



T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara İli Kamu Hastaneleri Birliği
2. Bölge Genel Sekreterliği

ANKARA ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI HEMATOLOJİ ONKOLOJİ
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ



PERİFERİK KÖK HÜCRE SAKLAMA, ERİTME VE İNFÜZYON İŞLEMLERİ

BİO.YASİN KÖKSAL

HÜCRELERİN SAKLANMASI

- Birçok pratik uygulamada 0°C 'nin üzerinde hücrelerin saklanması hücre canlılığı için yeterli olmamaktadır.
- Isı -79°C 'nin altına inmedikçe metabolik saatin durdurulması imkansızdır.
- $0-20^{\circ}\text{C}$ 'de
 - Na-K pompası bozulmakta
 - Hücreler şişmeye başlamakta
 - Enzim aktiveleri bozulmakta
 - Az çözünen materyallerin presipite olması nedeniyle pH değişiklikleri oluşmaya başlamakta

Hücre viabilitesini bozmaktadır

KRİYOPREZERVASYON

- Kriyoprezervasyon hücrelerin ya da dokuların özel koruyucu maddelerle (kriyoprotektan) saklanmasıdır.
- -79°C ve daha düşük sıcaklıklarda, hücre ölümüne neden olabilecek biyokimyasal reaksiyonlar dahil bütün biyolojik aktiviteler durdurulur.

KRİYOPREZERVASYONDA AMAÇ

- Periferik Kök Hücre yada Kemik iliğinden elde edilen “canlı” pluripotent Hematopoetik Kök Hücrelerin yeniden eritildiklerinde **canlılık ve fonksiyonel bütünlüklerini yüksek oranda korunmuş** olması ve toksik bir etki olmaksızın alıcıya infuze edilebilmesinin sağlanmasıdır.

KRİYOPREZERVASYON

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

KRİYOPREZARVASYON AŞAMALARI

- Termal şok
- Solüsyon etkileri
- Faz geçiş zamanı etkileri
- Donma sonrası soğutma hızı
- Saklama-depolama
- Çözme dönemi
- Rekristalizasyon
- Dilüsyon şoku
- Torbaların patlaması
- Kontaminasyon

TERMAL ŞOK

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

KRİYOPROTEKTİF AJAN

- Su molekülerini bağlayarak, su kristalizasyonunu yavaşlatmak ve solütlerle eş zamanlı donmasını sağlamak
- Bu amaçla gliserol veya DMSO gibi kolligatif ajanlar kullanmak
- Penetran bir kryoprotektif ajan, donma işlemi esnasında hücre içine geçerek internal kristalizasyonun önüne geçecektir.

KÖK HÜCRE KRİYOPREZERVASYONU

Kriyoprotektif ajanlar iki tiptir.

1- İntrasellüler ajanlar Hücremembranından geçebilen (permeabl)

- Gliserol
- Dimetilsulfoksid (DMSO)

2- Ekstrasellüler ajan

Hücre membranından geçemeyen (non-permeabl)

- **HES (Hidroksietil starch)**
- Hepsi hiperozmotiktir
- Suyla tamamen karışırlar.

İNTRASELLÜLER KRİYOPROTEKTANLAR

- Hücre içerisine girebilen kriyoprotektanlar düşük moleküler ağırlığa sahiptirler.
- Dimetilsülfoksit (DMSO),
- Gliserol,
- Etilenglikol (EG),
- 1.2 propandiol,
- 2.3 bütandiol,
- Propilen glikol

İNTRASELLÜLER KRİYOPROTEKTANLAR

- Hücre içi proteinleri stabilize etmek
- Hücre içinde donma sıcaklığını düşürerek meydana gelen ölümcül buz oluşumunu azaltmak veya tamamen ortadan kaldırmak
- Konsantre hale gelen hücre içi ve hücre dışı elektrolitlerin etkisine bağlı ozmotik hasarı azaltmak

EKSTRASELLÜLER KRİYOPROTEKTANLAR

- Nonpermeabl kriyoprotektanlar
 - Düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar
 - *Glikoz, HES, sükroz, trehaloz, rafinoz, galaktoz.*
 - Yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar
 - *PVA (polivinilalkol), PVP (polivinil pirolidon)* ve diğer bazı polimerler.

EKSTRASELLÜLER KRİYOPROTEKTANLAR

- Hücre dışındaki donmamış suyun oranını azaltmak
- Faz geçişlerini ve hidrasyon durumunu değiştirmek amacıyla membran lipidleri ve proteinleriyle etkileşime girmek
- Kriyoprotektan eklenmesi veya uzaklaştırılması sırasında hücrelerin şişmesini engellemek amacıyla ozmotik tamponlar olarak görev yapmak.

KRİYOPROTEKTAN AJANLAR

- Gliserolün reinfüzyon öncesi uzaklaştırılmasındaki güçlüklerden dolayı bugün kullanılan kryoprotektif ajanlar içinde en penetran olan dimethyl sulfoxide (DMSO).
- Polivinil pirolidon (PVP) ve Hidroksietil starch'ın (HES) hemen hiç **penetrasyon özelliği yok.**

KRİYOPROTEKTAN AJANLAR

- Ancak bu ajanların penetrasyon özelliği hücreler dondurulduktan sonra çözünürken bir dilüsyon şokuna neden olabilmektedir.
- Bu nedenle tek bir kryoprotektif ajanın kullanılmasından çok, birden fazla kryoprotektanın uygun karışımları daha iyi sonuçlar verir.

KRİYOPROTEKTAN AJANLAR

- Intraselüler ve ekstraselüler kryoprotektanların beraber kullanımı gündeme gelmeden önce genel olarak kryoprezervasyonda kullanılan altın standart %10 DMSO ve %20 otolog plazma karışımı idi.

KRİYOPROTEKTAN AJANLAR

- %5 DMSO ve %6 HES'in beraber kullanılması halinde hücre engraftmanının %10 DMSO'ye göre daha iyi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

KRİYOPROTEKTAN AJANLAR

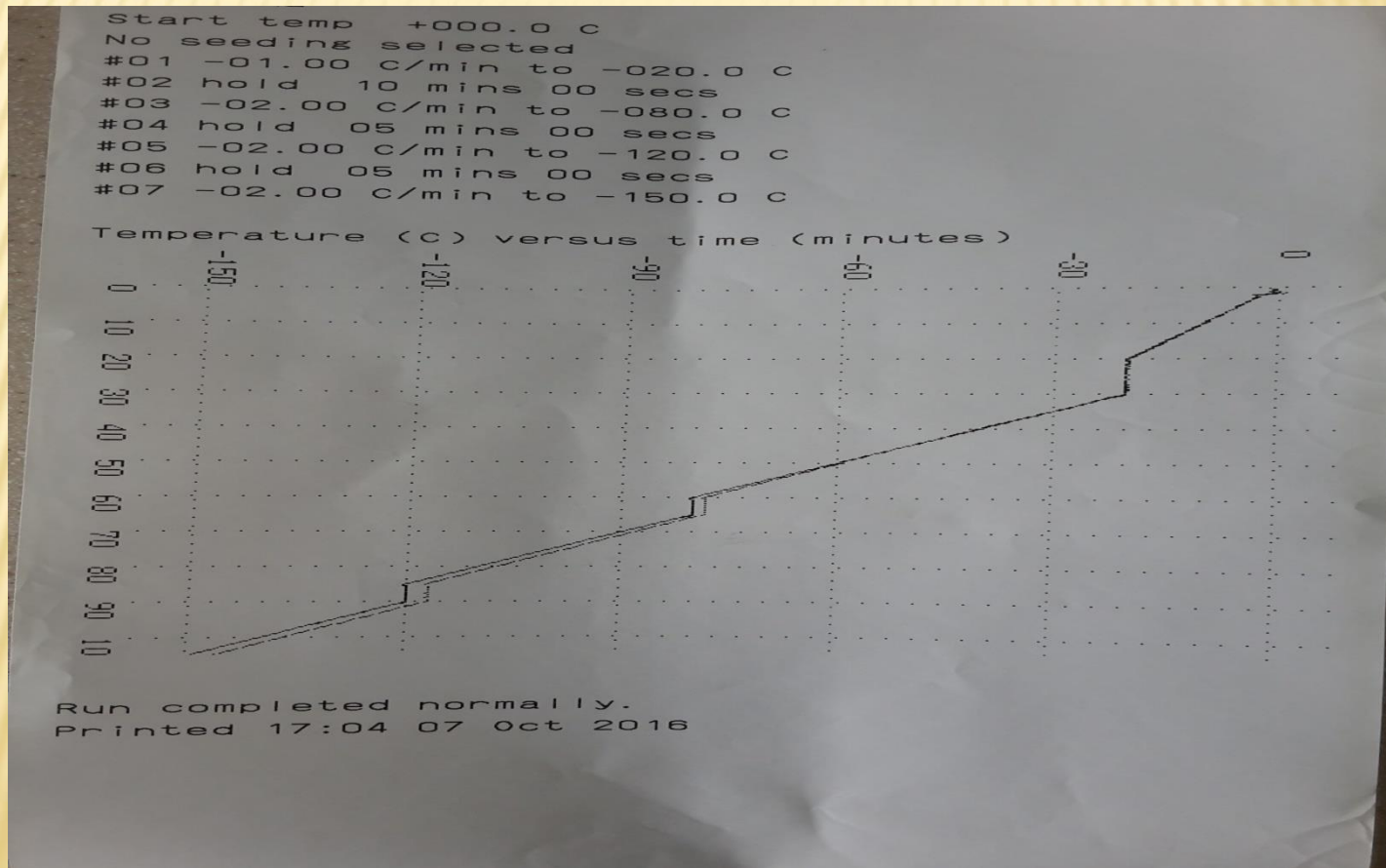
- Hatta HES varlığında DMSO oranınının %3,5'a çekilebileceği, bu kombinasyonda tekrarlanan dondurma ve çözmelerden sonra dahi hücrelerin proliferatif etkilerini devam ettirebildikleri gösterilmiştir.

