proLékaře.cz | 23.11.2026

Použití chladicích gelových pouzder při zpracování kmenových buněk

Kubešová B., Vinklárková J., Komárková J., Procházková D., Matějková E.
Tkáňová banka, Fakultní nemocnice Brno

Souhrn
Správný postup pro kryokonzervaci buněk je zárukou pozdější dobré kondice buněk po jejich rozmražení. Získání vitálních buněk v maximálním počtu po rozmražení je velmi důležité zejména při transplantacích krvetvorných buněk. Na úseku hematopoetických buněk Tkáňové banky Fakultní nemocnice Brno byla vyvinuta nová metoda přípravy buněk pro kryokonzervaci za použití speciálně navržených gelových pouzder pro vaky. Předchlazením těchto pouzder je minimalizováno riziko tepelného poškození buněk při jejich míchání s kryoprotektivním roztokem obsahujícím dimetylsulfoxid. Použitým materiálem byla pupečníková krev zdravých dárkyň. V předkládaném článku uvádí autoři výsledky srovnávacího experimentu, kdy byla vzájemně porovnána tradiční metoda přípravy buněk s využitím ledové vodní lázně s inovativním postupem chlazení pomocí gelových pouzder.
Klíčová slova: kryokonzervace, kmenové buňky, pupečníková krev

Summary
Kubešová B., Vinklárková J., Komárková J., Procházková D., Matějková E.: Pre-cooled gel sleeves as a useful tool for preparation of the hematopoietic stem cells before cryoconservation

The regular course for cell cryoconservation is very important for further condition of cells after thawing. The obtaining of vital cells and in maximum rate is notable especially for hematopoietic stem cell transplantation. On Hematopoietic Cell Department of Tissue Bank in University Hospital Brno a new method of cell preparing for cryoconservation using special designed gel casing for bags was established. Pre-cooling of these casings minimizes the heat-damage of the cells during their mixture with cryoprotective solution which contains dimethylsulfoxid (DMSO). The cord blood obtained from healthy volunteers was used as a material in this experiment. In following article the authors describe the results of comparative study, in which comparing of traditional method of cell preparation using iced water bath and new approach with pre-cooled gel casing was performed.
Key words: cryoconservation, stem cells, cord blood

Transfuze Hematol. dnes, 16, 2010, No. 2, p. 78–81.

Úvod

Kryokonzervace je nejrozšířenější metodou pro dlouhodobé skladování unikátního biologického materiálu. Při správném provedení je hlavní výhodou této metody vysoká vitalita a nezměněné vlastnosti buněk po rozmražení.

Jednou z nejvýznamnějších aplikací této techniky je uchování krvetvorných buněk pro transplantaci v čase klinické léčby a přípravné fáze příjemce (1).

Nejběžněji užívaným kryoprotektivem je dimethyl sulfoxid (DMSO). Tato látka zajišťuje životaschopnost krevních buněk v zamraženém stavu. Po podání se látka z pacienta vylučuje močí a potem, což má za následek charakteristický zápach, který může být nepříjemný, ale vymizí v průběhu prvních 48 hodin. K urychlení vyloučení DMSO je nutné dobré zavodnění pacienta (2).

Úskalím při používání DMSO je značný vývoj tepla, které může buňky vážně poškodit. Toto teplo musí být snižováno a odváděno, aby nedošlo k narušení integrity zpracovávaných buněk. Teplota buněčné suspenze by se v průběhu zpracování měla pohybovat v rozmezí 4 až 8 °C.

Dlouhodobě se k tomuto účelu na většině pracovišť, včetně Tkáňové banky FN Brno, používá vodní lázeň se sterilní vodou a sterilní ledovou tříští. Vak s buněčnou suspenzí je umístěn do ledové lázně a pomalu za stálého míchání se do vaku přepustí předchlazený kryokonzervační roztok obsahující DMSO.

Tato metoda je tradiční a účinně brání nežádoucímu zvýšení teploty. Na druhou stranu má však své nevýhody:

- Při manipulaci s vaky není možné dosáhnout standardní teploty náplně vaku, protože není reálné, aby byl vak po celou dobu ponořen v ledové lázni.
- Nestandardní promíchávání jednotlivých složek produktu ve vaku může zapříčinit shlukování buněk do clusterů.
- Použití vodní lázně není vhodné pro práci v čistých prostorách, na kterou je dle nové legislativy nucena přejít většina pracovišť.

