



ANKARA BİKENT ŞEHİR HASTANESİ



KÖK HÜCRE KRİYOPREZERVASYON İŞLEMİ

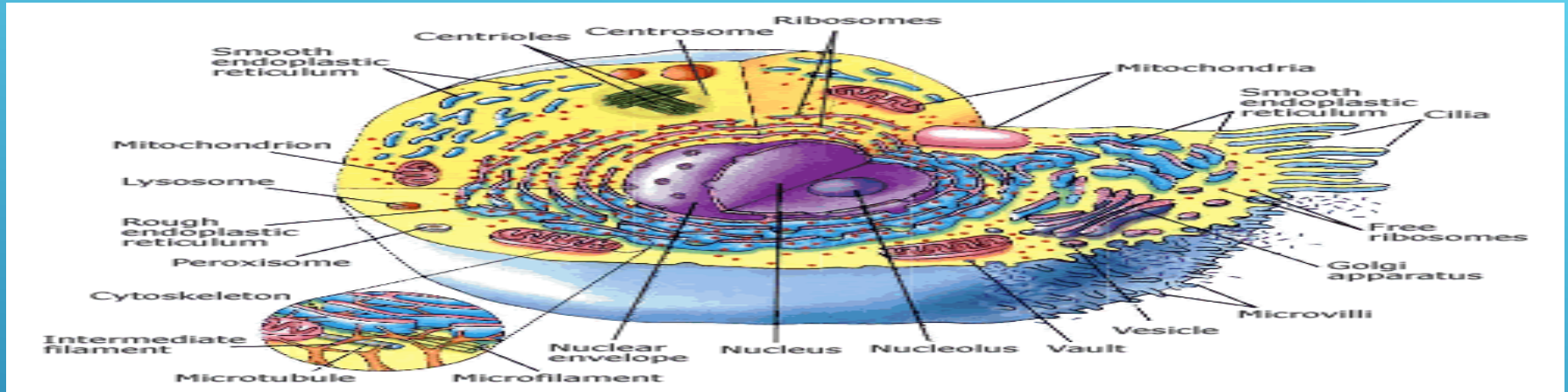
UZ. BİO.YASİN KÖKSAL
ANKARA BİLKENT ŞEHİR HASTANESİ
KÖK HÜCRE LABORATUVARI



KRİYOPREZERVASYON YAPARKEN NEYİ DONDURUYORUZ? DMSO ETKİSİ HES ETKİSİ

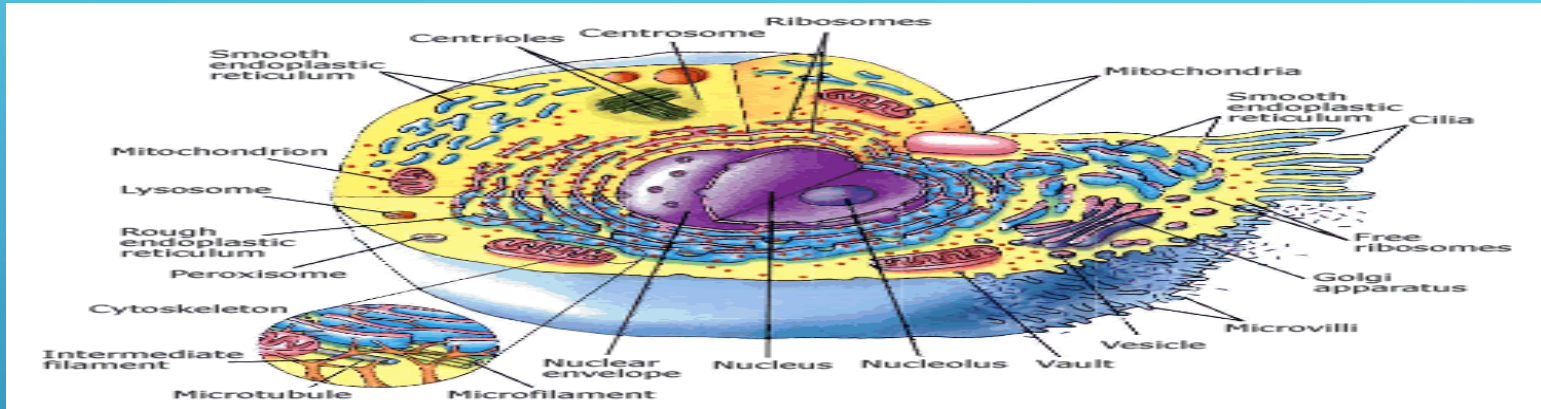


HÜCRE



- ▶ Hücreler 2 ana bölüme ayrılır;
- ▶ - **Sitoplazma** (Gr.kytos, cell, +plasma ,thing formed)
- ▶ - **Nukleus- çekirdek**

SİTOPLAZMA



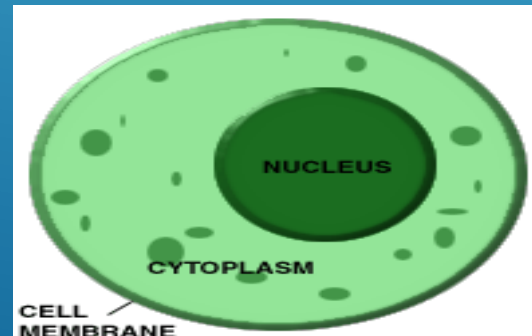
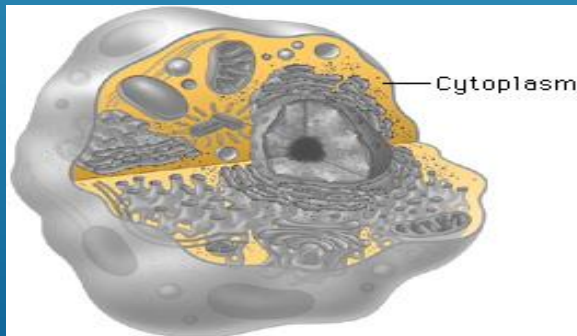
- Genellikle **sitoplazma**, **çekirdek** dışında kalan kısım olarak tarif edilir.
- Sitoplazma **sitoplazmik matriks** ya da **sitosöl** adı verilen sıvı bir jel içerisinde **organeller** ve **inklüzyonlar** içerir.

