

Liofilizacja gamet i komórek somatycznych ssaków – ograniczenia i perspektywy

Beata Nosal, Wiesława Młodawska

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Katedra Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt

Biobanki rezerw genetycznych stwarzają ogromne możliwości wykorzystania zgromadzonych materiałów biologicznych (gamet, zarodków, linii komórkowych, tkanek) ssaków w różnego typu badaniach podstawowych, biomedycznych czy filogenetycznych, a w powiązaniu z technikami rozrodu wspomaganego (ang. *Assisted Reproductive Techniques*; ART), takimi jak np. sztuczna inseminacja, zapłodnienie *in vitro* metodą standardową (ang. *In Vitro Fertilisation*, IVF), czy na drodze mikroiniekcji plemnika do cytoplazmy oocyta (ang. *Intracytoplasmic Sperm Injection*; ICSI), a także klonowanie somatyczne (ang. *Somatic Cells Nuclear Transfer*; SCNT) kreują możliwości uzyskania potomstwa i/lub klonów wybranych osobników nawet setki lat po ich śmierci [47, 48]. Gromadzenie materiałów biologicznych zwłaszcza pozyskanych od przedstawicieli ras i gatunków zwierząt zagrożonych wyginięciem w biobankach rezerw genetycznych (tzw. ochrona *in situ*) i wdrożenie wspomnianych wyżej ART w program ich ochrony, może być pomocne w utrzymaniu populacji tych zwierząt, a w przyszłości nawet przyczynić do odtworzenia już wymarłych gatunków.

Aktualnie, głównym sposobem przechowywania materiałów biologicznych jest ich kriokonserwacja w ciekłym azocie, która mimo powszechnego zastosowania może być problematyczna. Technika ta jest kosztowna, dla utrzymania próbek w stanie głębokiego zamrożenia wymaga ciągłego uzupełniania ciekłego azotu, a chwilowe nawet opóźnienie dostawy może spowodować rozmrożenie i bezpowrotną utratę cennego materiału. Problemem jest również zapewnienie specjalistycznego sprzętu, kontenerów kriogenicznych (zwłaszcza w celu transportu) oraz wysokie ryzyko kontaminacji przechowywanego materiału. Naprzeciw kriokonserwacji wychodzi liofilizacja (ang. *freeze-drying*; FD), czyli suszenie sublimacyjne. Zdolność organizmów żywych do przetrwania w stanie silnego odwodnienia (anhydrobioza) została „podpatrzona” w naturze. Strategię tą wykorzystują takie organizmy jak wrotki, niesporczaki, nicienie, bakterie czy grzyby, mogące przetrwać bez trwałych uszkodzeń stan silnego odwodnienia przez wiele lat [8, 48]. Liofilizacja to metoda stosunkowo znana, a pierwsze doniesienia o jej zastosowaniu pochodzą już z lat 50. ubiegłego wieku, kiedy podejmowano próby suszenia

żywności, tkanek, a także nasienia [46], jest to obecnie szeroko stosowana procedura konserwacji produktów między innymi w przemyśle spożywczym czy farmaceutycznym [48, 49]. Nie jest to metoda prosta, wymaga użycia specjalistycznego sprzętu (liofilizatorów), jednak koszty przechowywania są niskie, a liofilizowane komórki (np. plemniki) zamknięte zazwyczaj w szklanych ampułkach można przetrzymywać zarówno w lodówce (4°C), jak i w szerokim zakresie temperatury pokojowej (18-25/26°C; RT; ang.: *room temperature*) przez długi czas. Innymi zaletami tej procedury są niskie ryzyko kontaminacji oraz łatwy transport próbek [8, 34].

Liofilizacja gamet męskich

Procedura liofilizacji jest metodą wykorzystującą zjawisko sublimacji, proces ten składa się z trzech etapów: zamrażanie, suszenie pierwotne (ang. *primary drying*) i suszenie wtórne (ang. *secondary drying*) [49]. W pierwszym z nich materiał biologiczny zamrażany jest w warunkach normalnych, co prowadzi do oddzielenia (zamrożenia) większości wody zawartej w produkcie, uformowania kryształków lodu i zagęszczenia substancji w niej rozpuszczonych. W dalszej kolejności, pod obniżonym ciśnieniem przeprowadzany jest etap sublimacji, w którym następuje bezpośrednie przejście kryształków lodu w parę wodną, tym samym usunięcie wody z produktu. Jest to najdłuższy i najbardziej krytyczny etap całej procedury, mający szczególnie istotny wpływ na jakość liofilizowanego materiału. W odniesieniu do nasienia proces ten prowadzony jest przez okres od przynajmniej 3 do 18 godzin [6, 16, 21, 22, 24, 42, 50, 52], pod obniżonym ciśnieniem najczęściej w zakresie do 0,04 do 1,03 mbar [6, 22, 23, 24, 35, 36, 37]. Ostatni etap to desorpcja, czyli dosuszanie, polegający na zredukowaniu wilgotności (usunięcie wody niezamrożonej) pozostałej w próbce, do poziomu optymalnego. Dosuszanie odbywa się w warunkach wysokiej próżni, w stopniowo podwyższonej temperaturze (powyżej zera) i trwa zwykle od 3 do 6 godzin [49], etap ten nie zawsze stosowany jest w trakcie liofilizacji plemników.