Z těchto důvodů jsme hledali jiné řešení pro přípravu buněk pro kryokonzervaci.

Materiál a metodika

Pro validace procesu kryokonzervace byla použita pupečníková krev od osmi dárkyň, která nesplnila parametry pro její další zpracování (nízká buněčnost nebo vitalita, malý objem krve). Tato krev by byla jinak zlikvidována, ale dárkyně svolily na základě informovaného souhlasu s jejím využitím pro výzkum.

proLékaře.cz | 23.11.2026

Prvním krokem při zpracování buněk byla snaha získat stabilní prostředí, ve kterém by byly buňky rovnoměrně chlazeny po celou dobu procesu. Specializovaná firma Tiskpro Praha na zakázku vyrobila průhledná pouzdra na vaky naplněná chladicím gelem (produkt má prohlášení o shodě podle zákona 356/2003 Sb.; podle uplatněných kritérií klasifikace nevykazuje nepříznivé účinky na zdraví člověka a životní prostředí). Tato pouzdra byla před použitím nachlazena při teplotě pod -20 °C a po té ponechána v lednici, aby v nich buněčná suspenze nezamrzala. Takto je zajištěna konstantní teplota buněk po celou dobu jejich zpracování.

Teplota lednic byla standardně kontinuálně monitorována monitorovacím systémem firmy Falkon s.r.o.

Dalším důležitým faktorem správné přípravy buněk je zajištění rovnoměrného míchání náplně vaku. Pro tento účel byla použita míchačka vaků MIX30 REG (firma Tool s.r.o.), která byla opět na zakázku upravena.

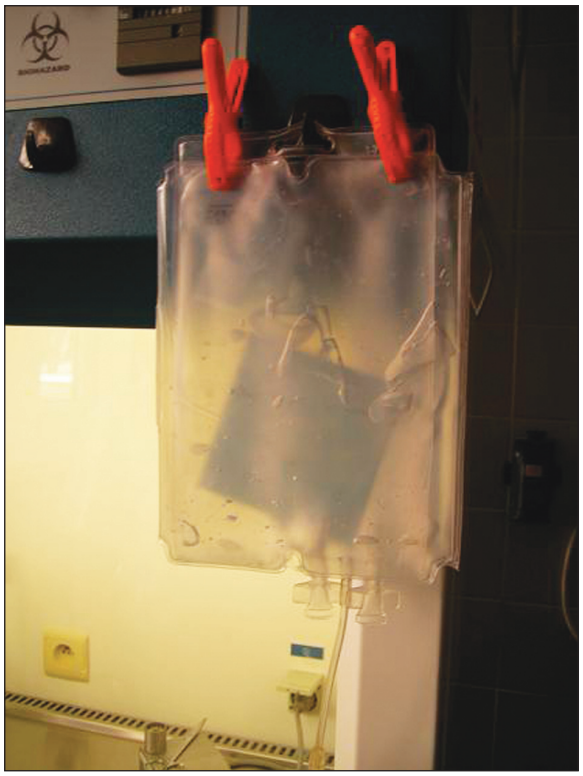
Vlastní postup validace byl rozdělen do dvou samostatných pokusů.

Tradiční zpracování buněčné suspenze pro kryokonzervaci

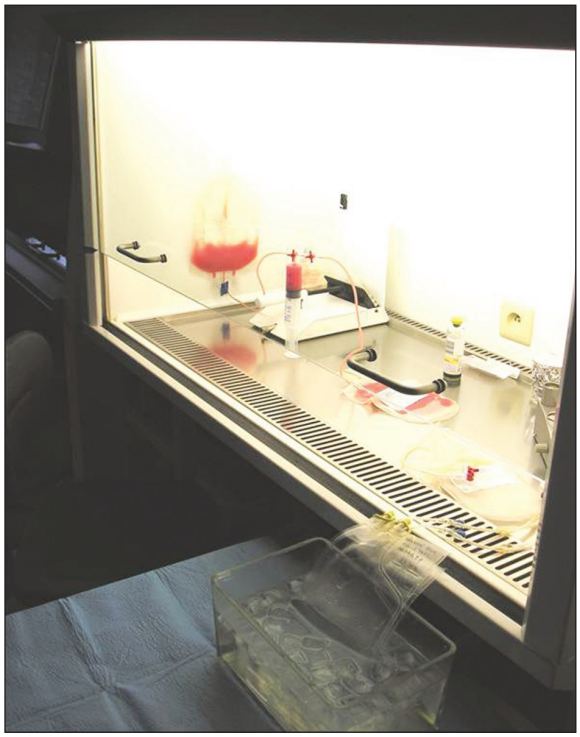
V prvním experimentu byly zpracovány tři vaky s pupečníkovou krví podle původní metodiky Tkáňové banky.