Clarification of terms

- ***Cytosol*** – the fluid (and suspended molecules of salts, sugars, amino acids, enzymes, etc.) around the organelles
- ***Cytoplasm*** – the cytosol PLUS the organelles suspended within it (i.e., everything EXCEPT the nucleus)

Cell = Plasma membrane + Cytoplasm + Nucleus

Cytosol + Organelles



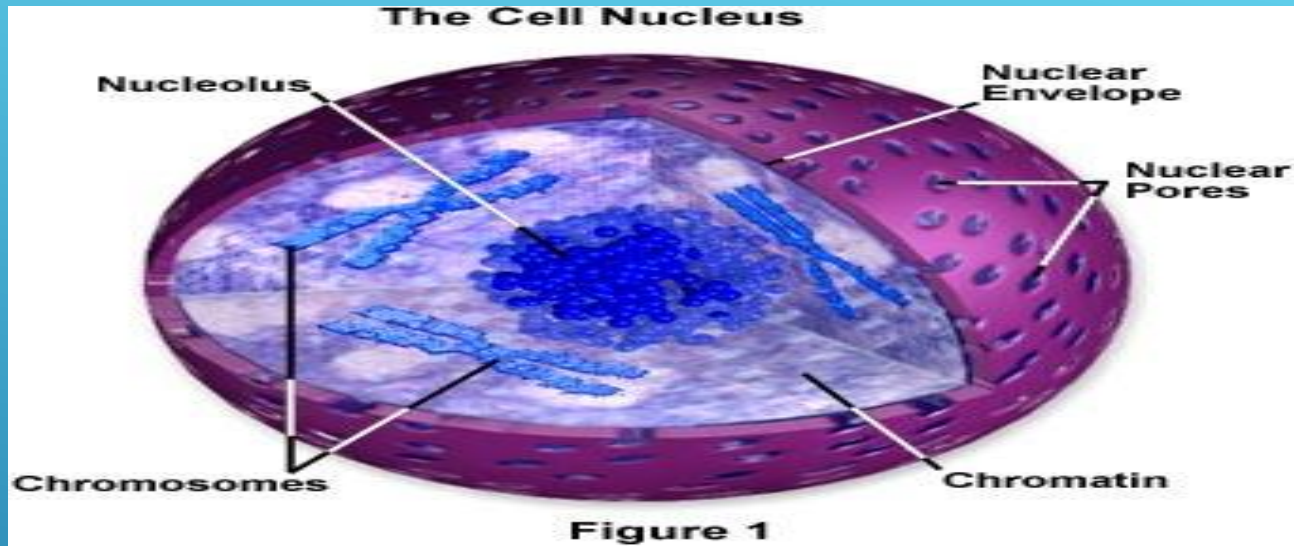
SİTOPLAZMA

- ▶ **Sitoplazmik matriks** içerisinde **organeller, hücre iskeleti elemanları** ve karbonhidrat, lipid ve pigment **birikimleri** gömülü halde bulunur.

Matriks içinde çözünen çeşitli maddeler de bulunur;

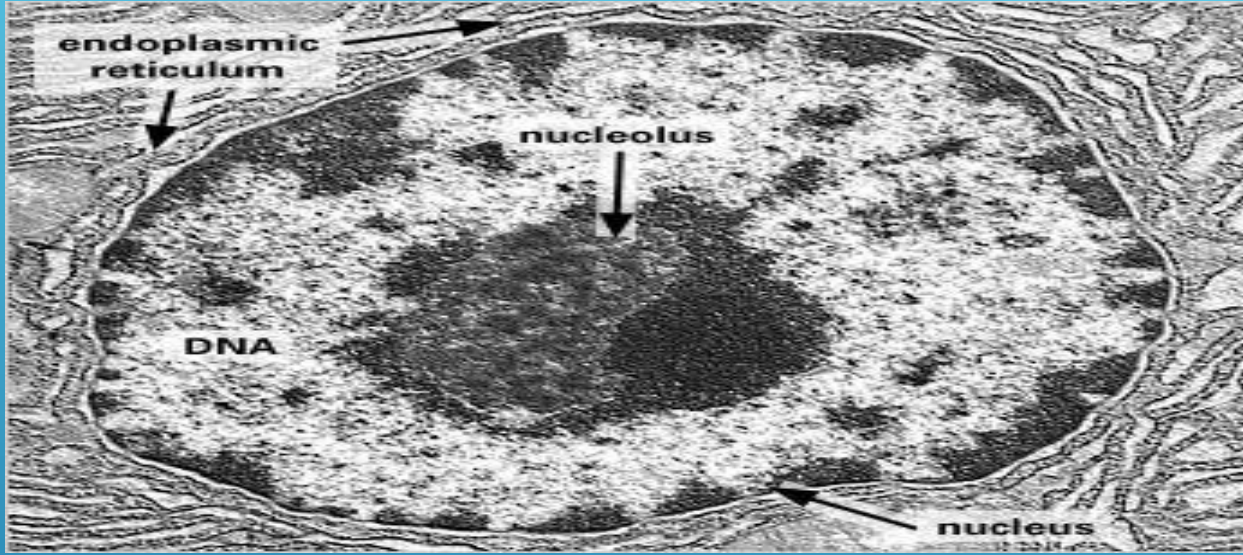
- ▶ -inorganik iyonlar (Na, K, Ca)
- ▶ -organik moleküller (metabolitler, karbonhidratlar, lipidler, proteinler)
- ▶ -ribonukleik asitler (RNAs)

NUKLEUS-ÇEKİRDEK



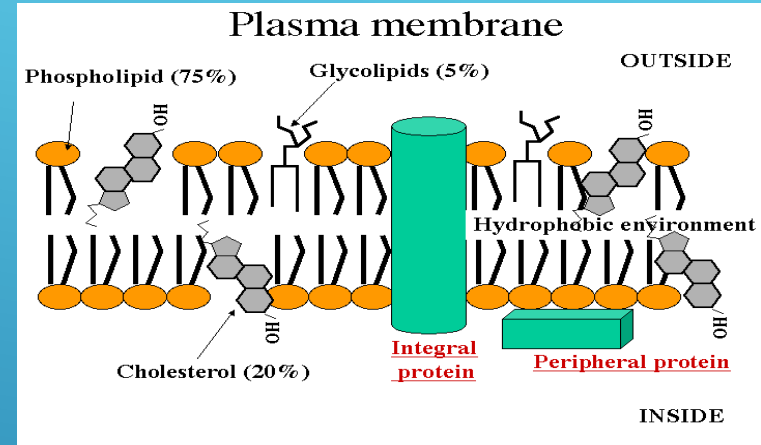
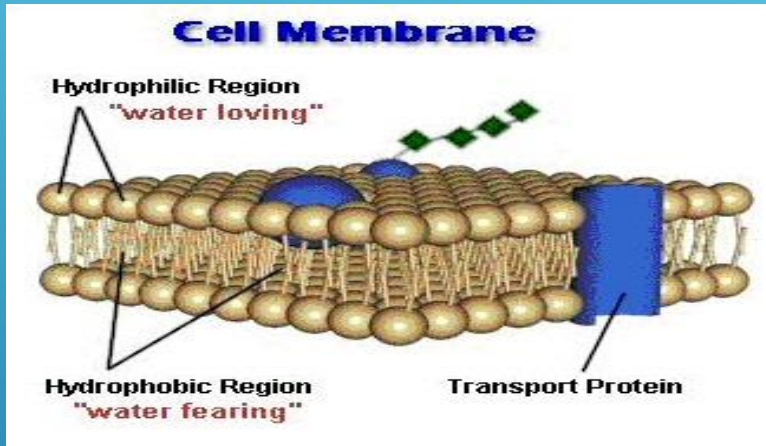
- ▶ **Çekirdek** hücredeki en büyük organelidir.
- ▶ DNA ve RNA replikasyonu ve transkripsiyonu için gerekli **enzimleri** ve **genom** içerir .

