

Periferik Kök Hücre Aferezi; Kriyoprezervasyon ve Saklama

Yasin Yıldırım

Ankara Üniversitesi Hastaneleri
Terapötik Aferez Merkezi

10. Ulusal Aferez Kongresi, 5 – 8 Kasım 2015 , İstanbul

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
- Evrensel olarak kullanılan basit bir kriyoprezervasyon yöntemi bulunmamakta
- 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

- Ürün toplanması
 - Toplanan örnek santrifüjlenip hücreden zengin hale getirilebilir
- Kriyoprezervatif ajanların eklenmesi
 - DMSO ve donör plazması kullanılır:
 - Plazma; ürünü besleyici ortam, DMSO toksitesini azaltmakta, dilüsyon etkisi
 - Plazma+DMSO çözeltisi içindeki hücre konsantrasyonu yaklaşık $100-500 \times 10^6/L$
 - Daha yüksek konsantrasyon ürünün hastaya verilmesi sırasında süresinin uzamasına, buda DMSO toksik etkisi sebebiyle viabilite kaybına neden olur
- Soğutma ve dondurma işlemi
 - Kİ veya PK kök hücre ürünü öncelikle $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanır
 - Daha sonra, hangi kapta saklanacağına karar verilince $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ veya $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye alınır.
- Eritme işlemi
- Dondurulmuş kök hücrenin canlılığının değerlendirilmesi
 - Myeloablatif tedavi öncesi, ürünün sağlamlığını garanti etmek amacıyla, Tripan mavisi (ışık mikroskopisi) / Akridin orange (Floresan mikroskopisi) veya Flow sitometri ile ürünün canlılığı yeniden değerlendirilir
 - Canlılık en az % 75 ve üzeri olmalıdır
 - örnek hızlıca $37-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de çözülür

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.

Dondurma işleminde bilinmesi gereken noktalar

- Solüsyon etkileri
- Termal şok
- Faz geçiş zamanı etkileri

Solüsyon etkileri

Hücreler yavaş yavaş soğutulmaya başladığında, ekstrasellüler alanda ilk buz çekirdeği oluşmakta ve soğuma devam ettikçe yeni su kütleleri kristalizasyona katılmaktadır.

Isı şoku

Hücreler soğutulmaya başladığında oluşan buz çekirdeği genişlerken, çevresine soğudukça ısı yaymakta ve henüz donmaya başlamamış hücrelerde termal hasara yol açmaktadır.

Solüsyon etkileri + Isı Şoku

- ❑ Donma esnasındaki görülen bu iki olumsuz etki, yavaş soğutmada belirginleşmektedir.
- ❑ Bu olumsuzluklardan kaçmak için hücreler hızla soğutulur ise ($20^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$) hücre içinde kristal formasyonu oluşmaktadır.

Çözüm

- ❑ Bu amaçla gliserol veya DMSO gibi intrasellüler etkili ajanlar kullanmak
- ❑ Penetran bir kryoprotektif ajan, donma işlemi esnasında hücre içine geçerek internal kristalizasyonun önüne geçecek

KÖK HÜCRE KRİYOPREZERVASYONU

Kriyoprotektif ajanlar iki tiptir

1- İntrasellüler ajanlar

- Gliserol
- Dimetilsulfoksid (DMSO)

2- Ekstrasellüler ajan

- HES (Hidroksietil starch)

Kriyoprotektan ajanlar- DMSO

- Tek başına kullanıldığında en ideal kriyoprotektan ajan
- Berrak, renksiz, organik sıvıdır ve suya yüksek afinite gösterir.
- Suda yüksek derecede çözünürlük gösterebildiği ve hücre membranlarını geçebildiği için, hem hücre içi hem de hücre dışında osmolariteyi yükselterek membran boyunca yerleşen tuzu dengeye getirir.
- Hız kontrollü dondurma işleminde, hücre içinde bulunan neredeyse tüm serbest su hücre dışına çıkarak intrasellüler buz kristali oluşumu önlenir.

Kriyoprotektan ajanlar- DMSO

- En çok tercih edilen konsantrasyonu %10 dur.
 - %10 DMSO ile hücrelerin +4°C'de 24 saat, 37°C'de 1 saatten fazla temasta kalmaması gereklidir.
 - Çünkü DMSO CFU üzerine direkt toksik etki oluşturabilmekte
- Saf verilmemelidir. Yakıcı özelliği var.
- Gerek viabilite, gerek CFU, gerek yakıcı özelliği gerekse donma-çözünme sırasında hasardan hücreyi koruyabilmek için plazma/HES ile karışım şeklinde verilmelidir.