Transfer vak s pupečníkovou krví a albumin byly do doby zpracování uloženy v monitorované lednici při teplotě 4 až 8 °C, lékovky s DMSO byly uchovány při laboratorní teplotě. Dále byla připravena ledová lázeň - akvárium se sterilní vodou a kostkami sterilního ledu.

Do zamražovacího kryovaku (firma Baxter®) byl předchystán kryoprotektivní roztok. Kryoprotektivní roztok se připravuje následovně. 100% DMSO (Dimethylis sulfoxidum, č. šarže – USP 040316A, dodavatel – WAK – Chemie MedicalGMBH Germany, bal. 10x10 ml) je předředěn na 30 % albuminem (Human albumin 50 g/l, Baxter) a tento se přidá k buněčné suspenzi v poměru 1 : 2. Finální koncentrace DMSO ve vaku je tedy 10 %.



Obr. 2.



Obr. 1.



Obr. 3.

proLékaře.cz | 23.11.2026

Do vaku byla zasunuta teplotní sonda teploměru tak, aby byla ponořena v roztoku – v tomto okamžiku byla z displeje teploměru odečtena teplota (t_1) a zjištěná hodnota byla zaznamenána do pracovního protokolu. Kryovak byl následně umístěn do vodní lázně (viz obr. 1).

Pro měření teploty byl použit kalibrovaný teploměr Commeter D0141 od firmy COMET System s.r.o.; programovatelný registrační teploměr s rozsahem měření -50 až +250 °C a s přesností měření 0,1 °C.

Rovněž v chlazeném vaku s buněčnou suspenzí byla pomocí sondy teploměru změřena a zaznamenána teplota (t_2), poté byl vak také vložen do ledové lázně tak, aby celá náplň vaku byla ponořena.

Oba vaky byly takto chlazeny 15 min.

Po této době byla odečtena a zaznamenána teplota kryoprotektivního roztoku (t_3) a teplota buněčné suspenze (t_4).

Pomocí trojcestného kohoutu byly oba vaky propojeny. Kryovak s protektivním roztokem byl zavěšen na háček na čelní desce laminárního boxu. Otevřením svorky na hadičce byla náplň kryovaku za stálého promíchávání pomalu přepouštěna k buněčné suspenzi v transfer vaku. Po přepuštění celého objemu kryoprotektivního roztoku k buněčné suspenzi byla odečtena a zaznamenána teplota (t_5).

Pozice vaků pak byla vyměněna – transfer vak s buněčnou suspenzí byl zavěšen na háček, prázdný kryovak byl ponořen do ledové lázně. Po uvolnění svorky byl celý objem přepuštěn zpět do kryovaku.

Inovovaný postup přípravy buněk pro kryokonzervaci

Pro srovnání účinnosti námi navrženého systému chlazení bylo zpracováno pět vaků s pupečníkovou krví novou metodikou.

Transfer vak s buněčnou suspenzí a albumin byly do zpracování uloženy v monitorované lednici při teplotě 4 až 8 °C, lékovky s DMSO byly ponechány při laboratorní teplotě. Chladicí gelová pouzdra byla před použitím na 15 minut uložena do mrazničky (-20 °C).

Do kryovaku (Baxter®) byl připraven kryoprotektivní roztok shodný s předchozí metodikou a přes vstup byla do roztoku ve vaku vsunuta teplotní sonda teploměru. Z displeje byla odečtena teplota (T_1) a zjištěná hodnota byla zaznamenána do protokolu. Kryovak byl následně umístěn do předchlazeného gelového pouzdra a za stálého promíchávání na míchačce byl roztok 15 min chlazen.