NUKLEUS-ÇEKİRDEK



- Sitoplazma ve çekirdek farklı fonksiyonel işlevler görür fakat **hücrenin canlılığını koruyabilmek için birlikte çalışırlar.**

HÜCRE ZARI-PLAZMA MEMBRANI



- Her hücre bir **hücre zarı** ile çevrilidir (aynı zamanda **plazma membranı** veya **plazmalemma** olarak da adlandırılır)

PLAZMA MEMBRANI-FONKSİYONU

- **Plazma membranı fonksiyonu:** Plazma membranı, hücre fonksiyonu ve yaşamı için gerekli olan pek çok fizyolojik ve biyokimyasal aktivitede aktif rol alan dinamik bir yapıdır.

1-Hücrenin yapısal bütünlüğünü korumak

2-Hücreye madde girişini ve çıkışını kontrol etmek (selektif permeabilite-seçici geçirgenlik)

3-Hücre-hücre etkileşimini sağlamak

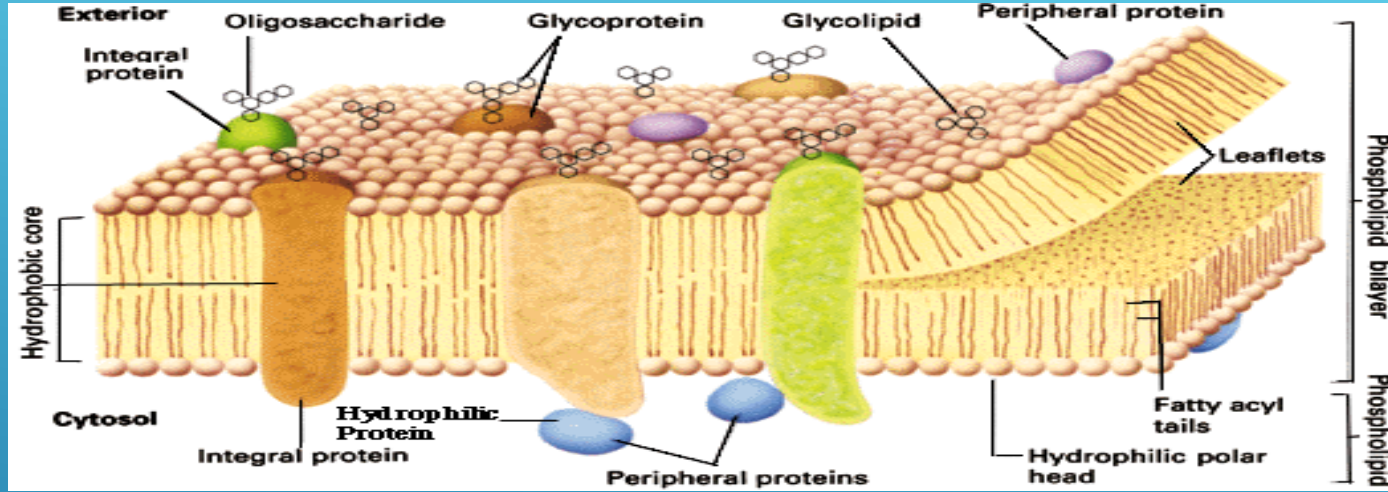
4-Reseptörler aracılığıyla antijen ve yabancı hücrelerin tanınmasını (bir dizi özel tanıma ve düzenleyici fonksiyonu vardır) sağlamak

5-Sitoplazma ve ekstrasellüler sıvı arası dengeyi sağlamak

6-Spesifik moleküller için taşıma sistemi oluşturmak

7- Ekstrasellüler fiziksel veya kimyasal sinyalleri intrasellüler olaylara çevirmek.

