredukowane do mikroskopijnych rozmiarów. Ta metoda jest odpowiednia do zamrażania zawiesin komórkowych, organelli i membran. Próbkę są naniesione cienką warstwą na ciekły propan (-180°C), a następnie odciepłone do -85°C . Powstały pył zamrożonych kropeł mieszany jest następnie z benzenem butylu (-88°C) i przeniesiony na oziębioną uprzednio podstawkę (złoto – miedź). Zanurzenie podstawki z próbką w ciekłym azocie powoduje zestalenie benzenu i próbka jest przymocowana do podstawki, co umożliwia dalsze jej przechowywanie lub krojenie.



Rys. 2

c) Zamrażanie w strumieniu gazu (*Jet freezing*)

W tym przypadku próbka pozostaje nieruchoma, a ciekły gaz (np. propan) jest wyrzucany z dyszy na próbkę. Chłodzenie może się odbywać z jednej strony próbki umieszczonej (jak kanapka) w holderze wykonanym z miedzi lub z obu stron.

d) Zamrażanie przez uderzanie (*Slam freezing*)

Technika ta jest bardzo prosta; materiał biologiczny umieszczony w odpowiednim uchwycie uderza w wypolerowaną płytkę miedzianą (lub srebrną), ochłodzoną w ciekłym helu (-269°C). Takie postępowanie nie niszczy tkanki i pozwala niekiedy na witrifikację zawartej w niej wody. Sukcesem kończy się zwykle zamrażanie w automatycznych urządzeniach, natomiast nieskomplikowane ręczne zamrażanie pozwala przeważnie na doskonałe zamrożenie zewnętrznych warstw. Głębsze regiony tkanki są natomiast poważnie uszkodzone.

Zamrażanie pod wysokim ciśnieniem

Przy zamrażaniu pod wysokim ciśnieniem zostaje zmniejszone niezbędne tempo ochładzania tkanki (aby nie tworzyły się nadmierne ilości centrów krystalizacji) z $-10\,000^{\circ}\text{C}/\text{sek}$ do około -100 do $-500^{\circ}\text{C}/\text{sek}$. Ten efekt może być osiągnięty, ponieważ wysokie ciśnienie zmniejsza temperaturę krzepnięcia i redukuje liczbę centrów krystalizacji i ich wzrost do poziomu porównywalnego z zastosowaniem 20% glicerolu jako krioprotektora. Główną zaletą tej metody jest dobre zachowanie struktury tkanki do głębokości około 1 mm w sferycznych próbkach.

Krojenie skrawków

Krojenie skrawków odbywa się oczywiście w obniżonej temperaturze. Do tego celu służą mikrotomy mrożeniowy i kriostat.

Mikrotom mrożeniowy jest niezbyt doskonałym urządzeniem i grubość skrawków uzyskanych na nim wynosi około $10\text{--}15\text{ }\mu\text{m}$. Stolik mikrotomu jest chłodzony przez rozprężające się gazy, doprowadzane systemem specjalnych kanalików. Podczas krojenia następuje jednak rozmrożenie skrawków, które przenosi się na szkiełka podstawowe i używa do dalszych oznaczeń.

Znacznie doskonalszym urządzeniem jest **kriostat**, w którym można uzyskać skrawki grubości $4\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$. Kriostat składa się z komory chłodniczej oziębianej za pomocą agregatu chłodniczego oraz umieszczonego w niej mikrotomu. Temperatura w komorze może być regulowana w zakresie od 0 do -40°C . Koło napędowe mikrotomu jest wyprowadzone na zewnątrz.

W nowych typach kriostatów nóż i stolik są dodatkowo chłodzone, z możliwością regulacji temperatury. Optymalna temperatura krojenia zależy od rodzaju materiału. Dla większości tkanek wynosi od -15 do -25°C . Tkanki bardziej uwodnione kroimy w wyższej temperaturze, a tkanki przepojone tłuszczem – w niższej.

Zamrożoną tkankę przymocowuje się na holderze (za pomocą Tissue Tek), umieszczonym w głowicy mikrotomu. Krojone skrawki mają tendencję do zwijania się, zapobiega temu specjalna teflonowa płytka przylegająca do noża. Skrawki zbiera się z noża przez przyłożenie szkiełka podstawowego. Skrawek natychmiast przylega, ulega rozmrożeniu i bardzo szybko wysycha w temperaturze pokojowej. Skrawki mogą być przechowywane szczelnie zamknięte w lodówce lub mogą służyć do dalszej procedury (barwienie).

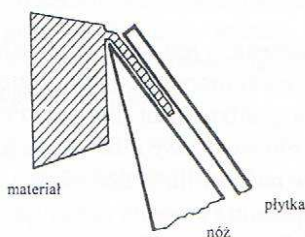
25.1. Wykonanie ćwiczenia

25.1.1. Zamrażanie tkanki

1. Plastikową zlewkę (100 ml) napełnić izopentaniem i umieścić w pojemniku styropianowym wypełnionym ciekłym azotem.
2. Odczekać, aż izopentan osiągnie temperaturę około -130°C (gęstnieje).
3. Na małym skrawku papieru umieścić kroplę Tissue Tek, a na niej położyć fragment tkanki (np. wątroba myszy) przeznaczonej do zamrażania.
4. Wrzucić bloczek do izopentanu i pozostawić około 30 sekund.
5. Przenieść zamrożone tkanki do plastikowych probówek ochłodzonych na suchym lodzie. Po zamknięciu probówki można przechowywać w temperaturze -70°C przez kilka lat.

25.1.2. Cięcie skrawków na kriostacie

1. Umyć szkiełka podstawowe w acetonie, wysuszyć i przechowywać w temperaturze pokojowej. Przedmioty używane przy krojeniu należy włożyć wcześniej do komory kriostatu. Ochłodzić komorę i głowicę.
2. Na ochłodzonym holderze umieścić kroplę Tissue Tek i umocować zmrożony wcześniej bloczek tkanki.
3. Optymalna temperatura krojenia wynosi od -15 do -25°C . Dla wątroby: -10°C . Jeżeli skrawki się rozsmażają na nożu, należy obniżyć temperaturę, jeżeli pękają, temperaturę podwyższyć.
4. Rozpoczynając krojenie, ścinamy kilkanaście grubych skrawków, aby wyrównać powierzchnię, następnie ustalamy żądaną grubość skrawków ($6\text{ }\mu\text{m}$) i ustawiamy teflonową płytkę równoległą do powierzchni noża tak, aby skrawki się nie zwiły.



Rys. 3

5. Nóż i płytkę muszą być czyste, więc co jakiś czas należy przetrzeć je acetonem. Nóż należy zawsze czyścić w kierunku ostrza.
6. Ukrojony pojedynczy skrawek należy nakleić na szkiełko podstawowe. Szkiełko trzymamy między palcem wskazującym a kciukiem i zbliżamy je równoległe do powierzchni noża.
7. Skrawki naklejone na szkiełko suszymy na powietrzu przez 30 minut, a następnie niektóre podbarwiamy barwnikiem Paragon, aby ocenić jakość wykonanych skrawków.
8. Otrzymane skrawki można przechowywać w temperaturze -70°C przez wiele miesięcy. Skrawki kriostatowe można używać do barwienia histochemicznego lub immunohistochemicznego.