Liofilizacji poddawane są plemniki uzyskiwane z ogona najądrzy, jak i ejakulowane, a sama procedura podlega różnym modyfikacjom doboru odpowiednich dla plemników parametrów (ciśnienie, temperatura, czas). W pierwszym etapie, plemniki najczęściej zamrażane są przez krótkotrwale (do kilku minut) zanurzenie w ciekłym azocie, następnie poddawane procesowi jednostopniowego (z pominięciem desorpcji) [6, 16, 23, 24, 42, 50, 51, 52] lub dwustopniowego suszenia [21, 22, 35, 36, 37, 38, 39]. Liofilizowany produkt doprowadzany jest do stanu, w którym wszystkie reakcje biochemiczne zachodzące w komórce zostają zatrzymane, a po uwodnieniu (rehydratacji) mogą zostać w łatwy sposób przywrócone [8, 48].

Suszenie sublimacyjne gamet męskich zyskało na znaczeniu pod koniec ubiegłego stulecia, kiedy Wakayama i Yanagimachi stosując metodę ICSI, jako pierwsi otrzymali żywe potomstwo z liofilizowanych plemników myszy przechowywanych 3 miesiące w temperaturach dodatnich (4 i 25°C) [52]. To wydarzenie dało nadzieję, że liofilizacja może być z sukcesem wykorzystywana do konserwacji nasienia ssaków.

Mimo niewątpliwych zalet metoda liofilizacji ma również pewne ograniczenia związane z wysokimi kosztami inwestycji w odpowiedni sprzęt (liofilizatory), czy też długim procesem przetwarzania materiału. Jednak najważniejszym z nich są nieodwracalne uszkodzenia komórek (błon cytoplazmatycznych, struktury DNA, morfologii) zachodzące podczas procedury suszenia, przechowywania, a nawet rehydratacji, w wyniku których liofilizowane plemniki zamierają. Utrata ruchliwości wyklucza możliwość wykorzystania takiego nasienia do inseminacji, jak i IVF, a jedyną opcją uzyskania potomstwa pozostaje wspomniana już technika ICSI. Jest to procedura zapłodnienia polegająca na wprowadzeniu pojedynczego plemnika (lub jego główki) bezpośrednio do cytoplazmy oocytu przy użyciu mikromanipulatora, zdolność gamet męskich do ruchu nie jest więc wymagana, a wręcz nie jest pożądana. Co istotne, poddane liofilizacji plemniki zachowują integralność chromatyny jądrowej (martwa komórka, nie oznacza martwe DNA) i z powodzeniem mogą być wykorzystane w procedurze ICSI, o czym świadczy potomstwo uzyskane u myszy [17, 18, 52], królika [26], szczura [16, 20], chomika [31] i konia [3].

Płyny i substancje ochronne, integralność DNA plemnika

Płyn (pożywka) stosowany do liofilizacji powinien być zbilansowanym roztworem soli, o odpowiednim ciśnieniu osmotycznym, które zapewni stabilność oraz łatwe ponowne uwodnienie próbki. Wskazane jest lekko zasadowe pH, pomagające zachować integralność DNA jądrowego plemnika oraz zdolność rozwojową gamet [8]. Buforem, najczęściej stosowanym do liofilizacji plemników różnych gatunków ssaków jest 10 mM Tris-HCl z dodatkiem NaCl [17, 23, 28, 32, 35, 36, 38, 39]. Ważnym czynnikiem jest również dodatek odpowiednich substancji ochronnych (tzw. lioprotektantów) zabezpieczających komórkę przed uszkodzeniami i stresem związanym z procedurą odwadniania, jak i rehydratacji [8].

Jedną z przypuszczalnych przyczyn fragmentacji DNA jądrowego plemników jest obecność endonukleaz, enzymów uwalnianych z uszkodzonych w trakcie procesu liofilizacji błon plazmatycznych gamet i aktywowanych przez dwuwartościowe jony wapnia czy magnezu [7, 23]. Badania wykonane na plemnikach myszy pokazały, że uszkodzeniu ich materiału genetycznego może zapobiec dodanie do buforu liofilizacyjnego różnych koncentracji czynników chelatujących, takich jak EGTA (ang. ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) [23], czy EDTA (ang. ethylenediamine-tetraacetic acid) [17], a obecność tego ostatniego w buforze zwiększa zdolność rozwojową zarodków uzyskanych z tak liofilizowanych gamet [17]. W plemnikach psa i ogiera istotnie mniejszy poziom uszkodzeń DNA stwierdzono w grupach liofilizowanych z udziałem EGTA niż EDTA [36, 38]. Z kolei w odniesieniu do plemników knura, oba związki dodane do buforu wykazały podobną skuteczność w hamowaniu aktywności endonukleaz, równocześnie po ICSI większy odsetek blastocyst uzyskano z gamet liofilizowanych w obecności EGTA i EDTA niż w grupie kontrolnej, liofilizowanej bez udziału czynników chelatujących [32].