PLAZMA MEMBRANI-YAPISI

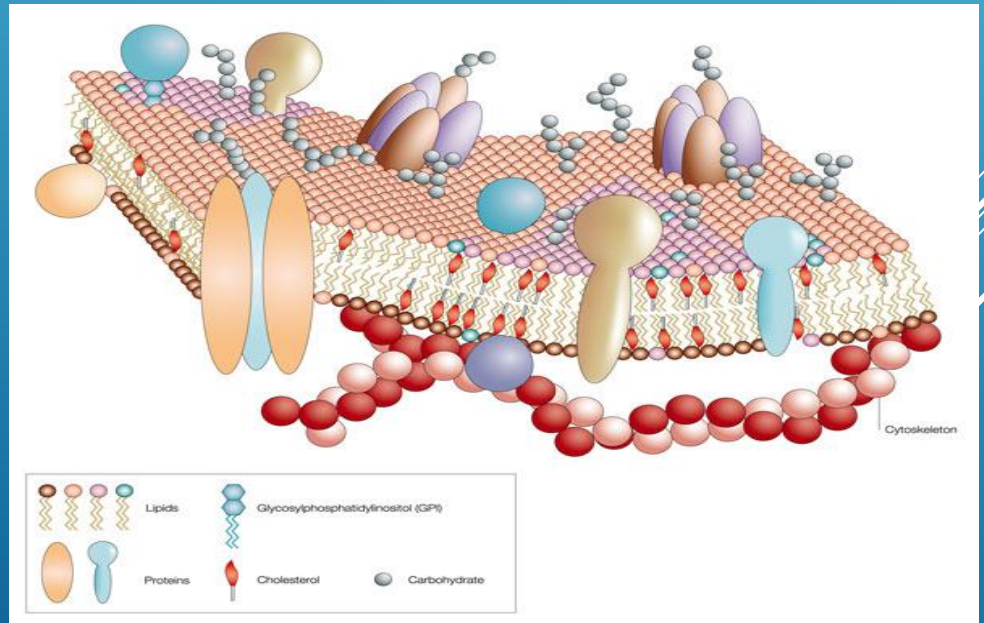


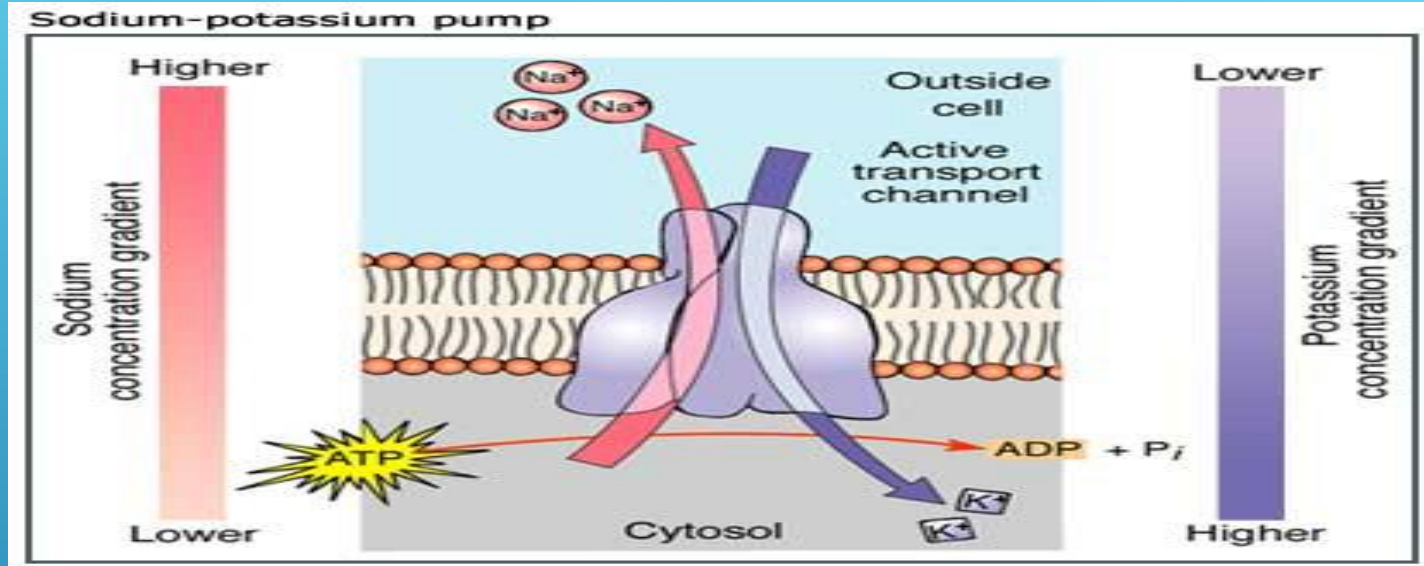
- İç kısımdaki (sitoplazmik) yoğun çizgi **iç yaprak**, dış yoğun çizgi **dış yaprak** olarak adlandırılır.

PLAZMA MEMBRANI-YAPISI

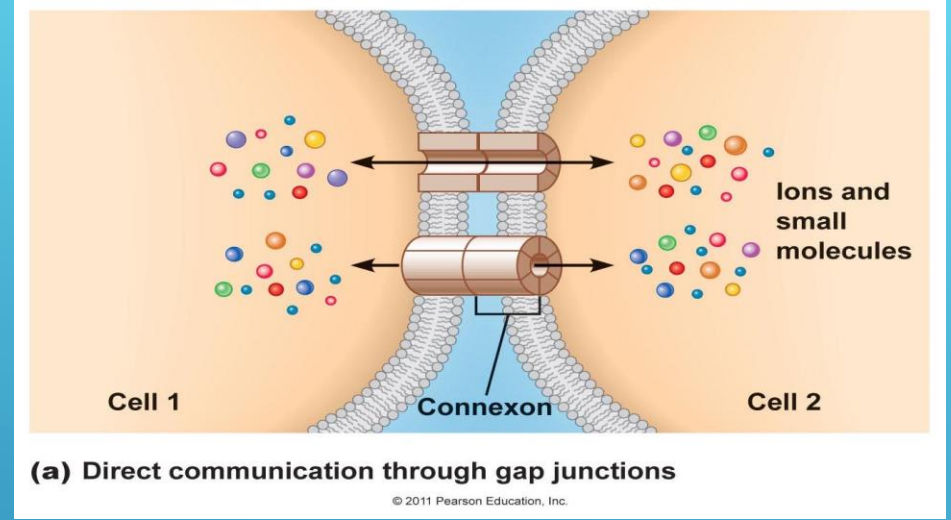
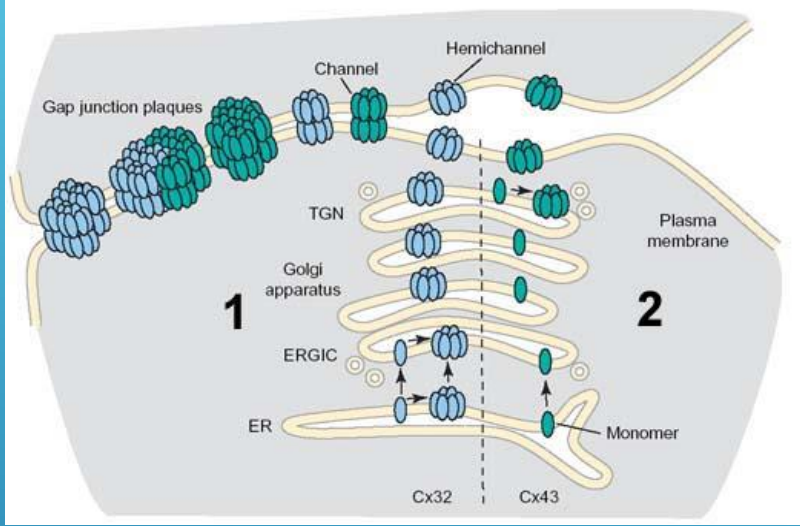
Membranın moleküler kompozisyonu

- ▶ **Fosfolipidler**
- ▶ **Kolesterol** ve
- ▶ **Protein** molekülleri
- ▶ Fonksiyonlarına göre membran proteinleri 6 kategoriye ayrılır:
- ▶ 1-Pompalar
- ▶ 2-Kanallar
- ▶ 3-Reseptörler
- ▶ 4-Bağlayıcılar
- ▶ 5-Enzimler
- ▶ 6-Yapısal proteinler





- **Pompalar:** Bazı iyonların transportuna yardımcı olur. Örneğin Na^+ gibi, iyonların membranı aktif geçişinde ve bazı makromoleküllerin metabolik prekürsörlerinin membranı geçişinde rol alır.



- **Kanallar:** Plazma membranından küçük iyonların, molekülün ve suyun her iki yönde geçişini sağlarlar. (**pasif difüzyon**) (**Gap junctions**)

HÜCRELERİN SAKLANMASI

- Genel olarak 0°C 'nin üzerinde hücrelerin saklanması yeterli olmamaktadır.
- Isı -79°C 'nin altına inmedikçe metabolik saatin durdurulması imkansızdır.
- $0-20^{\circ}\text{C}$ 'de **Na-K pompası bozulmakta** ve hücreler şişmeye başlamaktadır. Enzim aktiveleri bozulmakta ve az çözünen materyallerin **presipite** olması nedeniyle pH değişiklikleri oluşmaya başlamakta ve tüm bunlar 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.

AMAÇ

- Kemik iliği yada çevre kanından elde edilen “canlı” pluripotent HKH’lerin 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 farklı yöntemler olmakla birlikte, bu konular ile ilgili hala tartışmalar bulunmaktadır.