HÜCRE KAYBI

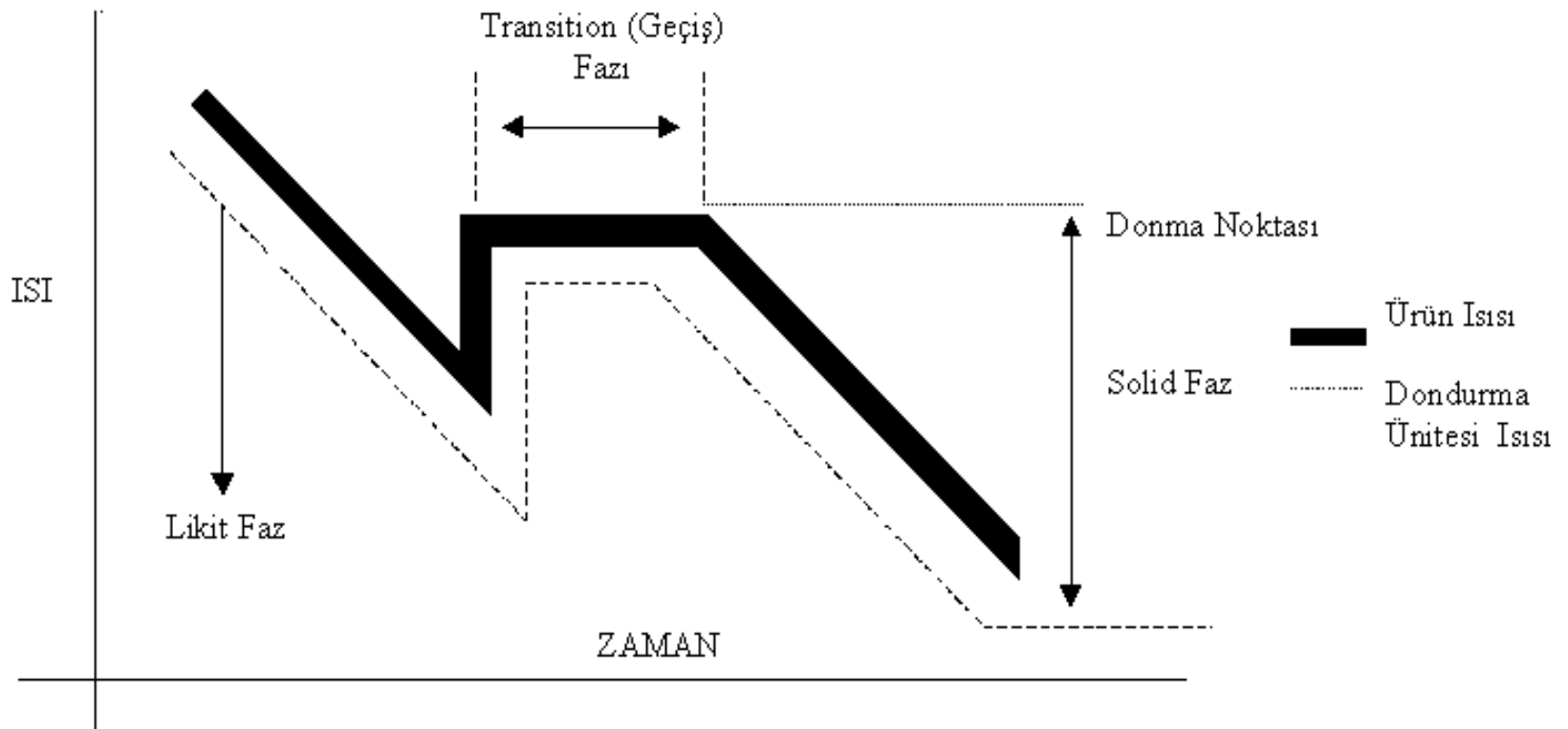
- Dondurma işlemi sırasında hücre kaybının en önemli nedeni buz kristal formasyonudur.
 - Hızlı soğutmalarda($>10^0\text{C/dak}$) intraselüler buz kristalleri oluşmakta ve hücrenin mekanik olarak parçalanmasına ve hızlı hücre ölümüne neden olmaktadır.
 - Daha yavaş($<10^0\text{C/dak}$) soğutma hızlarında ise buz kristal oluşumu hücre dışı alanda oluşur. Ortaya çıkan hiperosmolar durumda hücrenin dehidrasyon ile ölümüne neden olur.

SOĞUTMA HIZI

- Bugünkü bilgilerimiz soğutmanın kryoprotektan varlığında dakikada 1°C olması gerektiğine dikkati çekmektedir.



GEÇİŞ FAZI



SAKLAMA-DEPOLAMA

- -80°C'ye kadar protokollere uygun olarak hücreler hazırlanırsa artık hücre kaybı yaşanmayacaktır ve -196°C tanklarda sınırsız muhafaza edilebileceği belirtilmektedir.
- Kritik değer olan -79 °C saklanması halinde 5 sene kadar ürünün saklanabileceği rapor edilmektedir.

DONDURULMUŞ HÜCRELERİN ÇÖZÜLMESİ

- Isınma sırasında hücre içinde kristal oluşumu yeniden başlar ve hücrede mekanik hasara yol açar.
- Donma sırasında gelişen olayların tam tersinin çözülme sırasında gerçekleşerek ekstrasellüler alanın hipotonik karakter kazanmasıdır.
- Isınma sırasında dondurma öncesi hazırlık döneminde cryobag'de kalmış olan havanın genişleyerek torbayı patlatması.

YAPILMASI GEREKEN

- Eritmenin, dondurmanın aksine çok hızlı yapılması.
- Hücreleri çözünme sırasındaki ozmotik şoktan (Dilüsyon şoku) koruyabilmenin bir diğer yolu; hücre dışı osmolaritenin korunabilmesi için nonpenetran (HES gibi) kryoprotektanların, penetran kryoprotektanlarla beraber kullanılmasıdır.

