

Kriyoprezervasyon

Kök Hücre Kaynakları

- Kemik İliği
- Periferik Kök Hücre
- Kordon Kanı

Kök Hücre Nakilleri

- Otolog
- Allogeneik
- Kordon Kanı

Kriyoprezervasyon

- Kök hücre kriyoprezervasyonu; kök hücre tedavisi öncesi önemli bir basamak olmakla birlikte, özellikle allojenik transplantasyon işlemlerinde kök hücre dondurulmadan da kullanılabilir
- Farklı transplant merkezleri farklı yöntemler kullanmakta
- Vericiden alıcıya kök hücre transferinin 72-96 saat içinde gerçekleştirilebileceği durumlarda, donma ısının üstünde başlangıç depolaması yapılarak, hücrelerin nakledilmesine yönelik çeşitli protokoller mevcut

Kriyoprezervasyon

- 0 °C' nin üzerinde hücrelerin saklanması yeterli olmamaktadır. Çünkü:
 1. Isı -79 °C altına inmedikçe metabolik saatin durdurulması imkansız
 2. 0/-20 °C 'de hücre canlılığı bozulmakta
 - Na-K pompası bozulmakta ve hücreler şişmeye başlamakta
 - Membran lipidleri ve enzimlerinin aktiveleri bozulmakta
 - az çözünen materyallerin prepsite olması nedeniyle Ph değişiklikleri oluşmakta
 3. Hücrelerin hızla soğutulması ile oluşan ısı kaybı "termal şok" etkisi yaparak hücre ölümüne neden olmakta
- 1-4 °C' de 72-96 saate kadar hücreleri saklayabilmek mümkün
 - Bugün bazı otolog transplantasyonlarda bu yöntem kullanılmakta

Kriyoprezervasyon basamakları

- Günümüzde standart olarak kabul edilen kök hücre toplama metodu minimal manipölasyon ile yapılan ve en az $2.5-5 \times 10^6/\text{kg}$ hücrenin toplandığı metottur.

Kriyoprezervasyon basamakları

Kriyoprezervasyon basamakları:

1. Donör hücrelerinin toplanması
2. Kriyoprezervatif ajanların eklenmesi
3. Soğutma ve dondurma işlemi
4. Dondurulmuş kök hücrenin canlılığının değerlendirilmesi
5. Eritme işlemi
6. Transplant öncesi kök hücrenin hazırlanması
7. Kültür alınması

Kriyoprezervasyon

- Toplanan örnek santrifüjlenip hücreden zengin hale getirilir.
- Otolog transplantlarda donör plazması kullanılır.
 - Amaç heparinize plazma solusyonu ve %10'luk dimetilsülfoksid (DMSO) eklendikten sonra, hücreden zenginleştirilmiş ürünün yeniden sıvılaştırılmasıdır.
- Kİ veya PK kök hücre ürünü öncelikle +4 C°'de saklanır.
- Daha sonra, hangi kapta saklanacağına karar verilince -80 C° veya -196 °C'ye alınır.
- Myeloablatif tedavi öncesi, ürünün sağlamlığını garanti etmek amacıyla ürünün canlılığı yeniden değerlendirilir.
 - Canlılık en az olmalıdır
- Kök hücre infüzyonu öncesi örnek hızlıca 37 °C'de çözülür.

Kriyoprezervasyon

- Kriyoprezervasyon işleminin temel esasları olan dondurma ısısı, dondurma hızı, kriyoprezervatifler, dayanıklılık, eritme ısısı ve eritme hızı ile ilgili çeşitli algoritmalar bulunmakla birlikte, bu konular ile ilgili hala tartışmalar bulunmaktadır.

Kriyoprezervasyon

- Kök hücrelerin saklanmasıda kullanılan en yaygın yöntemdir
- Ancak kriyoprezervasyon hücreler üzerine son derece olumsuz etkileri de olabileceğinden kriyoprezervasyon işleminde bilinmesi gereken bazı önemli noktalar vardır.

Kriyoprotektan ajanlar

1. Kriyoprotektan ajanlar

- Hücrelerin düşük ısılarda dondurulması, metabolik yolakları korumakta
- Hücrelerin hızlıca dondurulması ve fizyolojik tuzlu su içinde çözünmesi hücreler içinde buz kristalleri oluşturarak hücre membranlarının hasar görmesine neden olabilmekte
- Buz kristalleri hücre bariyerlerini bozarak, hücrelerin ve hücre organellerinin parçalanmasına neden olabilmekte
- Yavaş dondurma ekstrasellüler buz kristali oluşumuna, osmotik dehidratasyona neden olarak hücre hasarı meydana getirebilmekte
- Bu nedenle hücrelere çeşitli kriyoprotektanların eklenmesi zorunluluğu vardır.