Kriyoprotektan ajanlar

- 1983'e kadar kryoprezervasyonda kullanılan altın standart %10 DMSO ve %20 otolog plazma karışımı idi.
- Intrasellüler ve ekstrasellüler kriyoprotektanların beraber kullanımını gündeme girdi (DMSO+HES)

Kriyoprotektan ajanlar

□ %5 DMSO ve %6 HES'in beraber kullanılması halinde hücre engraftmanının %10 DMSO'ye göre daha iyi olduğu Seattle grubu tarafından rapor edilmiştir.

- Ancak Engraftmanda CFU yapıcı özelliğin daha önemli olduğu bildirilmekte, viabilitenin o kadar önemli olmadığı ifade edilmekte

□ 7th Annual meeting of ISHAGE, June 14-17, 2001; Qabec City, Canada

Kriyoprotektan ajanlar

- Kang ve ark. aynı kombinasyonun daha iyi hücre canlılığı ve recovery'sini sağladığını rapor etmişlerdir.
 - Blood.2002:99:850-5
- Hatta HES varlığında DMSO oranının %3,5'a çekilebileceği, bu kombinasyonda tekrarlanan dondurma ve çözmelerden sonra dahi hücrelerin proliferatif etkilerini devam ettirebildikleri gösterilmiştir.
 - Halle P et al. Transfusion.2001:41:667-73

Kriyoprotektan ajanlar

- Bugünkü veriler dondurmada en iyi kombinasyonun DMSO + HES karışımı olduğunu göstermektedir.
- Bu karışımın ayrıca hastaya infüzyon sonrası DMSO'ya bağlı yan etkileri azaltıcı etkisi de söz konusudur.
- DMSO toksitesinin azaltılması için dikkat edilmesi gereken bir noktada DMSO'nun direkt olarak hücre süspansiyonu üzerine konmaması gerektiğidir.
 - DMSO, otolog plazma, HES ve ilave edilmesi düşünülen diğer sıvılar bir yerde hazırlanıp, bu karışımdan oluşan kriyoprotektan solüsyon hücre süspansiyonun üzerine yavaşça katılır.

Dondurma işlemi ve yöntemleri

ÜRÜN DONDURMA PROTOKOLU	ÜRÜN	PLAZMA	HES %10	DMSO
KD10(KONT.DON.%10 DMSO	2.5cc	6.5cc	yok	1cc
KH3 (KONT. DON. %3 HES)	2.5cc	4cc	3cc	0.5cc
KH6 (KONT.DON. %6 HES)	2.5cc	1cc	6cc	0.5cc
BD10 (BUHAR %10 DMSO	2.5cc	6.5cc	yok	1cc
BH3 (BUHAR %3 HES)	2.5cc	4cc	3cc	0.5cc
BH6 (BUHAR %6 HES)	2.5cc	1cc	6cc	0.5cc

Dondurma işlemi ve yöntemleri

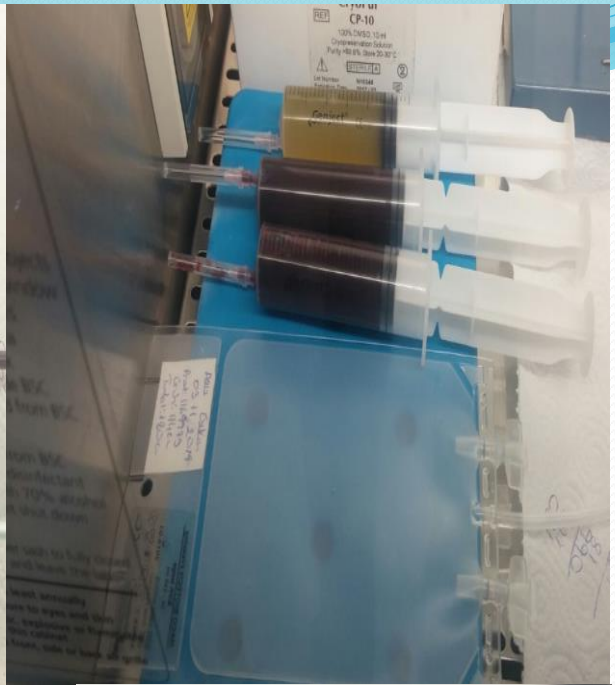
Dondurma işlemi için gerekli malzemeler şunlardır:

- 1. DMSO
- 2. Hidroksietilstarch (HES) %10
- 3. Otolog plazma/Albumin
- 4. Saklama torbaları (Cryobag)
- 5. Beş yollu musluk
- 6. 50 cc'lik enjektör
- 7. 0,2 µm'lik filtre
- 8. Fenol kırmızısız hücre kültür vasatı
- 9. Sampling site coupler

Dondurma işlemi ve yöntemleri

- ISCT' (International Society for Cellular Therapy)nin kendi web sayfasında önerdiği 6'sı etinil vinil asetat (EVA) tabanlı olmak üzere 9 saklama kabı bulunmaktadır:
- EVA tabanlılar:
 - 1. Cryocyte/Baxter
 - 2. CellFlex/Maco Pharma
 - 3. Cell Freeze™ Charter Medical
 - 4. Pall Medical Freezing Bag 791-05
 - 5. Cryostore EVA/Origen Biomedical Inc.
 - 6. Thermogenesis Corp./Freezing bag 80346-0
- EVA tabanlı olmayanlar:
 - 1. American Fluoroseal/FEP(Teflon)
 - 2. Fresenius Hemocare/Hemofreeze(Teflon,Kaplon)
 - 3. Origen Biomedical Inc./Permalife Bag, FEP/Polyimide







Dondurma İşleminde Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

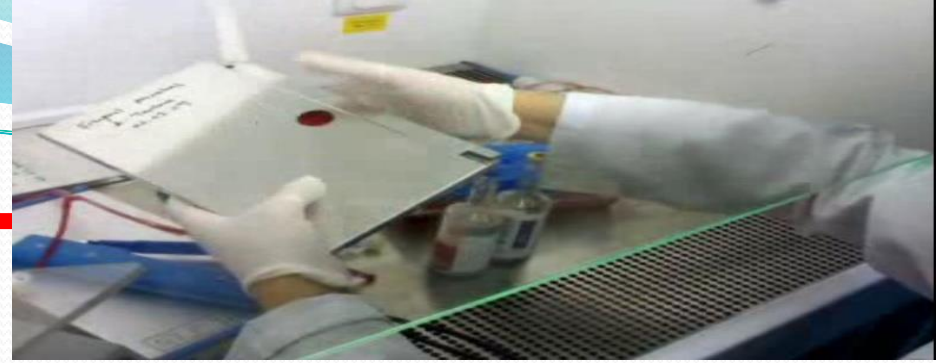
Soğutma işlemi

- ❑ Bugün dondurmada kullanılan programlı- otomatik ve mekanik olmak üzere iki yöntem vardır.
- ❑ Her iki yöntemde de önerilen optimal donmanın sağlanması için torbalara konan ürünün kapasitesini aşmamalı ve kalınlığı 5mm'yi geçmemelidir.

Soğutma işlemi

❑ Mekanik dondurma:

- ❑ Ürün -20°C 'ye kadar, soğutulmuş alüminyum plakalar vasıtasıyla monolayer haline getirilir.
- ❑ Köpük içinde veya gazlı beze sarılarak direk -80°C 'ye kaldırılır.
- ❑ Böylece ortalama $1-2^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ 'lık bir soğutma hızı sağlanır
 - Bu yöntemde, faz geçiş zamanının umulandan kısa olduğu saptanmıştır.
 - Klinik çalışmalarda hücre kaybının yüksek olduğu bulunmakla birlikte, engrafmanında uzama tespit edilmemiş



Lewis JP, et al. The effect of cooling regimens on the transplantation potential of marrow. Transfusion; 7: 17–32.

Meryman HT, et al. Freezing injury from solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. Cryobiology; 14: 287–302.

Ketheesan N, et al. Effect of cryopreservation on the immunogenicity of umbilical cord blood cells. Transfus Apher Sci; 30: 47–54.

Almici C, et al. Uncontrolled-rate freezing of peripheral blood progenitor cells allows successful engraftment by sparing primitive and committed hematopoietic progenitors. Haematologica; 88: 1390–1395.