Szeroko badanym lioprotektantem jest trehaloza – dwucukier, w naturalny sposób występujący w organizmach anhydrobiotycznych. Związek ten chroni komórki w ekstremalnych warunkach środowiska (pomaga przetrwać cykle wysuszenia-odwodnienia) oraz stabilizuje błony komórkowe i białka [28, 34]. Mechanizm, w jaki trehaloza zwiększa tolerancję komórek na wysychanie, nie jest dokładnie poznany. Badania dowodzą, iż obecność trehalozy w medium zmniejsza stopień fragmentacji DNA plemników knura [28] i psa [34], jednak jej zbyt wysokie stężenie w pożywce może przynieść efekt odwrotny do oczekiwanego [28]. Eksperymenty przeprowadzone na plemnikach knura pokazały również, że zarówno dodatek do buforu zawierającego EDTA samej laktozy, jak i laktozy w kombinacji z trehalozą lub sacharozą zapewnia bardzo wysoką integralność materiału genetycznego (94-98,5%) plemnika [7]. DNA gamet męskich może również ulec fragmentacji na skutek nadmiaru reaktywnych form tlenu uwalnianych w komórce podczas procedury liofilizacji i rehydratacji. Poszukuje się zatem przeciwtleniaczy redukujących negatywne skutki stresu oksydacyjnego. Badania zespołu hiszpańskiego pokazały, że kwas rozmarynowy dodany do buforów zawierających związki chelatujące (EGTA lub EDTA) pozytywnie oddziałuje na integralność DNA plemników psa [34], tryka [35] i knura [37], jednak wykorzystanie tak liofilizowanych plemników tryka i knura w procedurze ICSI nie zwiększyło zdolności uzyskanych zarodków do wczesnej embriogenezy, w porównaniu do prób kontrolnych (tj. zarodków otrzymanych z plemników niepoddanych liofilizacji i/lub liofilizowanych bez kwasu rozmarynowego) [35, 37]. Uważa się, że wodny ekstrakt rozmarynu lekarskiego (*Rosmarinus officinalis*) zawiera liczne „zmiatacze wolnych rodników”, konieczne są jednak dalsze badania w celu jednoznacznego ustalenia przydatności rozmarynu/kwasu rozmarynowego w procedurze konserwacji gamet męskich [34].

Temperatura i czas przechowywania

Liofilizowane próbki mogą być przechowywane w szerokim zakresie temperatur, od ujemnych (np. -80, -70, -20°C), w niskich dodatnich (4°C), do wspomnianej już pokojowej. Wakayama i Yanagimachi [52] wykazali, że przechowywanie liofilizowanego nasienia myszy w temperaturze 4 lub 25°C do trzech miesięcy, nie wpływa ujemnie na zdolność plemników do zapłodnienia. Jednak podobnie jak w poprzednich kwestiach różne badania dostarczają różnych informacji. I tak np. Kawase z zespołem [21], uzyskali znacznie wyższy odsetek mysich blastocyst z liofilizowanych plemników przechowywanych w temperaturze -80°C przez 3 i 6 miesięcy, niż gdy nasienie przetrzymywane było w tym samym czasie w 4°C. Kaneko i Nakagata [18] czas przetrzymywania plemników myszy w 24°C skrócili do jednego miesiąca, wyjaśniając, iż dłuższy czas konserwacji w RT negatywnie wpływa na integralność chromosomów uwidocznionych w oocytach aktywowanych liofilizowanymi plemnikami, prawidłowości tej nie stwierdzili dla próbek utrzymywanych w temperaturach niższych (-20 i 4°C), nawet po 17 miesiącach konserwacji. W liofilizowanych plemnikach

psa, najwyższy stopień fragmentacji DNA odnotowano po roku ich przechowywania, jednak nieoczekiwanie niższy dla próbek konserwowanych w RT (22°C), w porównaniu do gamet przetrzymywanych w 4°C [34]. U myszy i szczura, metodą ICSI uzyskano zdrowe potomstwo z liofilizowanych plemników przechowywanych odpowiednio do 3 i do 5 lat, w temperaturze 4°C [19, 20]. Ponadto, nie stwierdzono istotnych różnic w rozwoju potomstwa uzyskanego z liofilizowanych gamet w porównaniu do myszy otrzymanych z plemników niepoddanych liofilizacji lub liofilizowanych i przechowywanych tylko przez krótki czas [19]. Badania te potwierdzają przydatność liofilizacji jako metody konserwacji męskich komórek rozrodczych.

Kamienie milowe

Nie ulega wątpliwości, że największym przełomem w liofilizacji nasienia było wspomniane już wcześniej osiągnięcie Wakayamy i Yanagimachi z 1998 [52], jednak próby konserwacji nasienia w suchej formie rozpoczęto już kilka dekad wcześniej. W 1949 roku Polge [46] wraz z zespołem przeprowadzili pierwszą udaną próbę liofilizacji plemników ptaków, uzyskując 50% gamet ruchliwych w próbkach poddanych rehydratacji bezpośrednio po procesie odwadniania. W roku 1957 Yushchenko [za 14] doniósł o skutecznie przeprowadzonej procedurze odwadniania plemników królika, buhaja i tryka, a także o próbie biologicznej i pierwszych żywych królikach (n=12) uzyskanych z liofilizowanego nasienia. W kilka lat później Meryman [29] poinformował o trzymiesięcznej ciąży, uzyskanej po inseminacji krowy liofilizowanym nasieniem zawierającym od 6 do 8% wody w komórkach, jednak podobnie jak w odniesieniu do królików, osiągnięcia tego nie udało się powtórzyć. W kolejnych latach (szczególnie w okresie ostatnich piętnastu lat) prowadzone były intensywne badania nad optymalizacją procedury liofilizacji gamet męskich. Podejmowane były również próby wykorzystania innych technik suszenia gamet, między innymi takie jak suszenie przez odparowanie (ang. *Evaporative drying*; ED), suszenie na gorąco (ang. *Heat drying*; HD), suszenie „na powietrzu” (ang. *Air drying*; AD), suszenie próżniowe (ang. *Vacuum-drying*; VD), czy suszenie konwekcyjne (ang. *Convective drying*; CD) [48]. Przy zastosowaniu niektórych z nich (ED, CD, HD), metodą ICSI również uzyskano żywe, zdrowe potomstwo, głównie u myszy i szczura [za 48]. U innych gatunków, jak np. świnia [24, 28, 32, 37], owca [35], bydło, kot domowy czy małpa rzesus (*Rhesus macaque*), nie otrzymano jeszcze potomstwa, wykazano jednak, że liofilizowane plemniki były zdolne aktywować oocyty, a uzyskane zarodki rozwinęły się do stadium blastocysty [48].