KÖK HÜCRE KRİYOPREZERVASYONU

Kriyoprotektif ajanlar iki tiptir.

1- İntrasellüler ajanlar

- Gliserol
- Dimetilsulfoksid (DMSO)

2- Ekstrasellüler ajan

- HES (Hidroksietil starch)

Kriyoprotektan ajanlar

- Gliserol
- Dimetilsulfoksid (DMSO)
- HES
- DMSO+HES
- HES+ albumin

Kriyoprotektan ajanlar

- DMSO;
- Tek başına kullanıldığında en ideal kriyoprotektan ajandır
- berrak, renksiz, organik sıvıdır ve suya yüksek afinite gösterir. DMSO suda yüksek derecede çözünürlük gösterebildiği ve hücre membranlarını geçebildiği için, DMSO'nun eklenmesi hem hücre içi hem de hücre dışında DMSO osmolalitesini yükselterek membran boyunca yerleşen tuz gradientini dengeye getirir. Hız kontrollü dondurma işleminde, hücre içinde bulunan neredeyse tüm serbest su hücre dışına çıkarak intrasellüler buz kristali oluşumu önlenir.

Kriyoprotektan ajanlar

- %5-10 oranında DMSO'nun etkin koruma sağlayabildiğini göstermektedir ve bugün en çok tercih edilen konsantrasyonu %10 dur. Ancak %10 oranında DMSO ile hücrelerin +4°C'de 24 saat, 37°C'de 1 saatten fazla temasta kalmaması gereklidir.
- Gerek bu özelliğinden gerekse donma-çözünme sırasında anlatılan hasardan hücreyi koruyabilmek için kullanılması gereken kryoprezervatif bir karışım olmalıdır.
- Bugün için kabul edilen en ideal karışım DMSO4 ve HES karışımıdır. Bu karışımın ayrıca hastaya infüzyon sonrası DMSO'ya bağlı yan etkileri azaltıcı etkisi de söz konusudur.

Kriyoprotektan ajanlar

- DMSO toksitesinin azaltılması için dikkat edilmesi gereken bir noktada DMSO'nun direkt olarak hücre süspansiyonu üzerine konmaması gerektiğidir.
- Bu nedenle DMSO, otolog serum, HES ve ilave edilmesi düşünülen diğer sıvılar bir yerde hazırlanıp, bu karışımdan oluşan kriyoprotektan solüsyon hücre süspansiyonun üzerine yavaşça katılır.
- Ayrıca kriyoprezervasyon esnasında oda sıcaklığında hücrelerin DMSO ile ilişkisinden doğabilecek hasarı azaltmak için, işlemde kullanılacak kriyoprotektan solüsyonun, torbanın, transfer borularının önceden soğutulması ve karışım hazırlanırken de, karışım hazırlandıktan sonra da yerleştirilecekleri alüminyum plaklarda soğutma işlemine devam edilmesi yararlı olmaktadır.

Kriyoprotektan ajanlar

- 1980'li yılların başına kadar kryoprezervasyonda kullanılan altın standart %10 DMSO, %20 otolog plazma karışımı iken bu tarihten sonra intrasellüler ve ekstrasellüler kriyoprotektanların beraber kullanımı yavaş yavaş gündeme girmeye başlamıştır.
- Peşpeşe yayınlanan bir dizi çalışma DMSO ve HES kombinasyonunun etkinliğini bildirmiştir.
- Son olarak yapılan bir çalışmada %5 DMSO ve %6 HES'in beraber kullanılması halinde hücre engrafmanının, %10 DMSO'ya göre daha iyi olduğu bildirilmiştir.
- Benzer olarak aynı kombinasyonun daha iyi hücre canlılığı ve recovery'sini sağladığını rapor etmişlerdir.
- Hatta HES varlığında DMSO oranının %3,5'a çekilebileceği bu kombinasyonda tekrarlanan dondurma ve çözmelerden sonra dahi hücrelerin proliferatif etkilerini devam ettirebildikleri gösterilmiştir.
- Sonuç olarak, bugünkü veriler dondurmada en iyi kombinasyonun %5 DMSO + %6 HES karışımı olduğunu göstermektedir.