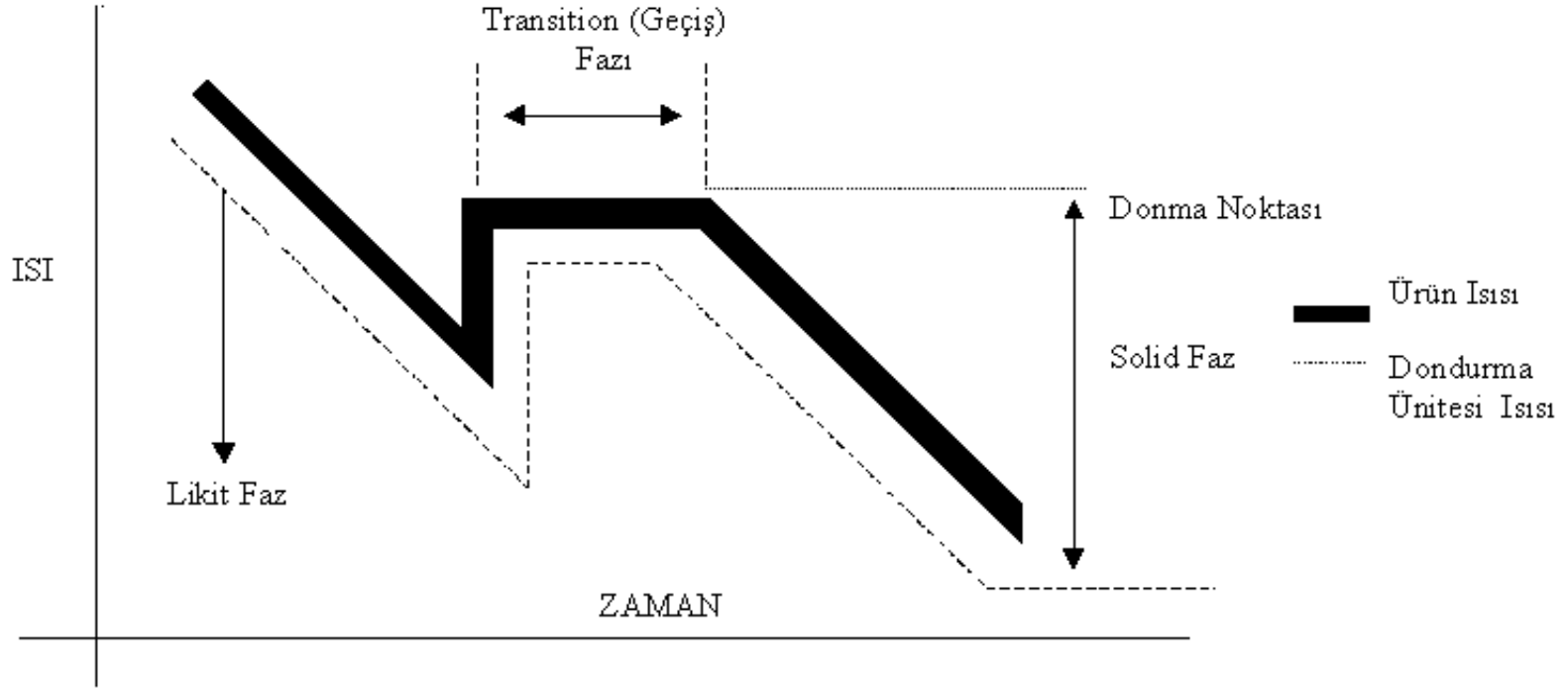
Soğutma işlemi

- Programlı-otomatize yöntem:
- Bu yöntemde ürün 4°C'ye soğutulmuş alüminyum plakalar arasında programlı soğutucuya yerleştirilir
- 4° ile -10°C arasında 1°C/dk soğutma programlanır
- -10°C'den sonra faz geçiş döneminde ise önerilen soğutma hızı, soğutma haznesinin ısısı -50°C ye ulaşana dek 25°C/dk, sonra ürün ısısı -20°C'ye gelene dek 15°C/dk'lık bir soğutma yapılmasıdır
- Geçiş zamanı sonrası makine dakikada 1°C soğutmaya programlanarak ürün -80°C'ye kadar soğutulur ve azot tankına kaldırılır