SOLÜSYON ETKİLERİ

- Serum fizyolojik yavaş yavaş soğutulmaya başladığında, ekstrasellüler alanda ilk buz çekirdeği oluşmakta ve soğuma devam ettikçe yeni su kütleleri kristalizasyona katılmaktadır.
- Bu arada tuz molekülleri ise hala sıvı fazdadır.
- Başlangıçta 0.15M olan NaCl konsantrasyonu suyun kristallemeye başladığı dönemlerde 5.2M kadar yükselmekte ve konsantrasyon, ısı tekrar 21.1°C 'nin üstüne çıkana kadar bu değerlerde kalmaktadır.

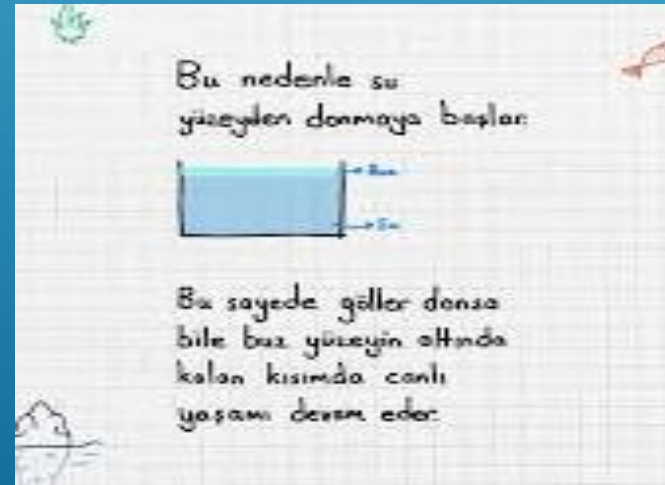
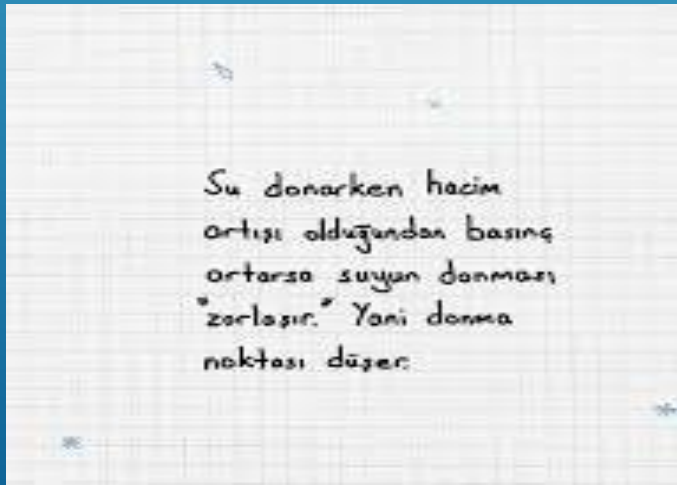
TERMAL ŐOK

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



SOLÜSYON ETKİLERİ

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



ÇÖZÜM

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

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
- 

GÖREVLERİ ;

- 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 KRIYOPROTEKTANLAR

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

GÖREVLERİ ;

- 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

- Intrasellüler ve ekstrasellüler kryoprotektanların beraber kullanımını 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'e göre daha iyi olduğu rapor edilmiştir.

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.

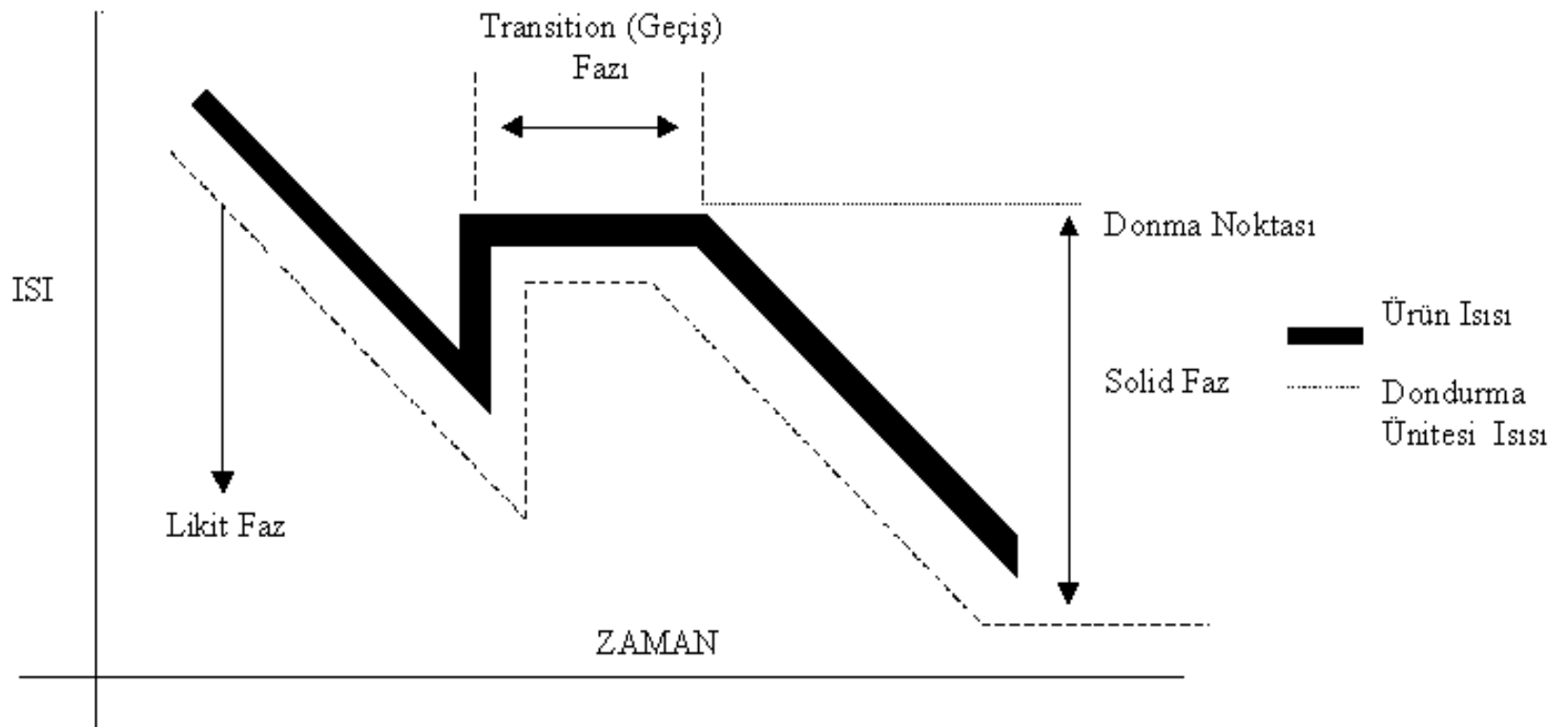
HÜCRE KAYBI

- Dondurma işlemi sırasında hücre kaybının en önemli nedeni buz kristal formasyonudur. Bu hasar iki ayrı alt grupta değerlendirilebilir.
- Hızlı soğutmalarda(>10C/dak) intreselüler buz kristalleri oluşmakta ve hücrenin mekanik olarak parçalanmasına ve hızlı hücre ölümüne neden olmaktadır.
- Daha yavaş(<10C/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.
- 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 soğutma hızını arttırmaktır.