***DONDURMA VE ERİTME İŞLEMİNDE
DİKKAT EDİLMESİ
GEREKEN KONULAR***

KONSATRASYON

- İşlem Öncesi Hücre Konsantrasyonu
- Periferik kaynaklı kök hücre için; $<1 \times 10^8/\text{ml}$
- Kemik iliği kaynaklı kök hücre için; $<5 \times 10^7/\text{ml}$

KRİYO TORBALARI

Cryostore™

REF CS250NS

Max. Volume 250 ml

Freeze Volume 30 - 70ml

Gefrier Volumen 30 - 70 ml

Volume de Congélation 30 - 70 ml

Volúmen de congelación 30 - 70 ml



STERILE R



STERILE: Sterilized by Radiation. Fluid path sterile
only if pouch is not opened or damaged

Lot Number: **N50095-4NS**

LOT

Expiration Date: **2018 / 07**



Contents: **1**

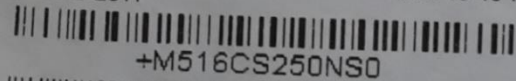
CE 0473

www.origen.com

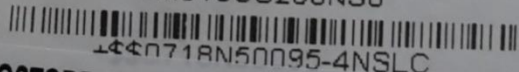
Manufactured by:
OriGen Biomedical
7000 Burleson Rd., Bldg. D
Austin, TX, USA 78744
Tel: +1 512 474 7278

European Representative:
OriGen Biomed Europe
Landskronavägen 25A
252 32 Helsingborg
Sweden
Tel: +46 46 772433

LC-34, R04 © 2011



+M516CS250NS0



+440718N50095-4NSLC

CRYOSTORE

Cryostore™

REF CS500NS

Max. Volume 500 ml

Freeze Volume 55 - 100ml

Gefrier Volumen 55 - 100 ml

Volume de Congélation 55 - 100 ml

Volúmen de congelación 55 - 100 ml



STERILE R



STERILE: Sterilized by Radiation. Fluid path sterile
only if pouch is not opened or damaged

Lot Number: **P50122-4NS**

LOT

Expiration Date: **2019 / 05**



Contents: **1**

CE 0473

www.origen.com

Manufactured by:
OriGen Biomedical
7000 Burleson Rd., Bldg. D
Austin, TX, USA 78744
Tel: +1 512 474 7278

European Representative:
OriGen Biomedical GmbH
Romerstrasse 14
72393 Burladingen
Germany
Tel: +49-7475-915591

İthalatçı
Datastok
BİOMEDİKAL
BİOMEDİKAL
BİOMEDİKAL



SO
SE
Te

Cryostore™

REF CS750NS

Max. Volume 750 ml

Freeze Volume 80 - 190ml

Gefrier Volumen 80 - 190 ml

Volume de Congélation 80 - 190 ml

Volúmen de congelación 80 - 190 ml



STERILE R



STERILE: Sterilized by Radiation. Fluid path sterile
only if pouch is not opened or damaged

Lot Number: **N50081-3NS**

LOT

Expiration Date: **2018 / 03**



Contents: **1**

CE 0473

www.origen.com

Manufactured by:
OriGen Biomedical
7000 Burleson Rd., Bldg. D
Austin, TX, USA 78744
Tel: +1 512 474 7278

European Representative:
OriGen Biomed Europe
Landskronavägen 25A
252 32 Helsingborg
Sweden

LC-34, R04 © 2011

MA TORBALARI (7

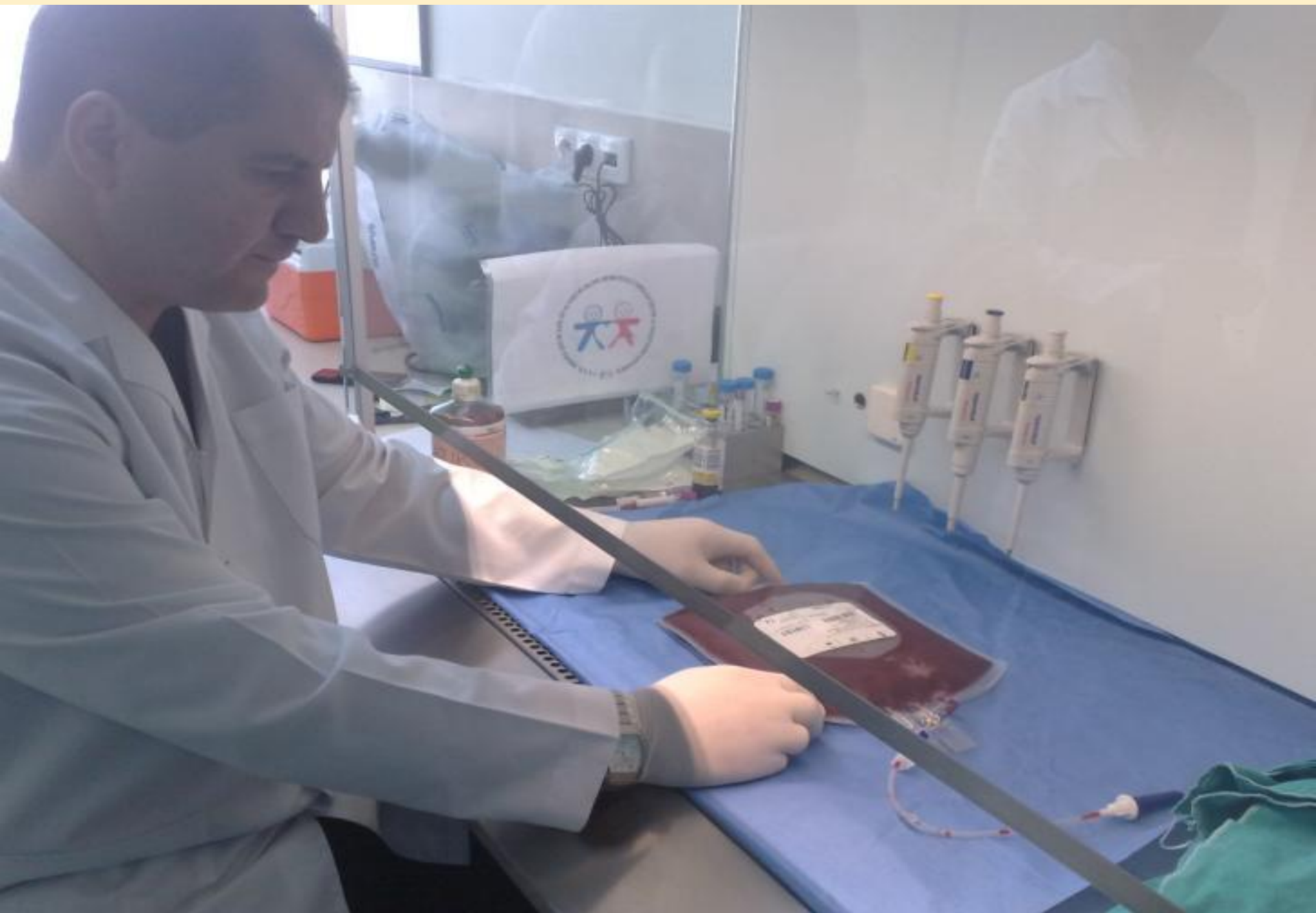
No: CS750NS

Kök Hücre ve Renik İliği Dondurma Torbası
Maksimum

ÖZETLE

- Tek başına kullanıldığında en ideal ajan DMSO
- %5-10 oranında DMSO etkin koruma sağlamaktadır
- DMSO toksitesinin azaltılması için, DMSO direk hücre süspansiyonu üzerine eklenmemeli
- Ayrıca buz kalıbı veya masa üstü soğutucu kullanılmalı
- Yardımcı kriyoprotektan olarak kullanılanlar
 - ❖ DMSO
 - ❖ HES
 - ❖ Plazma (Otolog-Allojenik)