Soğutma Hızı

- ❑ Bugünkü bilgilerimiz soğutmanın kryoprotektan varlığında dakikada 1°C olması gerektiğidir.
- ❑ Ancak;
Su, sıvı durumundan katı duruma geçerken ısı yayar. Eğer dondurma sırasında buna dikkat edilmez ise geçiş fazında bir uzama meydana gelir ki, bunun hücre canlılığı üzerine çok olumsuz etkileri olur.
- ❑ Bu dönemde yapılması gereken ısıtma hızını arttırmaktır.
 - Donma işleminin başladığı andan, tam donmanın tamamlandığı ana kadar olan bu kritik period ile hücre hasarı arasında direk korelasyon gösterilmiştir.
 - Bu nedenle ürün ısısı -20°C 'ye ulaşana kadar $15-20^{\circ}\text{C/dk}$ 'da hızlı bir soğutma işlemine tabi tutulur.
 - Ancak yapılan araştırmalarda bu olumsuzluktan lenfositlerin daha az etkilendiği gösterilmiştir.

Faz geçiş zamanı: Özellikle yüksek volümlü ürünlerin dondurulması sırasında önemlidir. Donma düzeninde bu platonun kısa tutulması önemlidir



Geçiş fazı (Donma) sonrası soğutma ısısı

- Bu dönemde olan soğutmanın dakikada 5°C ' den daha yavaş olması önerilmektedir.

İdeal $1-3^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ 'dır

- -80°C 'ye ulaşıldıktan sonra ürün daha düşük ısılara, örneğin sıvı azot veya azot buharı içine direkt olarak kaldırılabilir

Hız kontrollü ve kontrolsüz dondurma

- Randomize bir çalışma; viabilite testi açısından her iki yöntemin birbirine benzer olduğunu bildirmekte
 - Perez ve ark
- Kontrollü dondurma ile yapılan periferik kök hücre naklinde engrafman sürelerinin kontrolsüz dondurma ile yapılanlara göre daha uzun olduğu tespit edilmiş
 - Montanari ve ark

Perez-Oteyza J, et al. Controlled-rate versus uncontrolled-rate cryopreservation of peripheral blood progenitor cells: A prospective multicenter study. Group for cryobiology and biology of bone marrow transplantation. Haematologica; 83: 1001.

Montanari M, et al. Long-term hematologic reconstitution after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: a comparison between controlled-rate freezing and uncontrolled- rate freezing at 80 degrees C. Transfusion; 43: 42.

Mekanik dondurma yönteminin programlı dondurma yöntemine üstünlükleri

- ❑ Hız kontrollü dondurma yöntemine göre çok ucuz
- ❑ İşlem daha az zaman almakta
- ❑ Ek ekipmana ve azot üretim sistemine gereksinim göstermemekte
- ❑ 5 seneye varan sürelerde; viabilite ve CFU-GM oluşturma kapasitesi açısından hız kontrollü dondurmaya göre farksız sonuçları mevcut
- ❑ DMSO toksisitesi daha az
- ❑ Viral veya bakteriyel bulaş tanımlanmamış





Saklama

- ❑ Eğer ürün azot tankında saklanması söz konusu ise koruyucu kılıfının da bulunması faydalıdır.
- ❑ Saklama ortamı için en uygun ortam, azot buhar fazı olup, teorik olarak azot içinde ürünün sonsuza kadar saklanabileceği kabul edilir.
- ❑ -80, -135°C'lik soğutma kapasitesine ulaşan mekanik dondurucular kurulum ve maliyet açısından daha uygundur.
- ❑ Mekanik dondurucularda saklanacak ürünlerin ayrı ayrı paketler halinde yatay saklanması önerilmektedir.

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.

Valeri , Transfusion 1996; 36:303-308

Galme, Transfusion 1996;36:794-797

Çözme işlemi

Bugün için kabul edilen 2 yöntem bulunmaktadır.

1) Su Banyosu

Standart olarak kabul edilen yöntem tüm buz kristalleri kayboluncaya kadar su banyosu içerisinde, 37 °C, 40 °C'de eritmektir.



2) Jel Ped (Kuru Isıtma)

Yapılan çalışmalarda hücre viabilitesi nin su banyosu ile benzer olduğu, fakat infeksiyöz kontaminasyonun kuru ısıtma yönteminde daha az meydana geldiğini göstermiştir.