GEÇİŞ FAZI



GEÇİŞ FAZI

- Geçiş fazı (Donma) sonrası soğutma ısısı
- Bu dönemde olan soğutmanın dakikada 5-25°C arasında olması önerilmektedir.
- -80°C'ye ulaşıldıktan sonra ürün daha düşük ısılara, örneğin sıvı azot buhar fazı veya sıvı faz içine direkt olarak kaldırılabilir.

SAKLAMA-DEPOLAMA

- Bu döneme kadar ürün kayıpsız hazırlanmış ise bundan sonra hücresel bir hasar oluşması -80°C 'nin üzerinde beklenmez.
 - Kritik değer olan -79°C 'nin altında saklanması halinde 5 sene kadar ürünün saklanabileceği rapor edilmektedir.
- 
- A series of white diagonal lines of varying lengths and thicknesses, located in the bottom right corner of the slide, creating a modern, abstract graphic element.

DONDURULMUŞ HÜCRELERİN ÇÖZÜLMESİ

- Hücreler çözülürken 3 önemli sorun;
- 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.

ÇÖZÜM

- 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; $<5 \times 10^7/\text{ml}$

KRYOPROTEKTİF AJAN KULLANIMI

- Tek başına kullanıldığında en ideal ajan DMSO.
- %5-10 oranında DMSO etkin koruma sağlamaktadır.
- DMSO toksitesinin azaltılması için, DMSO direk hücre süspansiyonu üzerine konmamalı.
- Ayrıca buz kalıbı veya masa üstü soğutucu kullanılmalı.

YARDIMCI KRYOPROTEKTANLAR

- HES
- Otolog plazma: %10-20 (albümin%1-3)
- Ayrıca son yıllarda trehalose, taurin gibi membran stabilizatörlerinin, ascorbic asit, alfa tocopherol acetat ve catalase gibi antioksidanların kryoprotektif solüsyonlara ilavesi ile daha iyi sonuçlar alınabileceği rapor edilmektedir(özellikle trehalose ve catalase kombinasyonu)

SOĞUTMA İŞLEMİ

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







KULLANILAN TORBALAR

- 750 ml torbalar
80-190 ml
 - 500 ml torbalar
55-100 ml
 - 250 ml torbalar
30-70 ml
- 
- A series of white diagonal lines of varying lengths and thicknesses, located in the bottom right corner of the slide.

SOĞUTMA İŞLEMİ

- Programlı-otomatize yöntem:
- Bu yöntemde ürün 4°Cye 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 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

- Dondurma işlemi sırasında kullanılan torbaların polyolefin, teflon-kapton veya pür teflon olması ürün kalitesini etkilemektedir.
- Dondurma işlemi sırasında test için polyetilen kryotüplere örnek alınmasının (ürün canlılığını, CFU-GM test etmek için) yapılan işlem başarısı açısından büyük öneme sahiptir.

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, psoudomonas, HBV, HCV gibi ajanların bulaşabildiği gözlemlendi.
- Ürünler azot fazında saklanmaya çalışılsada tankın alt kısmında bulunan sıvı kısım bazen üst seviyelere çıkarak enfeksiyon bulaşmasını kolaylaştırır. Bu aynı zamanda ısı değişimlerine neden olur.

SAKLAMA

- -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.
- Mekanik sistemlerin dezavantajı elektrikli gibi bazı arızalara sıklıkla maruz kalabilmeleridir.

ÇÖZME-ERİTME

- Çözme hızlı yapılmalıdır.
- İçi %90 etil alkol ile yıkanmış su banyosuna steril su konduktan sonra 38-40°C kadar su ısıtılır.
- Bir miktar azot içeren kap ile transfer edilen ürün torbaları su banyosu içinde yumuşak masaj hareketleri ile tamamen eritilir.
- Sonra ürün torbasının dışı dezenfekten sıvılar ile silinip kurulanır ve infüze edilir.



ÇÖZÜNEN ÜRÜNÜN YIKANMASI

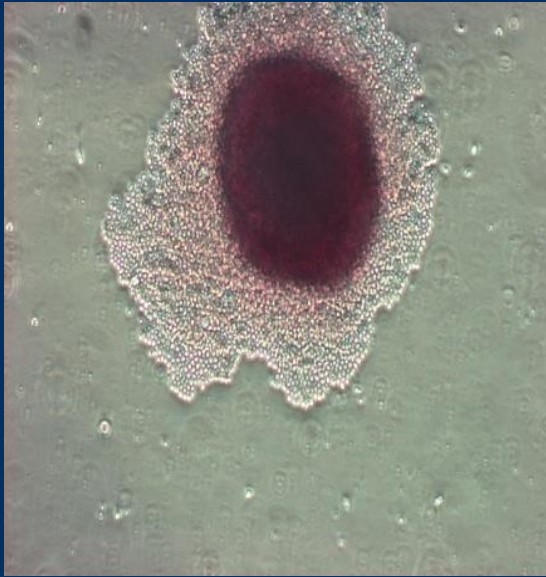
- Çözünen üründen DMSO uzaklaştırmak için sadece santrifüj etmek yeterli değildir. Çözünen ürün kısa sürede infüze edilmelidir.
- Yıkama işlemi için DMSO etkisini ortadan kaldıracak yıkama solusyonları kullanmak gerekmektedir. PBS (Fosfat buffer salin) ile dilüe edilmiş plazma ile yıkama işlemi yapmak gerekmektedir. Gerekirse düşük santrifüj hızıyla 1. yıkama işlemi ve elde edilen atıkla daha hızlı santrifüj hızıyla 2. yıkama işlemi yapılmalıdır.

- Çözünen üründen sayım örneği gönderilecekse kesinlikle ürün yıkanarak flow'a gönderilmelidir.
- Yıkama işlemi yapılmaza flowda inkubasyon süresinde hücre kaybı çok yüksek olacaktır.
- Örneğin yıkanması için (4ml PBS+1 ml plazma) yıkama solusyonu hazırlanmalı ürün miktarı kadar yıkama solusyonu eklenerek 2000 rpm de 15 dak santrifüj edilerek eklenen ürün miktarı kadar süpernatant kısım atılmalı ve hücre hesaplaması yaparken kriyoprotektan eklenmiş hali ile hesaplanmalı.