W 2017 roku Wakayama z zespołem [51] przeprowadzili niekonwencjonalne badania. Plemniki myszy poddano standardowej procedurze liofilizacji, a następnie „wysłano” na Międzynarodową Stację Kosmiczną, gdzie przetrzymywane były około 9 miesięcy w temperaturze -95°C. Po sprowadzeniu próbek nasienia na Ziemię zbadano między innymi wpływ promieniowania kosmicznego na stopień uszkodzeń DNA w gametach oraz przeprowadzono procedurę ICSI, w wyniku której uzyskano żywe,

zdrowe potomstwo (n=73). Na poziomie mikroskopii świetlnej próbki „kosmiczne” nie różniły się morfologicznie od próbek przetrzymywanych na Ziemi. Doświadczenie to przenosi badania związane z konserwacją plemników na zupełnie inny poziom. Pomimo że metody liofilizacji gamet męskich są w dalszym ciągu niedoskonałe, autorzy podkreślają, iż ich efektywność zostanie dopracowana wraz z nadejściem „kosmicznej ery” [51].

Na uwagę zasługują również badania zespołu japońskiego, Kaneko i współpracowników [15], którzy jako pierwsi przeprowadzili liofilizację nasienia zwierząt dzikich, takich jak szympanś (*Pan troglodytes*), żyrafa (*Giraffa camelopardalis*), jaguar (*Panthera onca*), łasica japońska (*Mustela itatsi*) i długoogoniasty szczur olbrzymi (*Diplothrix legata*). Warto podkreślić, iż już w momencie pozyskania wszystkie plemniki były nieruchliwe. Wynikiem tych badań było uzyskanie 10 ampułek liofilizowanego nasienia każdego z osobników, które przechowywano w temperaturze 4°C. Po okresie 1 miesiąca, plemniki uwodniono (większość zachowała normalną morfologię) i w procedurze ICSI, wprowadzono do oocytów mysich. W większości (86-100%) poddanych iniekcji oocytów stwierdzono obecność przedjądrzy, co dowodzi zdolności liofilizowanych plemników do aktywacji oocytów i stwarza perspektywę uzyskania potomstwa z tak konserwowanych gamet męskich, również w odniesieniu do zagrożonych wyginięciem gatunków ssaków.

Komórki somatyczne i oocyty

W porównaniu z gametami męskimi jądrzaste komórki somatyczne mają większe rozmiary, zawierają znacznie więcej cytoplazmy, a wysoka zawartość wody i organizacja chromatyny jądrowej czyni je bardzo wrażliwymi na wysuszenie oraz związany z nim stres osmotyczny, co znacznie utrudnia przeprowadzenie procesu liofilizacji. Problemem jest również zastosowanie lioprotektantów, a dokładniej skuteczne dostarczenie ich do komórki. Pierwsze próby suszenia komórek somatycznych prowadzone były w latach 50-60 ubiegłego stulecia na komórkach bezjądrzastych krwi, tj. erytrocytach człowieka. W 1992 roku Goodrich i in. [9] donieśli, że poddane liofilizacji erytrocyty przechowywane 10 dni w temperaturze 22°C zachowują właściwości metaboliczne. Trzy lata później, u człowieka przeprowadzono pierwsze kliniczne próby wykorzystania liofilizowanych erytrocytów, przetrzymywanych w temperaturze 4°C przed rehydratacją [53]. W tym samym roku Read i in. [45] poddali liofilizacji płytki krwi człowieka i psa, następnie wykonali próbę infuzji u psa. Należy jednak podkreślić, iż przed liofilizacją płytki krwi traktowane były paraformaldehydem [45], co budzi poważne wątpliwości praktycznego zastosowania tak spreparowanych komórek zarówno u zwierząt, jak i ludzi. Z kolei Wolkers i in. [54], przeprowadzili udaną próbę liofilizacji płytek krwi człowieka z zastosowaniem trehalozy jako lioprotektanta. Ocena żywotności komórek wykonana po uwodnieniu pokazała, że zachowały one integralność strukturalną. Pietramaggiore wraz z zespołem [44] wykazali, że poddane liofilizacji bogate w płytki krwi osocze, może znaleźć zastosowanie kliniczne w miejscowym gojeniu ran, badania wykonano na modelu mysim.