Kök Hücre Transplantasyon Ünitesi





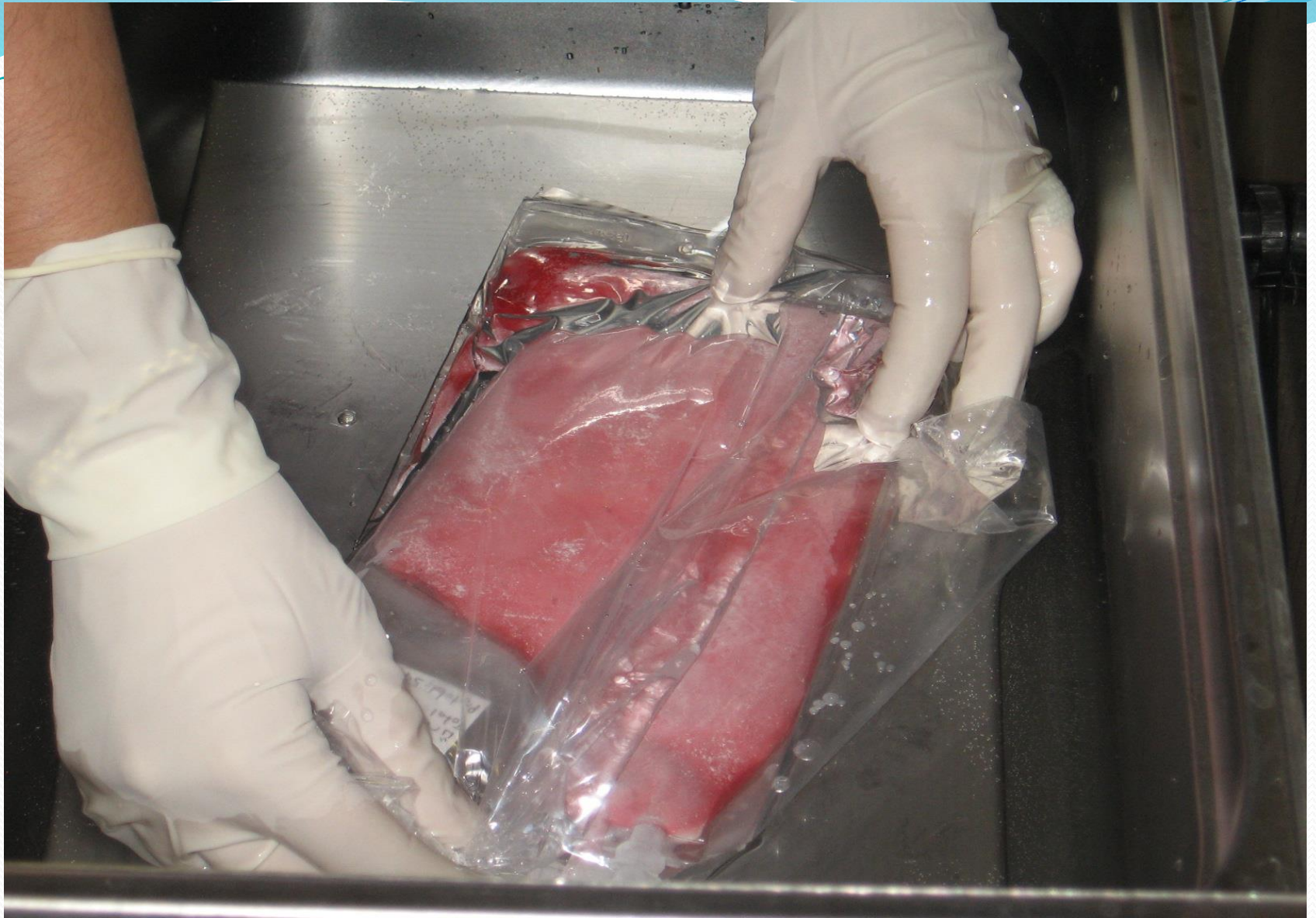




















SONUÇ

- Kök hücre saklama uygulamalarının çoğu “Ampirik”
- En uygun kriyoprezervasyon yöntemini belirlemek için çalışmalara (solüsyon, dondurma hızı) devam edilmektedir
- Dondurma ve saklama esnasında meydana gelen hasarı en aza indirmek için, hasara ait spesifik moleküler mekanizmaları belirlemek ve önlem almak gerekmektedir
- İdeal kriyoprezervasyonu sağlamak için, moleküler yapısı ve donma özellikleri iyi tanımlanmış, yeni nesil kriyoprotektif ajanlara gereksinim vardır





TEŞEKKÜRLER