SOĞUTMA İŞLEMİ

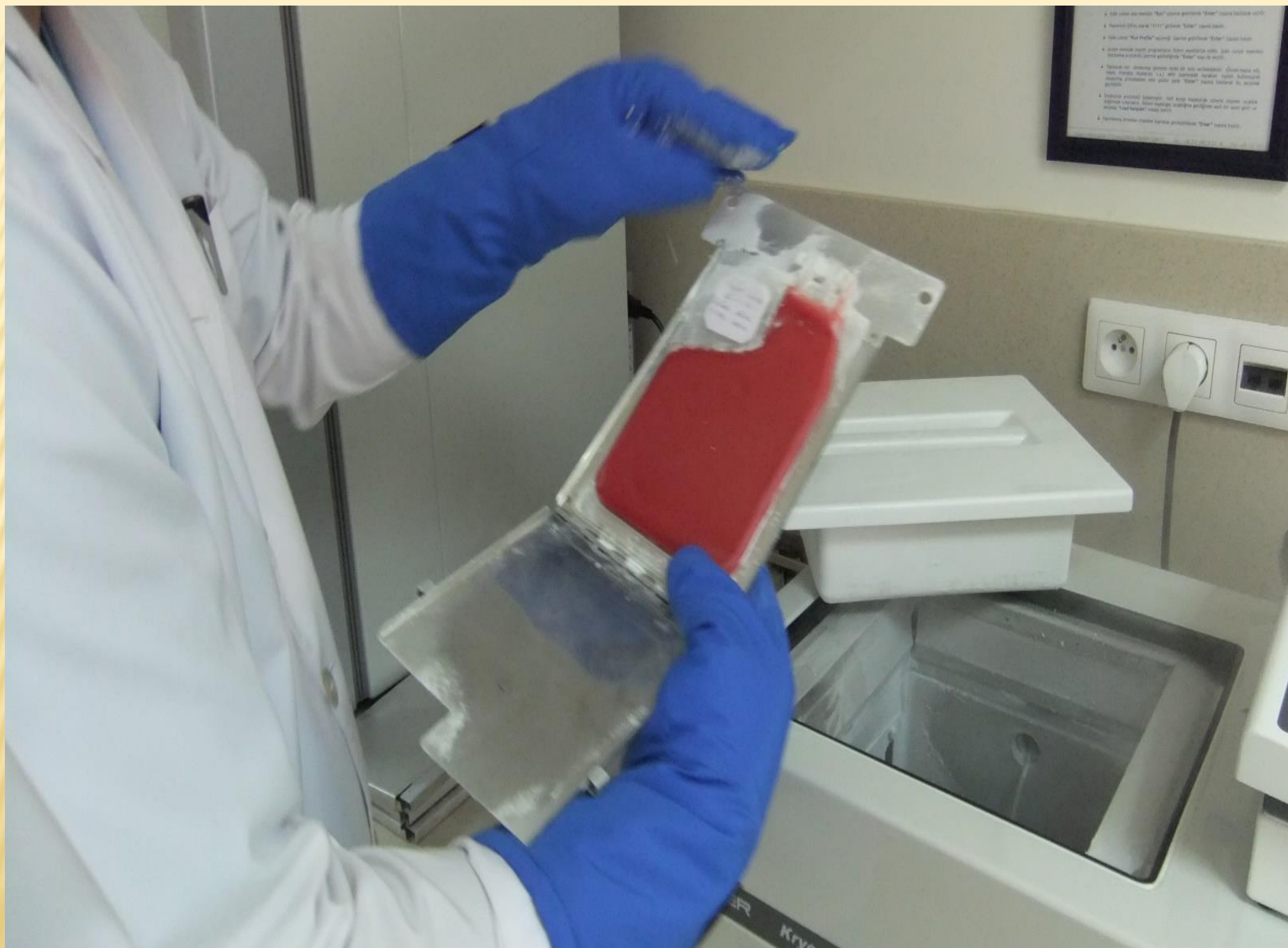
- Bugün dondurmada kullanılan programlı- otomatik ve mekanik olmak üzere iki yöntem vardır.
- Her iki yöntemde de önerilen optimal donmanın sağlanması için torbalara konan ürünün torba özelliğine göre ayarlanması ve kalınlığının 5mm'yi geçmemesidir.
- Torba ağızlarının donma esnasında kırılma ve yırtılma riskini göz önünde bulundurmalı, torbaları uygun şekilde kasetlere yerleştirmeliyiz.

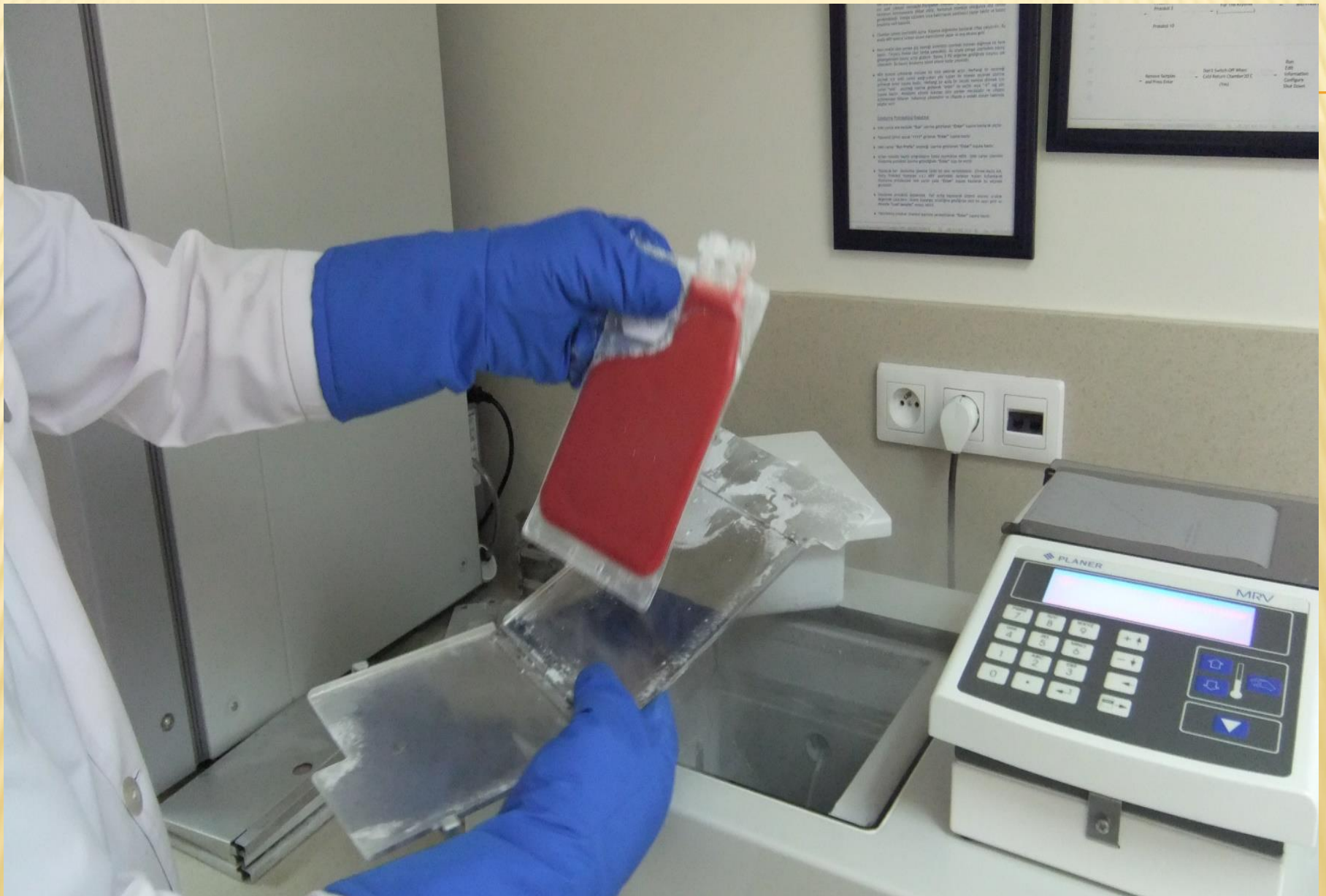
SOĞUTMA İŞLEMİ

- 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











SAKLAMA

- Eğer ürün azot tankında saklanması söz konusu ise koruyucu kılıfının da bulunması faydalıdır.
- Saklama ortamı için en uygun ortam, azot buhar fazı olmasına rağmen tankın alt ve üst kısımlarında belirgin bir sıcaklık gradiyenti ortaya çıkmakta. Bunun önüne geçebilmek için sıcaklığı daha iyi ileten özel alüminyum çerçeveler kullanılmalıdır. Teorik olarak ürünün sonsuza kadar saklanabileceği kabul edilir.