Yardımcı kryoprotektan ajanlar

2. Yardımcı kryoprotektan ajanlar

- Dondurma işlemi sırasında dondurulacak ürünün içine makro molekülerin konması gerek donma, gerekse çözünme esnasında hücreleri korumaktadır.
- Bugün için kullanılması önerilen ideal makro molekül kaynağı otolog insan serumu kabul edilmektedir. Tavsiye edilen oranlar ise %10-20 arasındadır. Bu amaçla albümin de kullanılabilir (1 oranında).
- Hazırlanan üründe eritrosit ve eritrosit lizat varlığının ise CFU-GM üzerine olumlu etkileri rapor edilmektedir. Bu açıdan ürünün kırmızı kürelerle bulaşık olması ürün kalitesi açısından sakınca yaratmayacağı gibi bazı avantajlara da neden olabilmektedir.
- Ayrıca son yıllarda trehaloz, taurin gibi membran stabilizatörlerinin, askorbik asit, alfa tokoferol asetat ve katalaz gibi antioksidanların kryoprotektif solüsyonlara ilavesi ile daha iyi sonuçlar alınabileceği rapor edilmektedir.

Faz geçiş zamanı

- **3. Faz geçiş zamanı**
- Donma işleminin başladığı andan, tam donmanın tamamlandığı ana kadar olan zamandır (Phase transition time).
- Kritik bir periyottur.
- Su, sıvı durumundan katı duruma geçerken bir ısı yayar.
- Eğer dondurma sırasında buna dikkat edilmez ise faz geçiş zamanında bir uzama meydana gelir ki, bunun hücre canlılığı üzerine çok olumsuz etkileri vardır.
- Faz geçiş zamanı ile hücre hasarı arasında direk korelasyon gösterilmiştir [12].
- Bu nedenle ürün ısısı -20°C 'ye ulaşana kadar -15°C , -20°C/dk 'da hızlı bir soğutma işlemine tabi tutulur.
- Ancak yapılan araştırmalarda bu olumsuzluktan lenfositlerin daha az etkilendiği gösterilmiştir.
- Bugün için kabul edilen bu etkinin yüksek hacimlerde daha belirgin olduğudur.

Geçiş fazı (donma sonrası) soğutma ISISI

4. Geçiş fazı (donma sonrası) soğutma ISISI

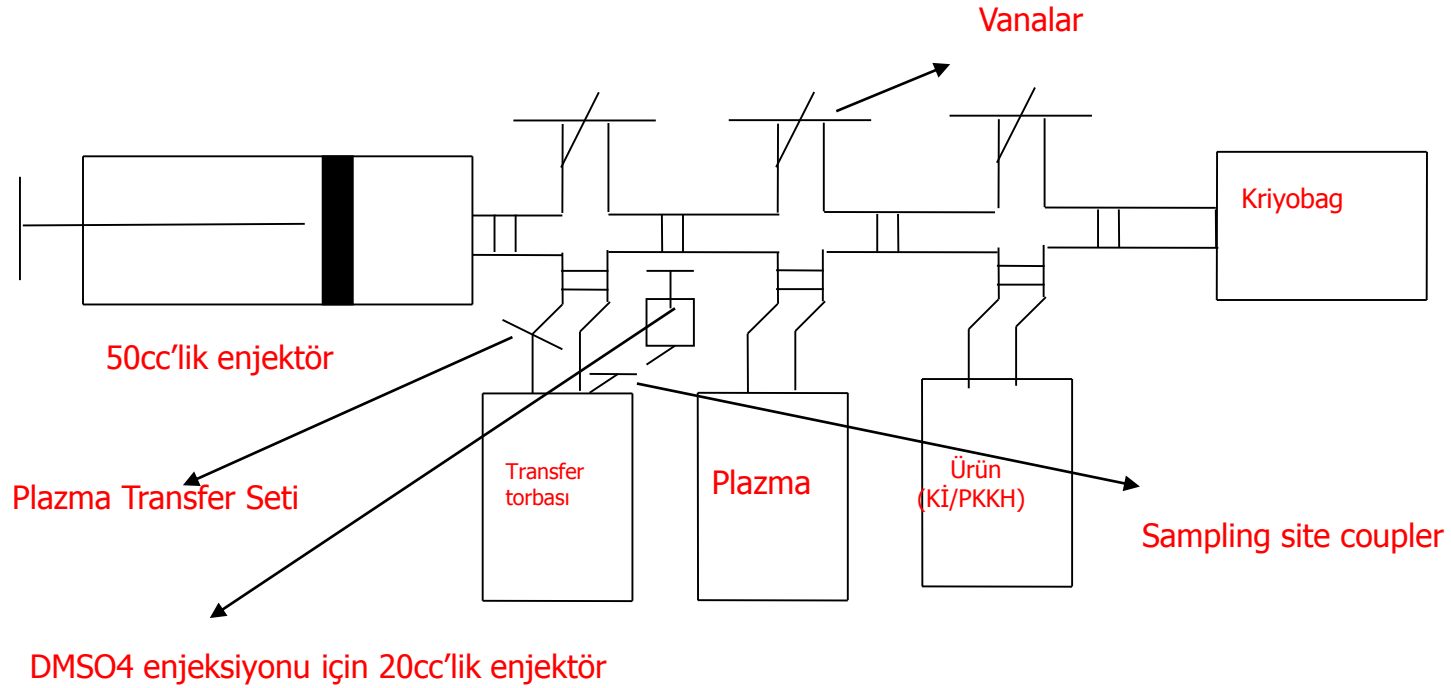
- Bu dönemde ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar) olan soğumanın dakikada 5°C 'den düşük olması önerilmektedir.
- İdeali $1-3^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ 'dır.
- $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ulaşıldıktan sonra ürün daha düşük ısılara örneğin sıvı azot gazı içine direkt olarak kaldırılabilir.