ÇÖZÜNEN ÜRÜNDEN CD 34 SAYIMI YAPILMASI

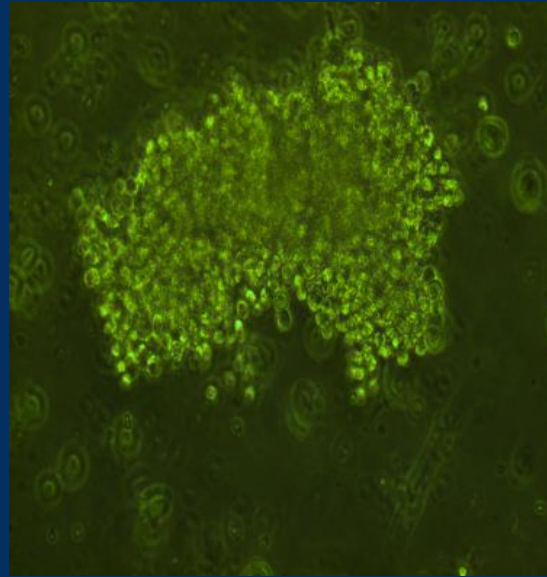
OTOLOG PERİFERİK KÖK HÜCRE

[illegible]



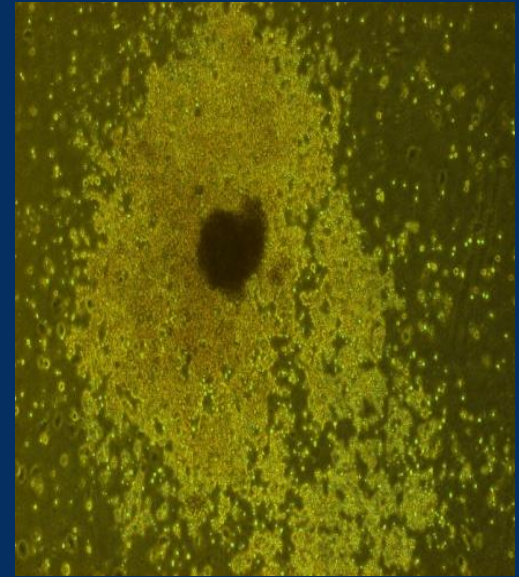
BFU-E

**(BURST FORMING UNIT
ERYTHROID**



CFU-GM