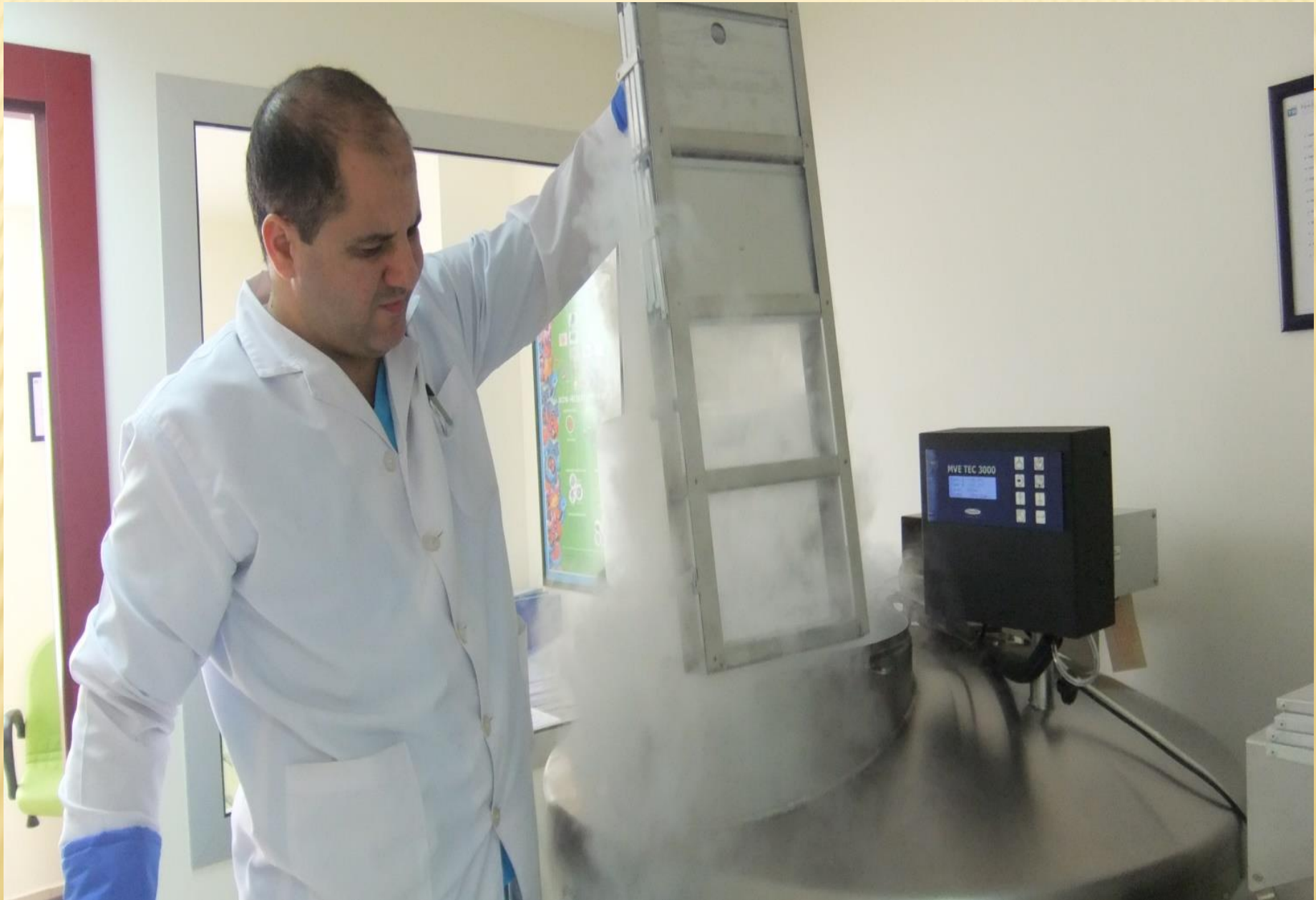
SAKLAMA

- Tank içersindeki enfekte ürünlerden özellikle aspergillus, stafilokok, streptekok, enterokok, pseudomonas, HBV, HCV gibi ajanların bulaşabildiği gösterilmiştir.
- Bu gibi bulaşma riski olan kontamine ürünlerin ayrı bir tankta muhafaza edilmesi daha uygun olacaktır.









KÖK HÜCRE TRANSFERİNİ NASIL YAPABİLİRİM?

- **Dondurulmuş hücreler nakil yapılacak merkeze özel taşıma tankları ile transfer edilmeli:**
 - + Ürünlerin saklandığı tankların ısısıyla aynı olmalı
 - + Ürünler taşınırken ısı farkına maruz kalmamalı
 - + Şehirlerarası ve uluslar arası taşımalarda, dökülme, sızıntı v.b risklere karşı ürünler sıvı azot içerisinde değil buhar fazında taşınmalı
 - + Taşıma tankı üzerinde ortamın ısını belirten bir gösterge olmalı





KÖK HÜCRE ERİTME İŞLEMİ NEREDE YAPILIR?

- İçi %90 etil alkol ile yıkanmış su banyosuna steril su konduktan sonra 37-40°C kadar su ısıtılır
- Kök hücre ürünü hızlıca 38-40°C'de çözülür
- Bir miktar azot içeren kaplar ile transfer edilen ürün torbaları su banyosu içinde yumuşak masaj hareketleri ile tamamen eritilir.
- Ürün torbasının koruyucu kılıfı yoksa ağız kısmının su içine daldırılmamalıdır.



Çözülen Ürün Batikon İle steril edilir.

KALİTE KONTROLÜ İÇİN NELER YAPILMALI?

1. Hücre Miktarı:

- A. Çekirdekli hücre miktarı
- B. Eritrosit miktarı
- C. Trombosit miktarı

2. Hücre morfolojisi (Yayma, formül)

3. Hücre canlılığı (Viabilite)

4. Sterilite (Kültür)

5. Kök Hücre miktarı (Quantity):

- A. CD34 hücre sayısı
- B. Hematopoietik progenitor hücre kültür

6. Tümör hücre kontaminasyonu (otolog)

VALİDASYON ÇALIŞMALARI

- Tüm cihazların ısısı kontrol edilmeli; işlem öncesi ve işlem esnasında,
- İşlem yapılan kabin ve ürün işlenen odanın sterilizasyonu yapıp partikül ölçümleri yapılmalıdır.
- Toplanan ürün işlem öncesi ve işlem sonrası kültürleri alınmalı ve hematopoetik koloni (CFU) sayımları yapılarak değerlendirilmelidir
- Nakil olacak üründen en az 3 cryovial örnek hücresel izolasyon yapılarak saklanmalıdır.
- Hücre canlılığı kontrol edilmeli ve yapılan tüm kontrol işlemleri kayıt altına alınmalıdır.
- Verilen ürün ilk aşamadan engraftman aşamasına kadar takip edilmelidir.