Pierwszą udaną próbę suszenia ludzkich komórek jądrzastych przeprowadzono w 2000 roku [12]. Do eksperymentu wykorzystano pierwotne fibroblasty wywodzące się ze skóry napletka (linia 12F), w których ekspresję trehalozy wywołano poprzez infekcję wektorem adenowirusowym, a zastosowaną metodą odwodnienia komórek było „suszenie na powietrzu” (ang. *air-drying*). Wyniki potwierdziły, że ekspresja trehalozy w komórkach eukariotycznych pomaga im przetrwać procedurę wysuszenia, przechowywania, jak i rehydratacji. Komórki przechowywano w RT, a niektóre zachowały żywotność nawet do 5 dni [12]. W kolejnych latach podjęto próby wysuszenia różnymi metodami komórek somatycznych człowieka, takich jak np. mezenchymalne komórki macierzyste uzyskane ze szpiku kostnego (*bone marrow-derived mesenchymal stem cells*) [10, 40], komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (*adipose derived stem cells*; ASCs) [30], komórki macierzyste hemopoezy z krwi pępowinowej [33], czy też mysie fibroblasty 3T3 [2, 55] i makrofagi J774 [1]. Badania te pokazały, że komórki somatyczne ssaków mogą być odwracalnie „wysuszone”, a po rehydratacji przynajmniej część z nich (~2-14%) wykazuje integralność błony plazmatycznej [2, 30], około 2-52% integralność DNA [33], a także zdolność do proliferacji [10] i tworzenia kolonii *in vitro* [33], wilgotność resztkowa pozostała w komórkach po procesie odwadniania, wynosiła zazwyczaj od 4,7 do około 15% [2, 30, 33]. Wymagane są jednak dalsze badania w celu optymalizacji procedury, zwiększenia przeżywalności komórek, integralności ich DNA jądrowego, a także oceny możliwości wykorzystania tak konserwowanych komórek somatycznych np. w różnego typu badaniach biomedycznych.

Kolejnym kierunkiem badań, są próby uzyskania potomstwa z poddanych liofilizacji jądrzastych komórek somatycznych, w aspekcie klonowania somatycznego (SCNT) wartościowych genetycznie osobników, w tym przedstawicieli zagrożonych wyginięciem gatunków ssaków. Technika ta polega na transferze jądra somatycznego komórki dawcy do wyjądrzonego oocytu-biorcy, aktywacji zrekonstruowanego oocytu i hodowli tak uzyskanego zarodka (klonu) do stadium moruli/blastocysty. Podobnie jak w odniesieniu do plemników i ICSI, komórki somatyczne wykorzystane do klonowania nie muszą być żywe, jednak istotnym warunkiem powodzenia procedury jest zachowanie integralności ich DNA jądrowego [27]. Pomimo licznych prób, do tej pory nie wyprodukowano żywych klonów z tak konserwowanych komórek somatycznych ssaków. Największym osiągnięciem są klonalne blastocysty, uzyskane po raz pierwszy w 2008 roku u owcy [27] i myszy [41], następnie u świni [4, 5]. Jako dawców jądra somatycznego wykorzystano liofilizowane komórki ziarniste owcy (*granulosa cells*) przechowywane w RT 3 lata [27], mysie komórki wzgórka jajonośnego (*cumulus cells*) i macierzyste komórki zarodkowe (*embryonic stem cells*), konserwowane przez noc lub 6 dni w temperaturze 4°C [41], fibroblasty płodowe świni utrzymywane przynajmniej 6 miesięcy w 4°C [5] oraz komórki wzgórka jajonośnego i fibroblasty świni

przechowywane 1 dzień lub 1 rok, również w 4°C [4], biorcami jądra były enukleowane oocyty odpowiednio owcy, myszy i świni. U owcy uzyskano również klonalne blastocysty z poddanych liofilizacji limfocytów [13]. Warto zaznaczyć, że z uzyskanych tą drogą mysich blastocyst wyprodukowano linie klonalnych komórek zarodkowych (ntES; ang. *nuclear transfer Embryonic stem cells*), które następnie posłużyły do wyprodukowania pierwszych żywych myszy-chimer zawierających komórki wywodzące się z liofilizowanych zarodków [41]. Klonowanie somatyczne ssaków jest obecnie nieefektywne i bardzo niski odsetek potomstwa uzyskuje się z transferowanych zarodków [27], przytoczone wyżej badania niosą jednak pewne nadzieje i kreują możliwości uzyskania żywych klonów również z poddanych liofilizacji komórek somatycznych.

Na uwagę zasługują również badania, w których metodą „*air-drying*” podjęto próbę konserwacji genomu matczynego kota domowego (*Felis catus*), a dokładniej niedojrzałych oocytów w stadium pęcherzyka zarodkowego (ang. *Germinal Vesicle*; GV). Przed wysuszeniem oocyty permeabilizowano i inkubowano w medium bez lub z dodatkiem trehalozy, a po wysuszeniu przechowywano w lodówce (4°C) do 2 i 4 tygodni. Następnie próbki uwodniono, z każdej pobrano samo jądro (GV), które następnie transferowano do enukleowanego oocytu-biorcy. Po 24 godzinach hodowli ponad dwukrotnie więcej oocytów zrekonstruowanych z GV konserwowanych w obecności trehalozy niż tych bez wznowiło mejozę (odpowiednio ok. 70 i 30%), a ponad 20% uzyskało stadium metafazy II [11], co wprawdzie świadczy o zdolności konserwowanego w suchej formie genomu matczynego do odpowiedzi na czynniki zawarte w ooplazmie biorcy, na obecnym etapie badań nie jest jednak jasne, czy i w jakim stopniu tak zrekonstruowane oocyty będą zdolne do rozwoju zarodkowego po zapłodnieniu *in vitro*. Procedurze liofilizacji w obecności trehalozy poddano również oocyty bydłące [43], a odwadnianiu z wykorzystaniem metody „*microwave drying*”, skrawki warstwy korowej jajnika kota domowego [25]. Po rehydratacji tkanki przechowywanej 1 dzień w 4°C wykazano, że około 29-47% pęcherzyków jajnikowych zachowało prawidłową budowę histomorfologiczną, a do 4% z nich było aktywnych transkrypcyjnie [25]. Wyniki te są przyczynkiem do dalszych badań i sugerują, że być może również tkanki w przyszłości będą mogły być przechowywane w formie suchej z zachowaniem ich właściwości biologicznych.