Poté byla odečtena a zaznamenána teplota (T_2).

Transfer vak s buněčnou suspenzí byl vyjmut z lednice a pomocí sondy teploměru byla změřena a zaznamenána jeho teplota (T_3). Transfer vak byl zasunut do chladicího gelového pouzdra a položen na míchačku.

Pomocí trojcestného kohoutu byl propojen transfer vak s kryovakem a kryovak byl zavěšen na háček na čelní desce laminárního boxu (viz obr. 2).

Poté byl kryoprotektivní roztok pomalu přepouštěn k buněčné suspenzi v transfer vaku, umístěném na míchačce za stálého promíchávání (cca 5 minut) (viz obr. 3). Po celou dobu přepouštění kryoprotektivního roztoku byla pomocí sondy monitorována teplota buněčné suspenze v transfervaku.

Po přepuštění celého objemu do transfer vaku byla odečtena a zaznamenána konečná teplota (T_4).

Pozice vaků byla následně vyměněna a celý objem z transfer vaku byl přepuštěn zpět do kryovaku na míchačce.

Konečná teplota buněčné suspenze s kryoprotektivem (T_5) v kryovaku byla změřena těsně před vložením vaku do komory zamražovače (firma Sylab).

Výsledky

Pro účely tohoto experimentu bylo na základě údajů v literatuře (3) stanoveno limitní rozmezí teplot buněčné suspenze (4–8 °C), které neohrožuje vitalitu a počet zpracovávaných buněk.

V případě použití vodní lázně s ledovou tříští nebyly splněny nastavené limity parametrů procesu (viz tab. 1). Došlo ke zvýšení teploty buněčné suspenze nad horní hodnotu stanoveného rozmezí v průměru o 4,5 °C (viz graf 1).

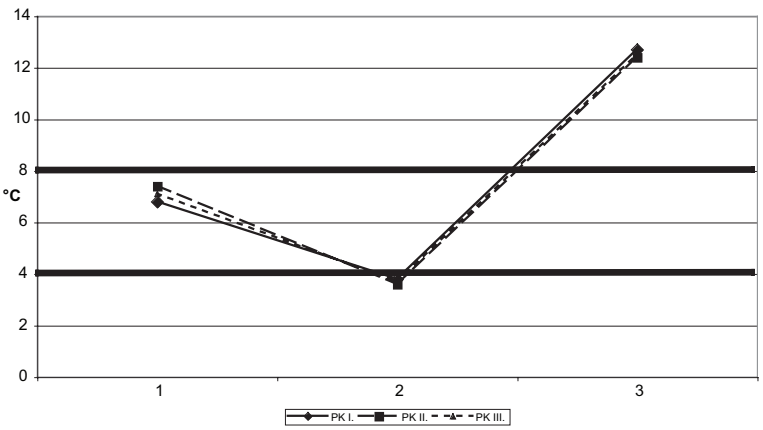
V případě použití gelových pouzder byly limity parametrů procesu splněny, teplota se udržela na 4,8 °C a v žád-

Tab. 1. Průměr naměřených teplot při použití chlazených gelových vaků.

Průměrná teplota (3 měření)	**°C**
Kryoprotektivní roztok po přípravě (T_1)	27,3
Kryoprotektivní roztok po 15 min. předchlazení (T_2)	3,6
Buněčná suspenze po vyjmutí z lednice (T_3)	7,1
Buněčná suspenze po 15 min. chlazení v ledové lázni (T_4)	3,7
Buněčná suspenze po přidání kryoprotektiva (T_5)	12,5

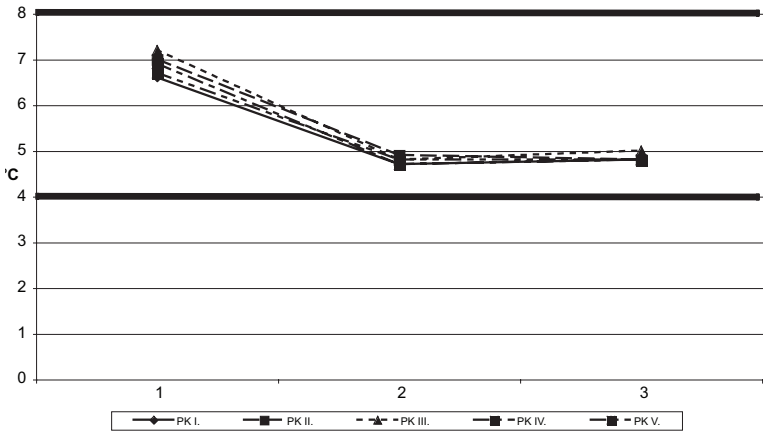
Tab. 2. Průměr naměřených teplot při použití chlazených gelových vaků.