HandiLaz[®]

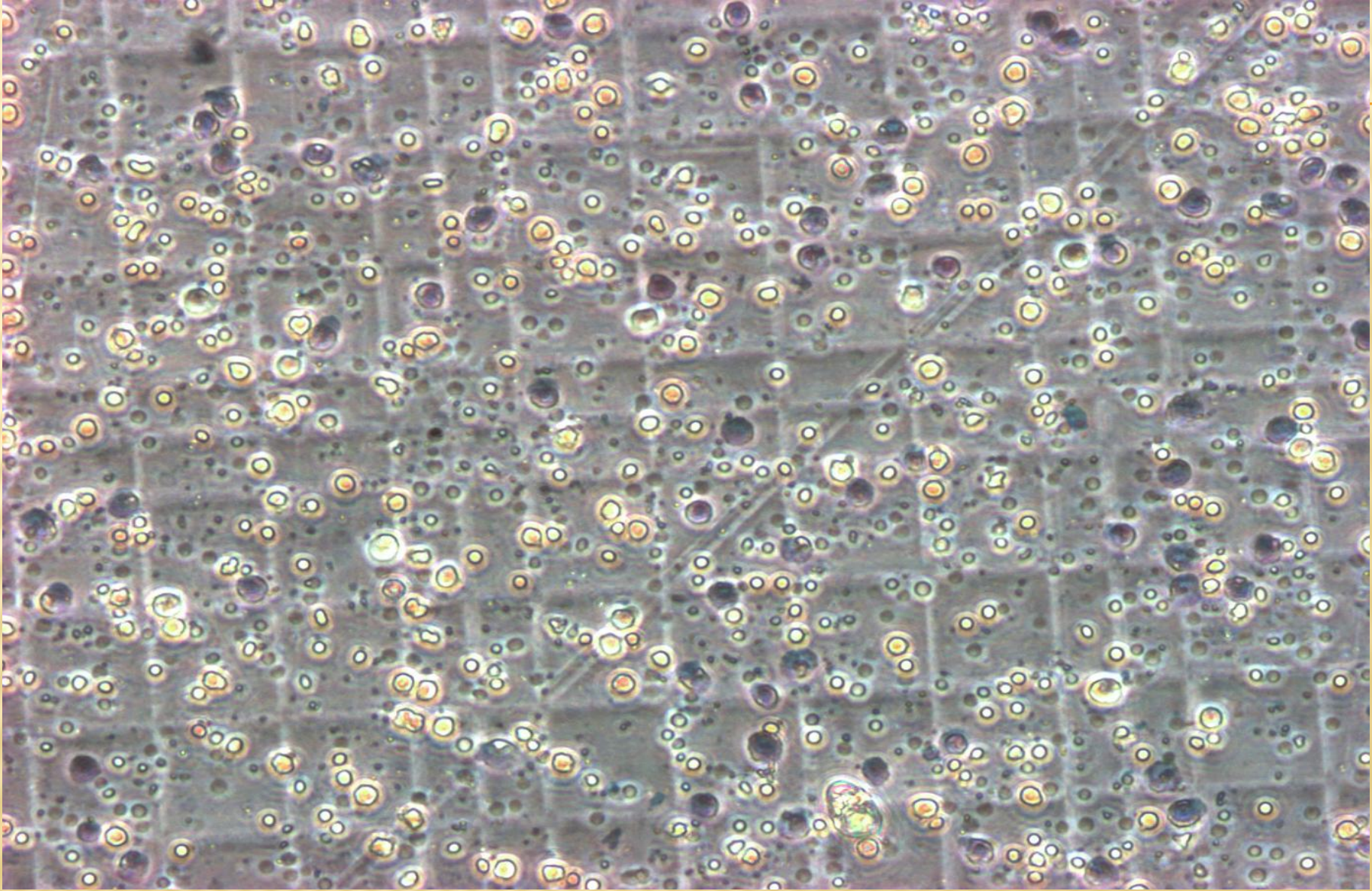
mini

SINGLE 16:36
RUN 0.3 0.00E+00 cf
0010 0.5 0.00E+00 cf
0101 5.0 0.00E+00 cf

Handheld Particle Counter

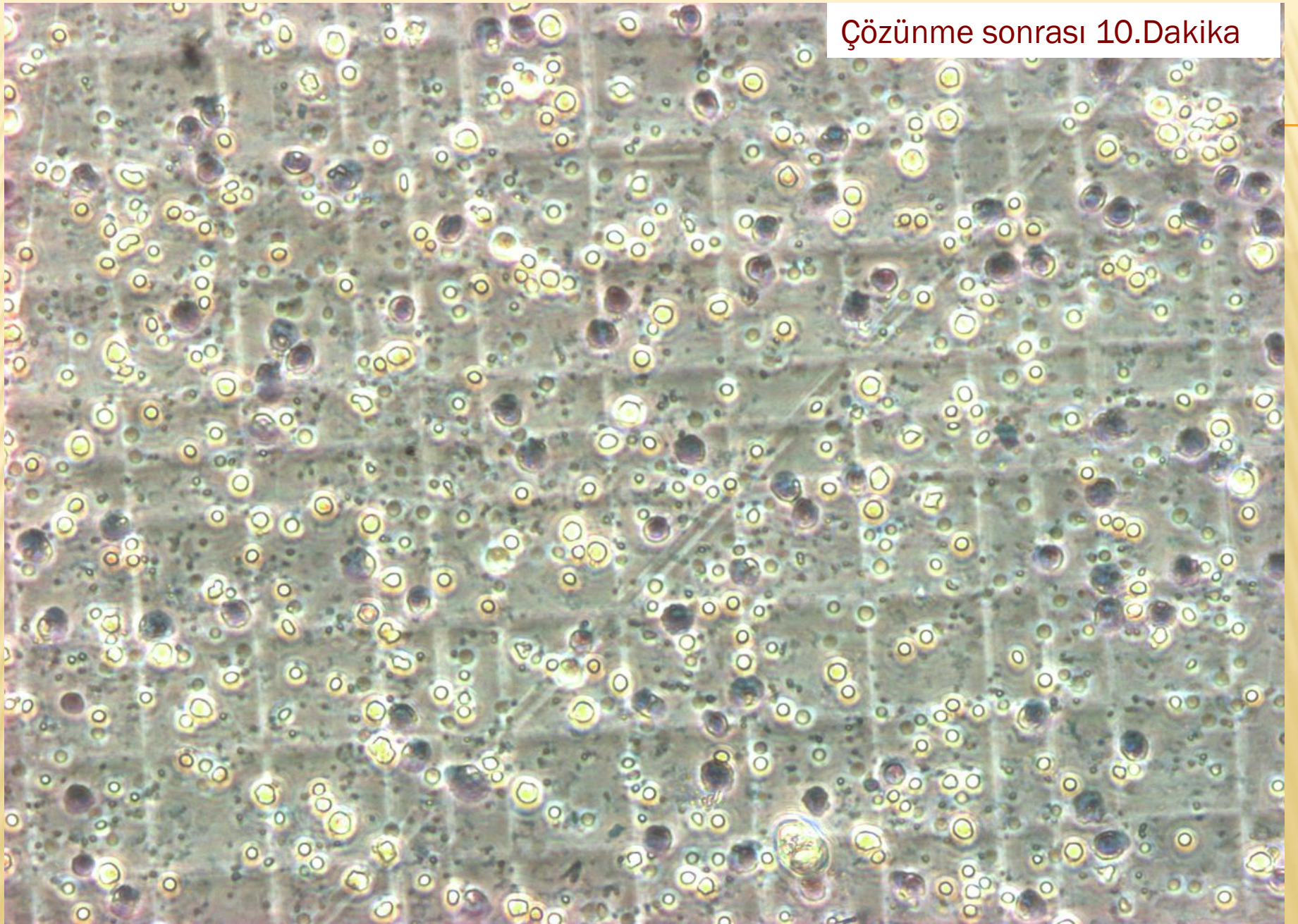
START
STOP



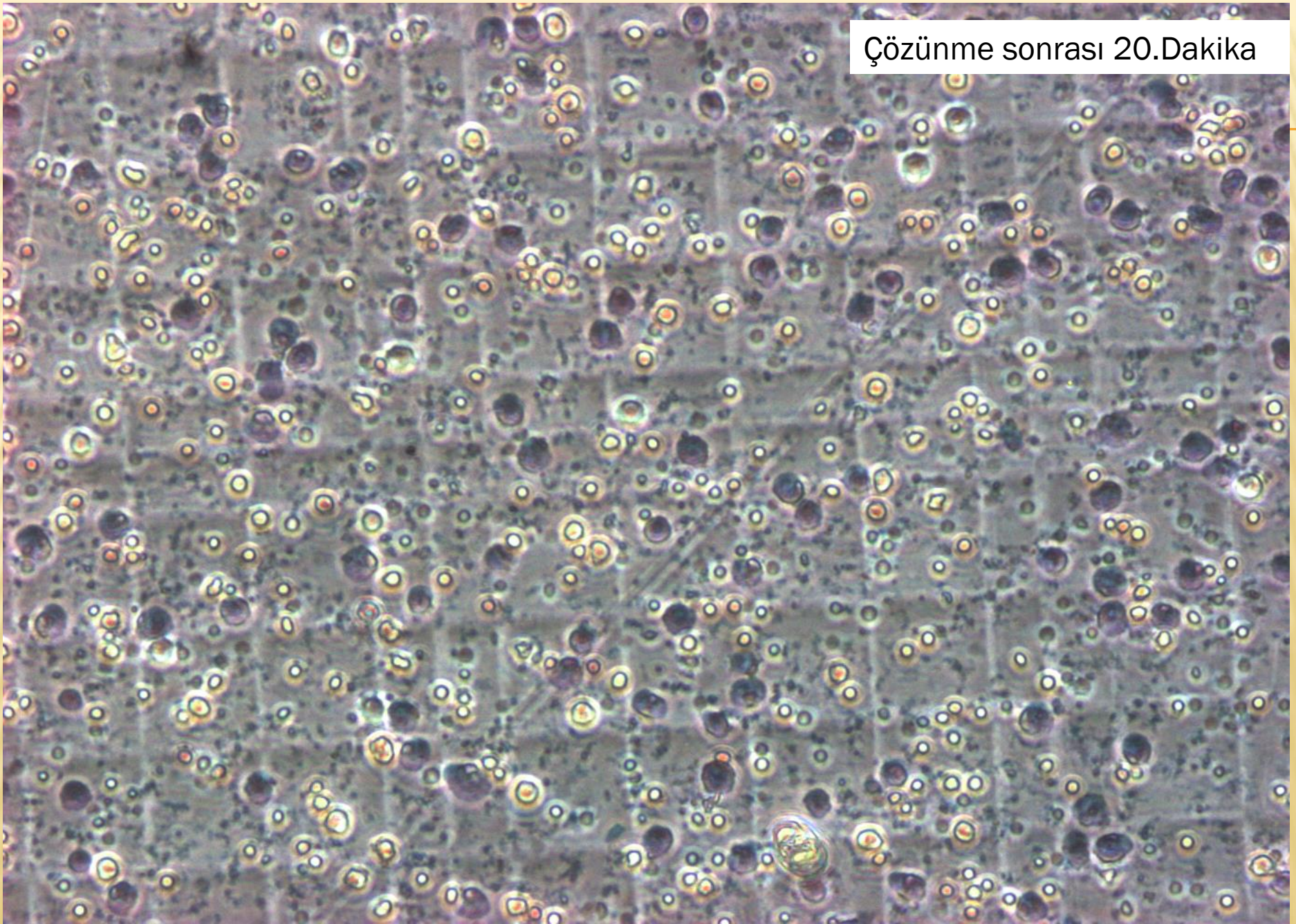


- Çözünen ürün hastaya en hızlı şekilde verilmeli DMSO etkisi ile viabilite düşüşü çözünme ile başlamaktadır.

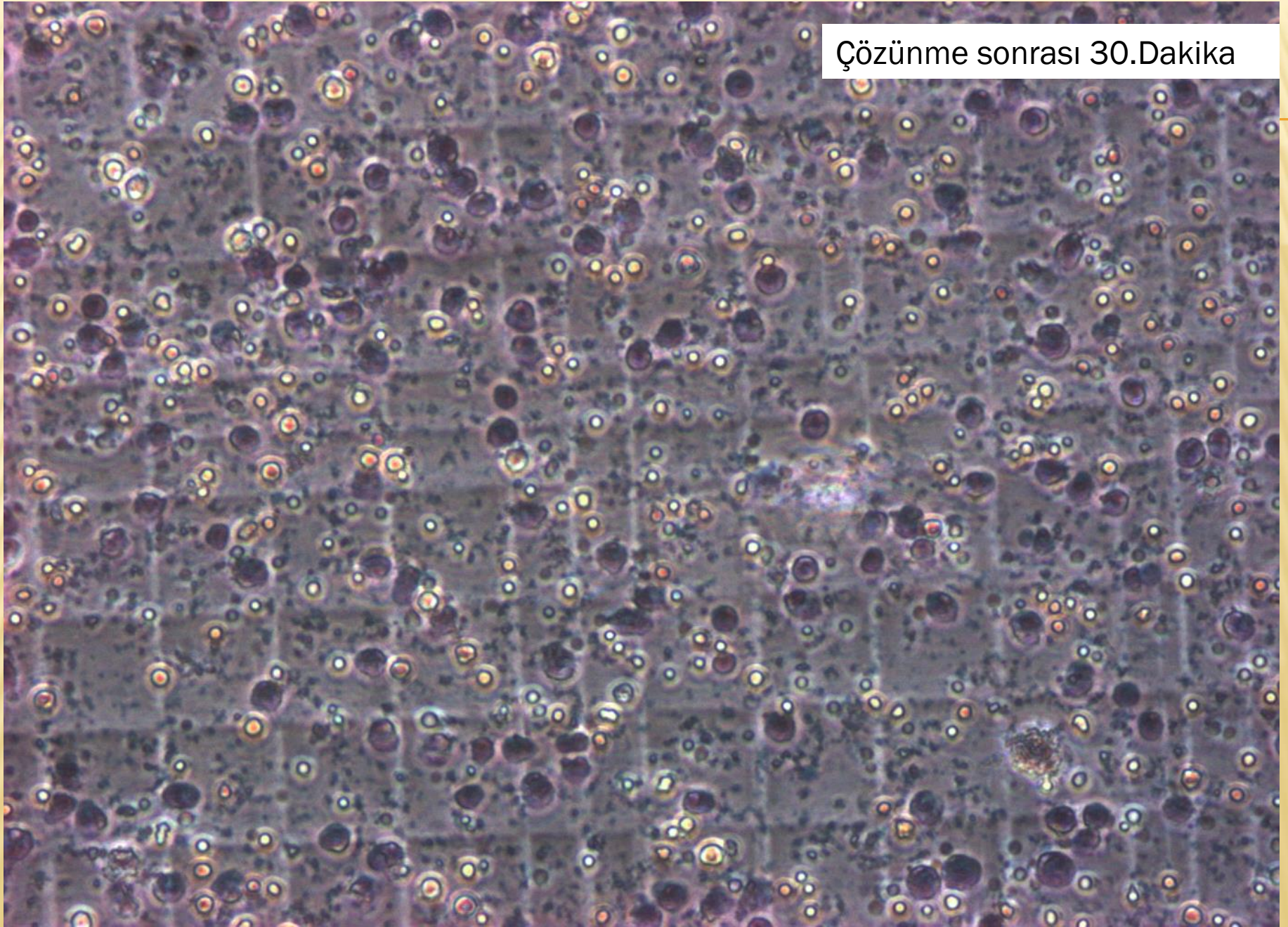
Çözünme sonrası 10.Dakika



Çözünme sonrası 20.Dakika



Çözünme sonrası 30.Dakika



CFU KOLONİ SAYIMININ ÖNEMİ

- Dondurma ve çözme sonrasında hücrelerin hastalara geri verilmesi sırasında meydana gelen kayıpların değerlendirilmesinde en önemli takip kriteri hematopoietik dokunun semi-solid kültür ortamında, CFU-E, BFU-E, CFU-GM , CFU-GEMM koloni oluşturma yetisinin değerlendirilmesidir.
- Hücre saklama ve nakli sırasında koloni oluşturma yetisine sahip öncüllerin karşılaştırılması, dondurarak saklama işleminde meydana gelen kayıplara yansıtacaktır.

CFU KOLONİ SAYIMININ ÖNEMİ

- CFU-GM koloni sayısı ile nötrofil engraftmanı arasında kolerasyon olduğu çalışmalarla gösterilmiştir.
- CFU-GM koloni sayı ile CD34+ hücre sayısı arasında kolerasyon olduğu çalışmalarla gösterilmiştir.
- İşlem öncesi CFU ile işlem sonrası yapılan CFU ilişkisi değerlendirilerek engrafman süresi açısından önemli veriler elde edilebilir.