Podsumowanie

O skuteczności procedury liofilizacji i biologicznej wartości poddanych temu procesowi komórek decyduje wiele parametrów, takich jak dobór odpowiedniej pożywki, lioprotektanty, dobór odpowiednich warunków zastosowanych w trakcie samej procedury (ciśnienie, temperatura, czas suszenia), jak również właściwe przechowywanie materiału po zakończonym procesie liofilizacji. Wszystkie powyższe czynniki odgrywają istotną rolę, pomagając zachować odwodnionym komórkom integralność DNA jądrowego, błon plazmatycznych oraz innych pożądanymi właściwościami biologicznymi. Wiele

nadziei wiąże się z liofilizacją jako alternatywną do krio-konserwacji metodą przechowywania materiałów biologicznych i możliwościami wykorzystania tak konserwowanych gamet i komórek somatycznych. Na świecie pojawiają się pierwsze „suche biobanki” jak wspomniany już bank nasienia zwierząt dzikich w Japonii [15], a także liofilizowanych jądrzastych komórek krwi przedstawicieli innych zagrożonych wyginięciem gatunków ssaków, jak arui grzywiasta (*Ammotragus lervia*), osioł somalijski (*Equus africanus somaliensis*), adaks pustynny (*Addax nasomaculatus*), lampart arabski (*Panthera pardus nimr*), czy gazela arabska (*Gazella gazella gazella*) [47]. Badania te wnoszą nadzieję, iż przechowywanie materiałów biologicznych w suchej formie („liofilizowane zoo”), będzie w przyszłości najlepszą metodą konserwacji potencjału genetycznego nie tylko różnych gatunków ssaków, a także ptaków, płazów, gadów i ryb [15]. Wymagane jest jednak opracowanie dokładniejszych, powtarzalnych protokołów liofilizacji umożliwiających zachowanie właściwości biologicznych gamet, komórek somatycznych i tkanek po uwodnieniu, wykazanie przydatności tak konserwowanych materiałów w różnego typu badaniach biomedycznych, czy technikach rozrodu wspomaganego, a uzyskanie ruchliwych plemników jest prawdziwym wyzwaniem i niewątpliwie byłoby przełomowym osiągnięciem.

Źródło finansowania: Subwencja dyscypliny Weterynaria, 020013-D016/2021 Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie

Literatura: 1. Chakraborty N., Biswas D., Parker W., Moyer P., Elliott G.D., 2008 – A role for microwave processing in the dry preservation of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering* 100, 4, 782-796. 2. Chen T., Acker J.P., Eroglu A., Cheley S., Bayley H., Fowler A., Toner M., 2001 – Beneficial effect of intracellular trehalose on the membrane integrity of dried mammalian cells. *Cryobiology* 43, 2, 168-181. 3. Choi Y.H., Varner D.D., Love C.C., Hartman D.L., Hinrichs K., 2011 – Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction* 142, 4, 529-538. 4. Dang-Nguyen T.Q., Thi Men N., Thi Nguyen H., Noguchi J., Kaneko H., Kikuchi K., 2020 – Doubling of the cytoplasm volume improves the developmental competence of porcine oocytes injected with freeze-dried somatic cells. *Cryobiology* 97, 131-137. 5. Das Z.C., Gupta M.K., Uhm S.J., Lee H.T., 2010 – Lyophilized somatic cells direct embryonic development after whole cell intracytoplasmic injection into pig oocytes. *Cryobiology* 61, 220-224. 6. Gajda L., Cegła M., Rajska I., Gajda B., 2019 – Effect of media on the DNA integrity of freeze-dried boar spermatozoa: preliminary study. *Proceedings of the 5th Winter Workshop of The Society for Biology of Reproduction*. Zakopane, Poland, 13-15.02.2019, 110. 7. Garcia-Campos A., Gil L., Malo C., Martinez F., Kershaw-Young C., Blas I., 2014 – Effect of different disaccharides on the integrity and fertilising ability of freeze-dried boar spermatozoa: a preliminary study. *CryoLetters* 35, 4, 277-285. 8. Gil L., Olaciregui M., Luno V., Malo C., Gonzalez N., Martinez F., 2014 – Current status of freeze-drying technology to preserve domestic animals sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 49, 4, 72-81. 9. Goodrich R.P., Sowemimo-Coker S.O., Zerez C.R., Tanaka K.R., 1992 – Preservation of metabolic activity in lyophilized human erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89, 967-971. 10. Gordon S.L., Oppenheimer S.R., Mackay A.M., Brunnabend