Průměrné teploty (5 měření)	**°C**
Kryoprotektivní roztok po přípravě (T_1)	27,7
Kryoprotektivní roztok po 15 min. předchlazení (T_2)	4,6
Buněčná suspenze po vyjmutí z lednice (T_3)	6,9
Buněčná suspenze po přidání kryoprotektiva (T_4)	4,8
Buněčná suspenze s kryoprotektivem po zpracování (T_5)	4,8



Graf 1. Teplota buněčné suspenze za použití vodní lázně.

proLékaře.cz | 23.11.2026



Graf 2. Teplota buněčné suspenze za použití gelových pouzder.

ném bodě procesu tyto limity nepřekročila (viz tab. 2). Vaky s buněčnou suspenzí mohly být po celou dobu procesu zasunuty v gelových vacích bez problémů s manipulací (viz graf 2).

Diskuse

Při procesu kryokonzervace hematopoetických buněk dochází k několika kritickým momentům. Jedním z nich je přidávání kryoprotektiva DMSO. Při jeho míšení s albuminem a buněčnou suspenzí dochází k značnému vývoji tepelné energie, kterou je třeba odvádět, aby nedošlo k poškození zpracovávaných buněk. Teplota buněčné suspenze by se v průběhu zpracování (před zamražením) měla pohybovat v rozmezí 4 až 8 °C. Přidávání kryoprotektiva je třeba provádět za současného promíchávání vaku, aby se předešlo tvorbě clusterů buněk.

Použití gelových pouzder a míchačky s definovaným počtem kmitů tyto požadavky dobře a ekonomicky poměrně levně řeší.

Vak s buněčnou suspenzí, vložený do gelového pouzdra, je trvale a rovnoměrně ochlazován po celém povrchu. Gelové pouzdro je průhledné, takže je možná vizuální kontrola buněčné suspenze. Uložení gelového pouzdra na míchačku s nastavitelným počtem kmitů umožňuje standardní promíchávání buněčné suspenze s kryoprotektivem. Manipulace s vaky se tak pro laborantku stává jednodušší a zároveň bezpečnější. Proces respektuje požadavky správné výrobní praxe.

Závěr

V naší práci jsme srovnávali teplotu buněčné suspenze v průběhu přidávání kryoprotektiva DMSO za použití vodní lázně s ledovou tříští a novým postupem za použití vychlazených gelových pouzder a míchačky s definovaným počtem kmitů. Zatímco v prvním případě se teplota buněčné suspenze dostala mimo limity parametrů procesu v průměru o 4,5 °C, ve druhém případě zůstala bezpečně v rozmezí limitů.

Námi vyvinutá metoda přípravy buněk pro kryokonzervaci za použití vychlazených gelových pouzder zvyšuje kvalitu a bezpečnost zpracování hematopoetických buněk.

Literatura

1. Jeurink PV, Vissers YM, Rappard B, Savelkoul HFJ. T cell responses in fresh and cryopreserved peripheral blood mononuclear cells: Kinetics of cell viability, cellular subsets, proliferation, and cytokine production Cryobiology 2008; 57: 91-103.
2. Hernández-Navarro F, Ojeda E, Arrieta, R, et al. Hematopoietic cell transplantation using plasma and DMSO without HES, with non-programmed freezing by immersion in a methanol bath: results in 213 cases. Bone Marrow Transplantation 1998; 21: 511-517.
3. Muldrew K, Schachar J, Cheng P, Rempel C, Liang S, Wan R. The possible influence of osmotic poration on cell membrane water permeability. Cryobiology 2009; 58: 62-68.

MUDr. Barbara Kubešová
Navrátilova 8a
616 00 Brno
e-mail: bkubes@fnbrno.cz

Doručeno do redakce: 27. 8. 2009
Přijato do tisku: 6. 4. 2010