CFU KOLONİ SAYIMININ ÖNEMİ

- Başarılı bir şekilde yapılan kriyoprezervasyon işleminde çözünen ürünün CFU sayımları, işlem öncesi yapılan sayımdan daha iyi beklenmelidir.

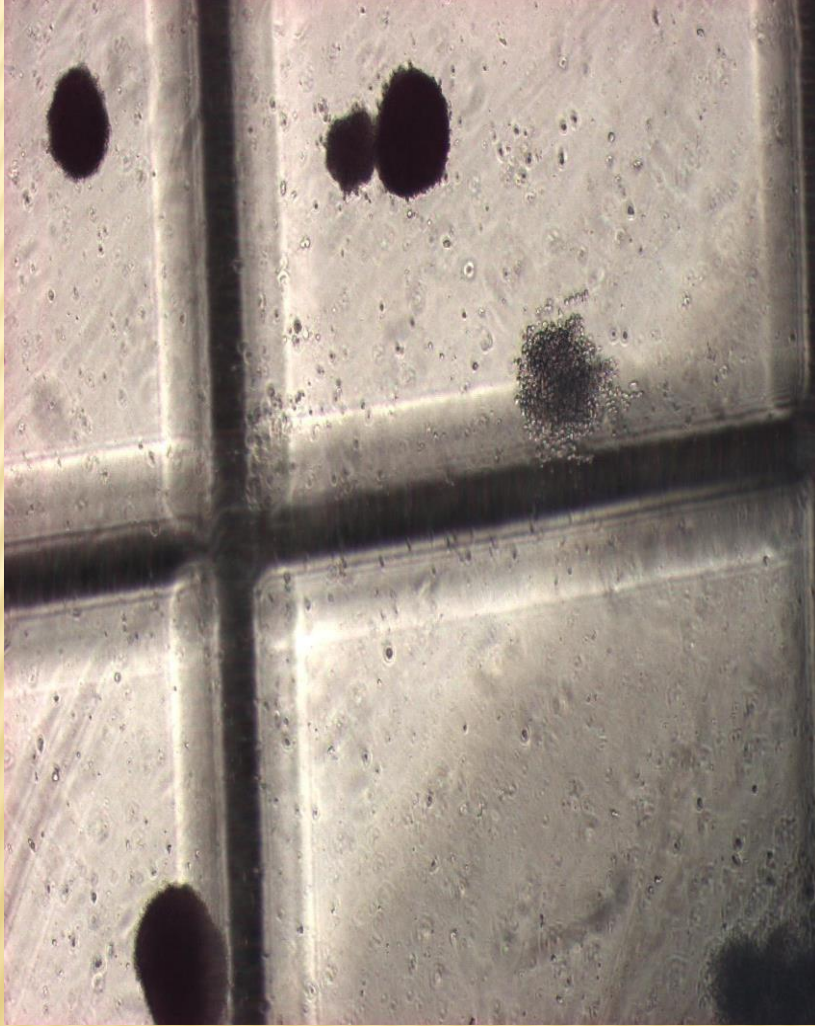
SIRA	ADI SOYADI	NAKİLTARİHİ	VİABİLİTE%	CFU-GM		BFU-E		CFU-E		MİX		ALICI Kg
				TAZE	DONMUŞ	TAZE	DONMUŞ	TAZE	DONMUŞ	TAZE	DONMUŞ	
1	A.D	06.05.2011	97	25,38	22,82	25,52	25,38	0,4	0,22	3,47	2,11	44,6
2	B.B	16.06.2011	98	33,05	82,2	76,22	48,3	0,67	0	3,3	0,1	33
3	E.G	04.08.2011	98	7,29	33,1	12,16	18,14	0,3	0	1,52	0,9	20
4	E.A	03.11.2011	98	2,5	19,03	2,08	6,51	0	2,5	0	1,5	12,9
5	M.K	02.03.2012	95	15,41	44,52	20,71	53,89	0,24	1,4	2,4	2,57	10
6	Y.A	31.05.2012	90	24,49	53,23	25,15	55,4	1,98	1,08	3,97	6,51	27
7	C.A	24.04.2012	90	10,64	10,2	12,52	14,48	0	0,71	0	1,18	21
8	Y.A	26.03.2013	95	29,32	34,35	33,59	38,94	1,83	1,71	5,49	4	14,2
9	M.B	06.12.2013	96	48,1	74,64	41,98	67,17	1,74	0,93	7,87	4,65	18
10	İ.E	14.03.2013	98	44	50,54	52,46	24,33	1,69	0	3,38	2,78	13,6
11	H.Y	07.01.2014	98	42,09	55,4	35,77	55,4	0	0	2,8	3,5	20



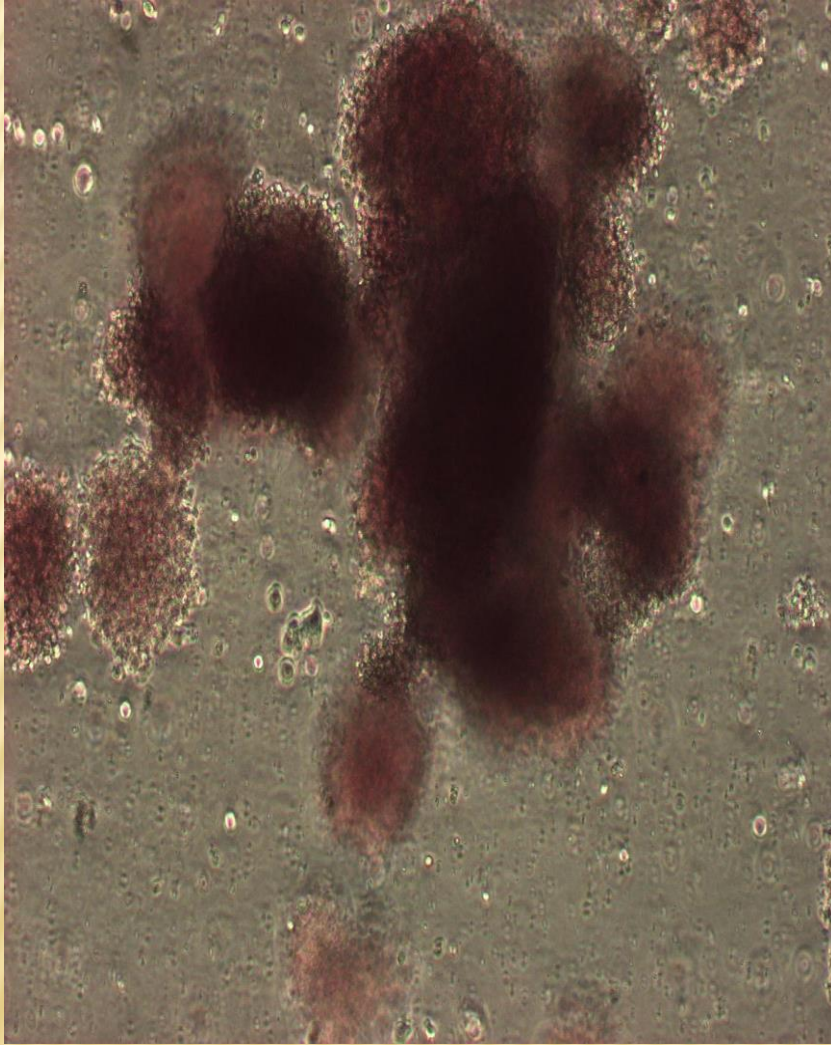
CRYO ÖNCESİ

CRYO SONRASI

KRIYO ÖNCESİ HEMATOPIETİK KOLONİ (CFU) SAYIMI VE GÖRÜNTÜLERİ



ÇÖZÜNME SONRASI HEMATOPOİETİK KOLONİ(CFU) SAYIM VE GÖRÜNTÜLERİ



TEŞEKKÜRLER