J., Puhlev I., Levine F., 2001 – Recovery of human mesenchymal stem cells following dehydration and rehydration. *Cryobiology* 43, 2, 182-187. 11. Graves-Herring J.E., Wildt D.E., Comizzoli P., 2013 – Retention of structure and function of the cat germinal vesicle after air-drying and storage at suprazero temperature. *Biology of Reproduction* 88, 6, 139, 1-7. 12. Guo N., Puhlev I., Brown D.R., Mansbridge J., Levine F., 2000 – Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnology* 18, 2, 168-171. 13. Iuso D., Czernik M., Di Egidio F., Sampino S., Zacchini F., Bochenek M., Smoraż Z., Modliński J., Ptak G., Loi P., 2013 – Genomic stability of lyophilized sheep somatic cells before and after nuclear transfer. *PLoS One* 8, 1, e51317. 14. Jeyendran R.S., Graham E.F., Schmeihl M.K.L., 1981 – Fertility of dehydrated bull semen. *Cryobiology* 18, 292-300. 15. Kaneko T., Ito H., Sakamoto H., Onuma M., Inoue-Murayama M., 2014 – Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. *PLoS ONE* 9, 11, e113381. 16. Kaneko T., Kimura S., Nakagata N., 2007 – Offspring derived from oocytes injected with rat sperm, frozen or freeze-dried without cryoprotection. *Theriogenology* 68, 7, 1017-21. 17. Kaneko T., Nakagata N., 2006 – Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. *Cryobiology* 53, 279-282. 18. Kaneko T., Nakagata N., 2005 – Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dries mouse spermatozoa. *Comparative Medicine* 55, 2, 140-144. 19. Kaneko T., Serikawa T., 2012 – Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Cryobiology* 64, 211-2014. 20. Kaneko T., Serikawa T., 2012 – Successful long-term preservation of rat sperm by freeze-drying. *PLoS ONE* 7, 4, e35043. 21. Kawase Y., Araya H., Kamada N., Jishage K., Suzuki H., 2005 – Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction* 72, 3, 568-573. 22. Kawase Y., Hani T., Kamada N., Jishage K., Suzuki H., 2007 – Effect of pressure at primary drying of freeze-drying mouse sperm reproduction ability and preservation potential. *Reproduction* 133, 4, 841-6. 23. Kusakabe H., Szczygiel M.A., Whittingham D.G., Yanagimachi R., 2001 – Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98, 24, 13501-13506. 24. Kwon I., Park K., Niwa K., 2004 – Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biology of Reproduction* 71, 5, 1430-1436. 25. Lee P.C., Adams D.M., Amelkina O., White K.K., Amoretti L.A., Whitaker M.G., Comizzoli P., 2019 – Influence of microwave-assisted dehydration on morphological integrity and viability of cat ovarian tissues: First steps toward long-term preservation of complex biomaterials at supra-zero temperatures. *PLoS One* 14, 12, e0225440. 26. Liu J-L., Kusakabe H., Chang Ch-Ch., Suzuki H., Schmidt D.W., Julian M., Pfeffer R., Bormann Ch.L., Tian X.C., Yanagimachi R., Yang X., 2004 – Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biology of Reproduction* 70, 1776-1781. 27. Loi P., Matsukawa K., Ptak G., Clinton M., Fulka J. Jr, Nathan Y., Arav A., 2008 – Freeze-dried somatic cells direct embryonic development after nuclear transfer. *PLoS One* 3, 8, e2978. 28. Men N.T., Kikuchi K., Nakai M., Fukuda A., Tanihara F., Noguchi J., Kaneko H., Linh N.V., Nguyen B.X., Nagai T., Tajima A., 2013 – Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 80, 9, 1033-1044. 29. Meryman H.T., 1960 – Drying of living mammalian cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 85, 2, 729-734. 30. Mittal S., Devireddy R.V., 2008 – Desiccation tolerance of adult stem

cells in the presence of trehalose and glycerol. The Open Biotechnology Journal 2, 211-218. **31. Muneto T., Horiuchi T.**, 2011 – Full-term development of hamster embryos produced by injecting freeze-dried spermatozoa into oocytes. Journal of Mammalian Ova Research 28, 1, 32-39. **32. Nakai M., Kashiwazaki N., Takizawa A., Maedomari N., Ozawa M., Noguchi J., Kaneko H., Shino M., Kikuchi K.**, 2007 – Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability *in vitro* and *in vivo* after intracytoplasmic sperm head injection. Zygote 15, 15-24. **33. Natan D., Nagler A., Arav A.**, 2009 – Freeze-drying of mononuclear cells derived from umbilical cord blood followed by colony formation. PLoS ONE 4(4):e5240. **34. Olaciregui M., Gil L.**, 2017 – Freeze-dried spermatozoa: A future tool? Reproduction in Domestic Animals 52, 248-254. **35. Olaciregui M., Luno V., Domingo P., Gonzalez N., Gil L.**, 2017 – In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa. Scientific Reports 7, 1096. **36. Olaciregui M., Luno V., Gonzalez N., De Blas I., Gil L.**, 2015 – Freeze-dried dog sperm: Dynamics of DNA integrity. Cryobiology 71, 2, 286-90. **37. Olaciregui M., Luño V., González N., Domingo P., de Blas I., Gil L.**, 2017 – Chelating agents in combination with rosmarinic acid for boar sperm freeze-drying. Reproductive Biology, 17, 3, 193-198. **38. Olaciregui M., Luno V., Marti J.I., Aramayona J., Gil L.**, 2016 – Freeze-dried stallion spermatozoa: evaluation of two chelating agents and comparative analysis of three sperm DNA damage assays. Andrologia 48, 9, 900-906. **39. Oldenhof H., Zhang M., Narten K., Bigalk J., Sydykov B., Wolkers W.F., Sieme H.**, 2017 – Freezing-induced uptake of disaccharides for preservation of chromatin in freeze-dried stallion sperm during accelerated aging. Biology of Reproduction 97, 6, 892-901. **40. Oliver A.E., Jamil K., Crowe J.H., Tablin F.**, 2004 – Loading human mesenchymal stem cells with trehalose by fluid-phase endocytosis. Cell Preservation Technology 2, 1, 35-49. **41. Ono T., Mizutani E., Li C., Wakayama T.**, 2008 – Nuclear transfer preserves the nuclear genome of freeze-dried mouse cells. Journal of Reproduction and Development 54, 6, 486-91. **42. Palazzese L., Anzalone D.A., Turri F., Faieta M., Donnadio A., Pizzi F., Pittia P., Matsukawa K., Loi P.**, 2020 – Whole genome integrity and enhanced developmental potential in ram freeze-dried spermatozoa at mild sub-zero temperature. Scientific Reports 2, 10, 18873. **43. Patrizio P., Loi L., Arav A.**, 2012 – Lyophilization and rehydration of bovine