Dondurma işlemi

Dondurma işlemi için gerekli malzemeler şunlardır:

- **1. DMSO**
- **2. Hidroksietilstarch (HES) %10**
- **3. Otolog plazma/Albumin**
- **4. Saklama torbaları (Cryobag)**
- **5. Beş yollu musluk**
- **6. 50 cc'lik enjektör**
- **8. Fenol kırmızısız hücre kültür vasatı**
- **9.fistül**

Dondurma işlemi ve yöntemleri



Kİ : Kemik İliği
PKKH : Periferik kan kök hücre

Dondurma işlemi ve yöntemleri

8. Saklama ortamı (Depolama)

- Bu döneme kadar ürün kayıpsız hazırlanmış ise bundan sonra $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin altında hücresel bir hasar oluşması beklenmez.
- Yapılan çalışmalar $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin altında saklanan ürünlerde saklama zamanı ile doğrusal ilişkili olarak belirgin hücresel hasar oluşabileceğini göstermektedir.
- Kritik değer olan -79°C 'nin üzerinde saklanması halinde 5 sene kadar ürünün saklanabileceği rapor edilmektedir.
- Bugün için en ideal saklama koşulu azot gazının buhar fazında saklanması olup $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de sonsuza dek saklanabileceği düşünülmektedir.
- Bu durumda da iki önemli sorun karşımıza çıkmaktadır. Birincisi düzenli azot gereksinimin karşılanması, ikincisi ise ürünün enfekte olma olasılığıdır.
- Yapılan araştırmalarda kriyoprezerve ürünün azot tankları içerisinde saklanması halinde, buhar fazında bile başlıca Aspergillus, stafilokok, streptokok, Enterokok, psoudomonas gibi ajanlarla enfekte olabileceğini göstermektedir. Mikrobiyolojik kontaminasyon oranı %0-4.5'dur. Bundan korunabilmenin yolu dondurulmak istenen ürün torbasının geçirgen olmayan bir ikinci torba içinde bu torbanın ağzı ısıtılarak kapatıldıktan sonra saklanmasıdır. Bu açıdan $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'lik derin dondurucular daha emniyetli durmaktadır.

KÖK HÜCRE KRİYOPREZERVASYONU

- Kök hücreleri için en uygun ısı nedir?
- -80 °C ile -196 °C arasındır.
- -80 °C'nin üzerinde 5 sene kadar saklanabileceği,
- -196 °C 'de sonsuza dek saklanabileceği düşünülmektedir.

Çözme işlemi

- 9. Çözme işlemi
- Bugün için kabul edilen 2 yöntem bulunmaktadır.
- Standart olarak kabul edilen yöntem tüm buz kristalleri kayboluncaya kadar ılık su banyosu içerisinde, 37 °C'de eritmektir.
- İkinci yöntem ise jel ped uygulanan kuru ısıtmadır.
- Yapılan çalışmalarda hücre viabilitesi ve klonijenik potansiyellerin benzer olduğu, fakat infeksiyöz kontaminasyonun kuru ısıtma yönteminde daha az meydana geldiğini göstermiştir.