oocytes after vitrification: a new technological break-through. Fertility & Sterility, 98, 3, Supplement, S125-126. **44. Pietramaggiore G., Kaipainen A., Czechu-ga J.M., Wagner C.T., Orgill D.P.**, 2006 – Freeze-dried platelet-rich plasma shows beneficial healing properties in chronic wounds. Wound Repair and Regeneration 14, 573-580. **45. Read M.S., Reddick R.L., Bode A.P., Bellinger D.A., Nichols T.C., Taylor K., Smith S.V., McMahon D.K., Griggs T.R., Brinkhous K.M.**, 1995 – Preservation of hemostatic and structural properties of rehydrated lyophilized platelets: Potential for long-term storage of dried platelets for transfusion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 92, 397-401. **46. Polge C., Smith A.U., Parkes A.S.**, 1949 – Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. Nature 164, 666-667. **47. Saragusty J., Anzalone D.A., Palazzese L., Arav A., Patrizio P., Gosalvez J., Loi P.**, 2020 – Dry biobanking as a conservation tool in the Anthropocene. Theriogenology 15, 130-138. **48. Saragusty J., Loi P.**, 2019 – Exploring dry storage as an alternative biobanking strategy inspired by Nature. Theriogenology 126, 17-27. **49. Tang X., Pikal M.J.**, 2004 – Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. Pharmaceutical Research 21, 2, 191-200. **50. Wakayama S., Ito D., Kamada Y., Yonemura S., Ooga M., Kishigami S., Wakayama T.**, 2019 – Tolerance of the freeze-dried mouse sperm nucleus to temperatures ranging from -196°C to 150°C. Scientific Reports 9, 1, 5719. **51. Wakayama S., Kamada Y., Yamanaka K., Kohda T., Suzuki H., Shimazu T., Tada M.N., Osada I., Nagamatsu A., Kamimura S., Nagatomo H., Mizutani E., Ishino F., Yano S., Wakayama T.**, 2017 – Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 114, 23, 5988-5993. **52. Wakayama T., Yanagimachi R.**, 1998 – Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. Nature Biotechnology 16, 7, 639-641. **53. Weinstein R., Sowemimo-Coker S.O., Godrich R.P.**, 1995 – Survival of lyophilized and reconstituted human red blood cells *in vivo*. Trends in Cell Biology 6, 427-432. **54. Wolkers W.F., Walker N.J., Tablin F., Crowe J.H.**, 2001 – Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. Cryobiology 42, 2, 79-87. **55. Zhang M., Oldenhof H., Sydykov B., Bigalk J., Sieme H., Wolkers W.F.**, 2017 – Freeze-drying of mammalian cells using trehalose: preservation of DNA integrity. Scientific Reports 7, 1, 6198.

Freeze-drying of mammalian gametes and somatic cells – limitations and prospects

Summary

Current research trends focus on improving techniques for preserving biological materials from various mammalian species, including farm animals and companion animals, especially endangered species, and storing them in biobanks of genetic reserves. At present, the preservation technique used almost exclusively in biobanking is cryopreservation, which involves freezing samples in liquid nitrogen, and sperm cells are the most commonly stored biological material. However, this procedure is expensive and entails some difficulties, mainly due to the need for a continuous supply of liquid nitrogen and the risk of contamination of samples. Therefore, increasing attention is paid to the possibility of storing male gametes, as well as somatic cells, in a freeze-dried state, as in the case of food, drugs or vaccines. The ability of living organisms to survive severe dehydration even for many years has been observed in nature. This strategy is successfully used by many plants and invertebrates. While freeze-drying requires the use of specialized equipment, the costs of storing samples are low, and the freeze-dried material can be kept at temperatures above zero (e.g. 4 or 25°C) for a long time. It is also very easy to transport samples preserved in this manner. The aim of this review is to present the procedure of sperm lyophilization, to discuss the latest achievements in this field, the disadvantages, advantages and potential applications of the procedure, and expected benefits of the freeze-drying of mammalian somatic cells.

KEY WORDS: biobanks, freeze-drying, sperm cells, somatic cells, protectants, assisted reproductive techniques