Çözme işlemi

- Dondurulmuş hücreler tekrar ısıtılırken 2 önemli sorun hücre harabiyetine yol açmaktadır.
- Birincisi ısınma sırasında hücre içinde kristal oluşumu yeniden başlaması ve bunun hücrede mekanik hasara yol açmasıdır.
- İkincisi ise, donma sırasında gelişen olayların tam tersinin çözülme sırasında gerçekleşerek ekstrasellüler alanın hipotonik karakter kazanmasıdır. Bu olayın nedeni ekstrasellüler ortamın intrasellüler ortamdaki çözülmesi sonucunda oluşan ani serbest sıvı salınımıdır. Bu hipotonisite de hücrenin şişerek patlamasına yol açar. Özellikle bu olay kuvvetli penetran kriyoprezervatiflerin varlığında daha belirgindir. Çözünme sırasında hücre dışı daha çabuk çözündüğünden ve hücre içi henüz tam çözünemediğinden hücre içinde yoğun olarak bulunan penetran kriyoprezervatiflerin konsantrasyonu dışarıya göre daha yüksek hale gelir ve bu işlemde dilüsyon şokuna katkıda bulunur.

Çözme işlemi

- Bu iki olaydan hücreleri koruyabilmenin en iyi yolu çözünmenin, dondurmanın aksine çok hızla yapılmasıdır.
- Bu nedenle içi %90 etil alkol ile yıkanmış su banyosuna steril su konduktan sonra 37 °C'ye kadar su ısıtılır.
- Bir miktar azot içeren kaplar ile transfer edilen ürün torbaları su banyosu içinde yumuşak masaj hareketleri ile tamamen eritilir.
- Burada dikkat edilecek nokta, ürün torbasının koruyucu kılıfı yoksa ağız kısmının su içine daldırılmamasıdır.
- Banyodan çıkan torbalar steril bezlerle silindikten sonra koruyucu kılıfından çıkarılarak 200µm'lik filtre içeren setlerle infüze edilir.
- Çözünme ile infüzyon arasındaki süre 1 saati geçmemelidir.
- Ayrıca ürünlerden canlılık, kültür analizleri ve CFU ölçümleri için örnekler alınmalıdır.
- Bazı merkezler çözme sonrası ürünü dilüe etmektedirler.
- Genellikle buna gerek olmamakla birlikte çözünme sonrası yapılacak her manuplasyonun henüz frajil olan hücrelerin kaybına yol açacağı unutulmamalıdır.
- Ancak böyle bir işleme gerek duyuluyorsa dilüsyonun yavaş yapılması gereklidir (Dilüsyon şoku).

Çözme işlemi

- Hücreleri çözünme sırasındaki dilüsyon şokundan koruyabilmenin bir yolu da hücre dışı osmolaritenin korunabilmesi için nonpenetran (HES gibi) kryoprezervatiflerin, penetran kryoprotektanlarla beraber kullanılmasıdır.
- Yine ürün çözöldükten sonra ürün dilüe edilirken bu dilüsyonun yavaş yapılması da dilüsyon şokundan korumak için gereklidir. Hücre içinde yoğun bulunan DMSO'nun dilüsyonla düşen osmotik gradiente bağı olarak hücreden dışarı çıkışı için zaman tanınmalıdır.
- Bu nedenle donma esnasında ki etkilerden korunmada çok etkin olan penetran kriyoprezervatiflerle birlikte çözünme sırasındaki etkilerden korunmak için nonpenetran kriyoprepreservatiflerin beraber kullanılması en ideal kriyoprezervatif karışımı oluşturacaktır.
- Bu karışımın getireceğı bir diğ er avantajda ürün çözöndükten sonra 37 °C gelen üründeki DMSO'nun hücrelere olan direkt toksik etkisinin, konsantrasyonunun düşük olması nedeniyle azalmasıdır.
- Rowley ve ark %10 DMSO'nun 4 °C'de 24 saatte hücrelere belirgin bir zarar veremezken, 37°C'de bir saat sonra CFU gelişimini olumsuz etkileyebildiğini ve bunun DMSO konsantrasyonu ile belirgin ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

SABRINIZ İÇİN TEŞEKKÜRLER



IMG_3182.MP4