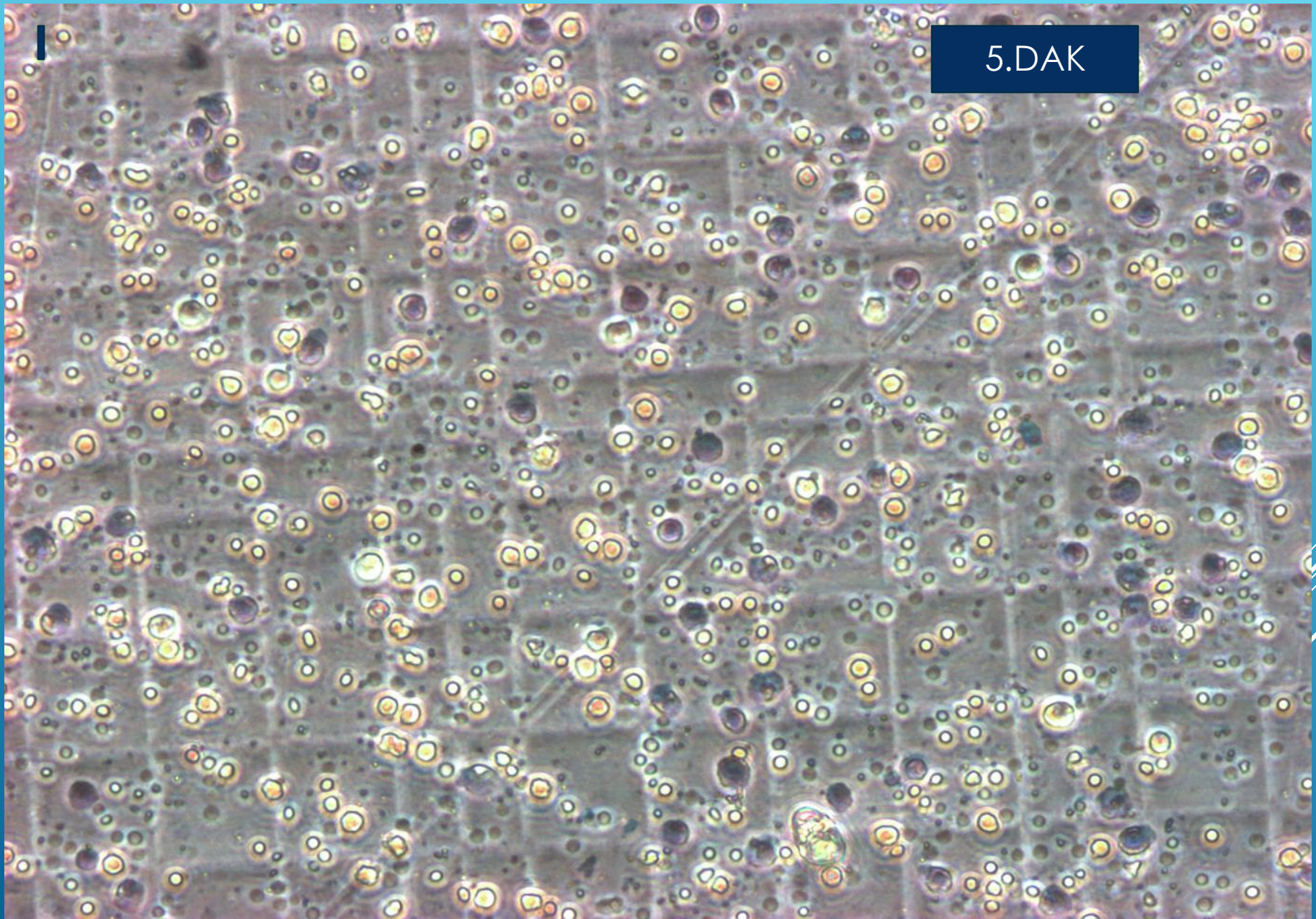
**(COLONY-FORMING UNIT
GRANULOCYTE)**



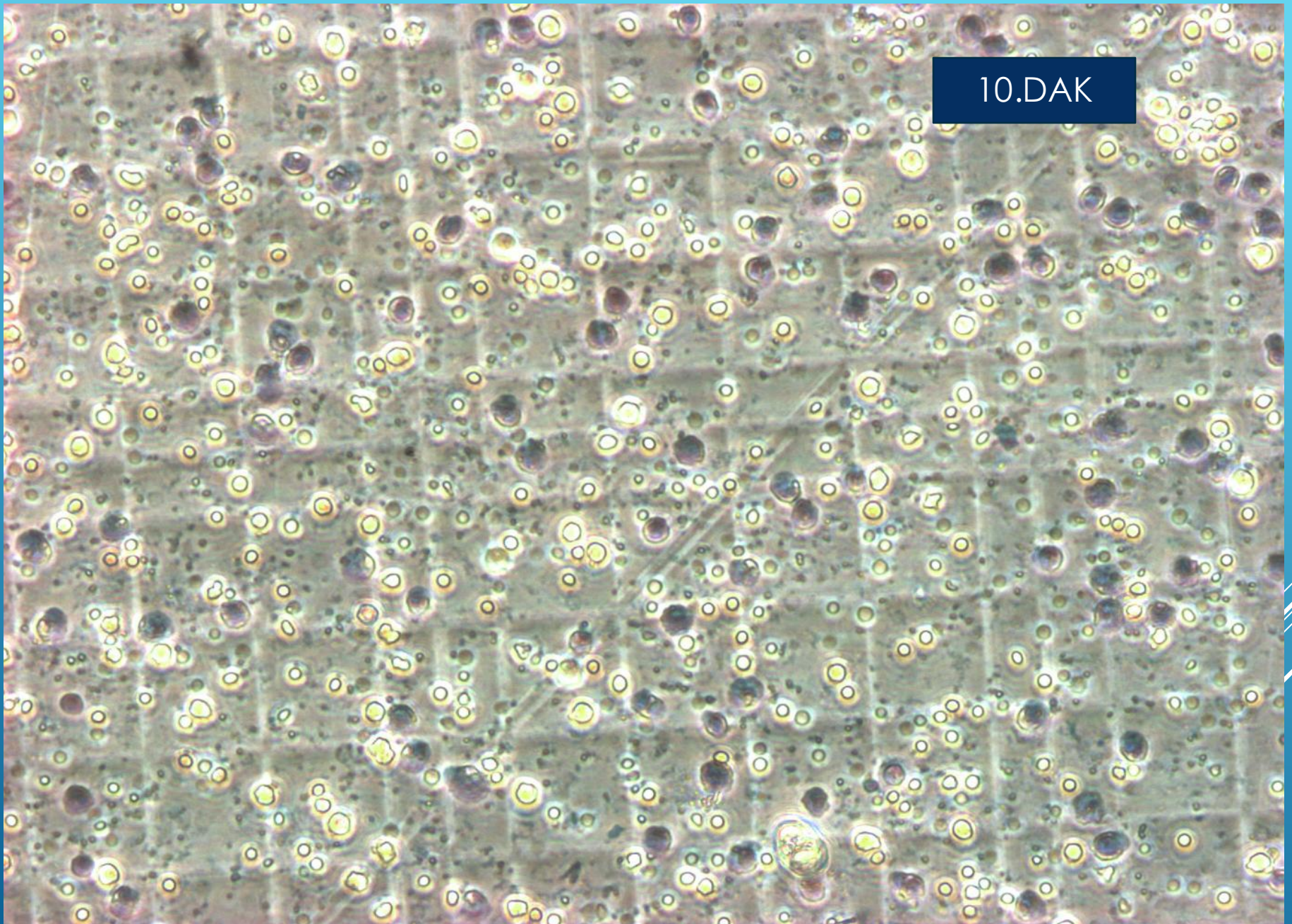
CFU-GEMM

**(COLONY FORMING UNIT
ERYTHROID GRANULOCYTE
MACROPHAGE)**

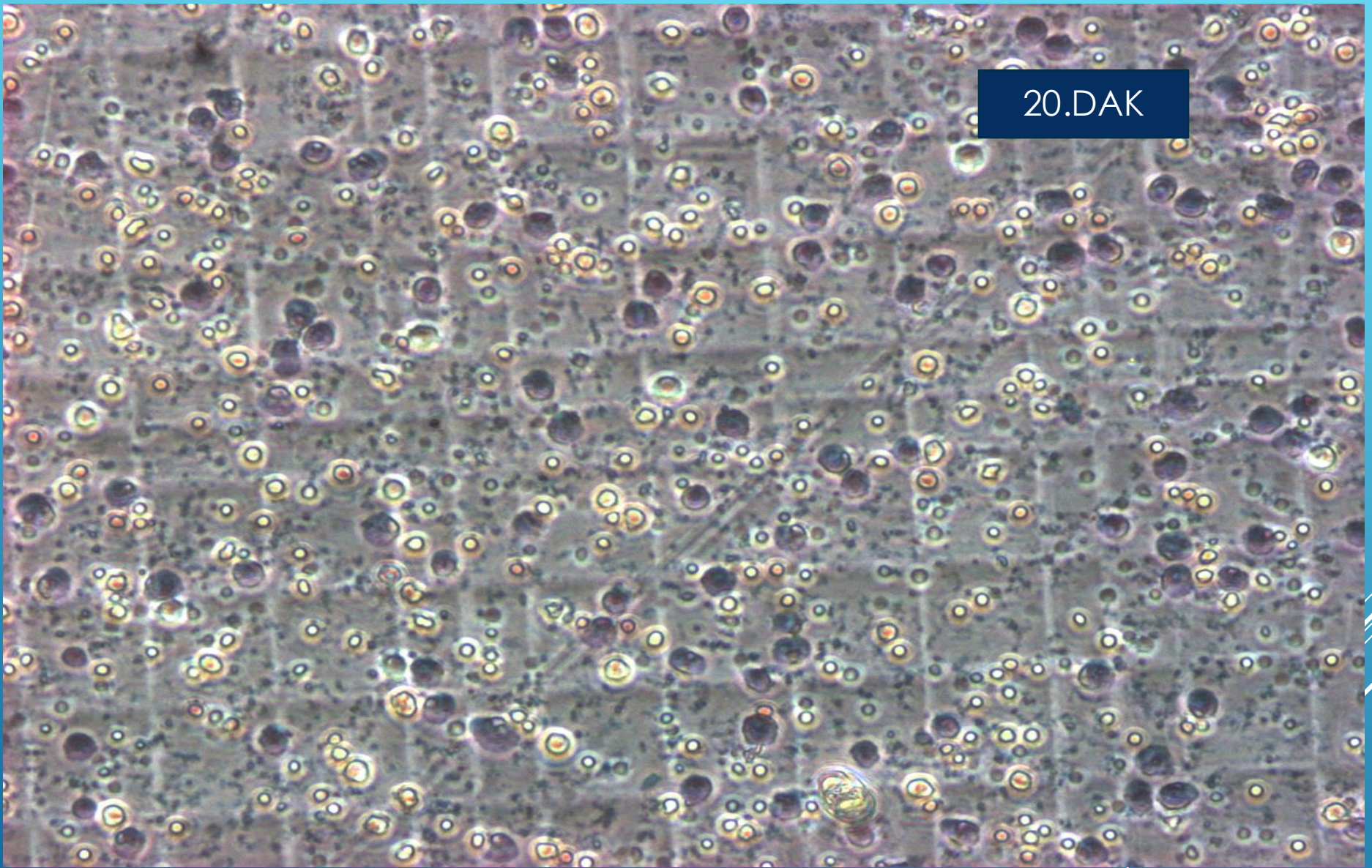
5.DAK



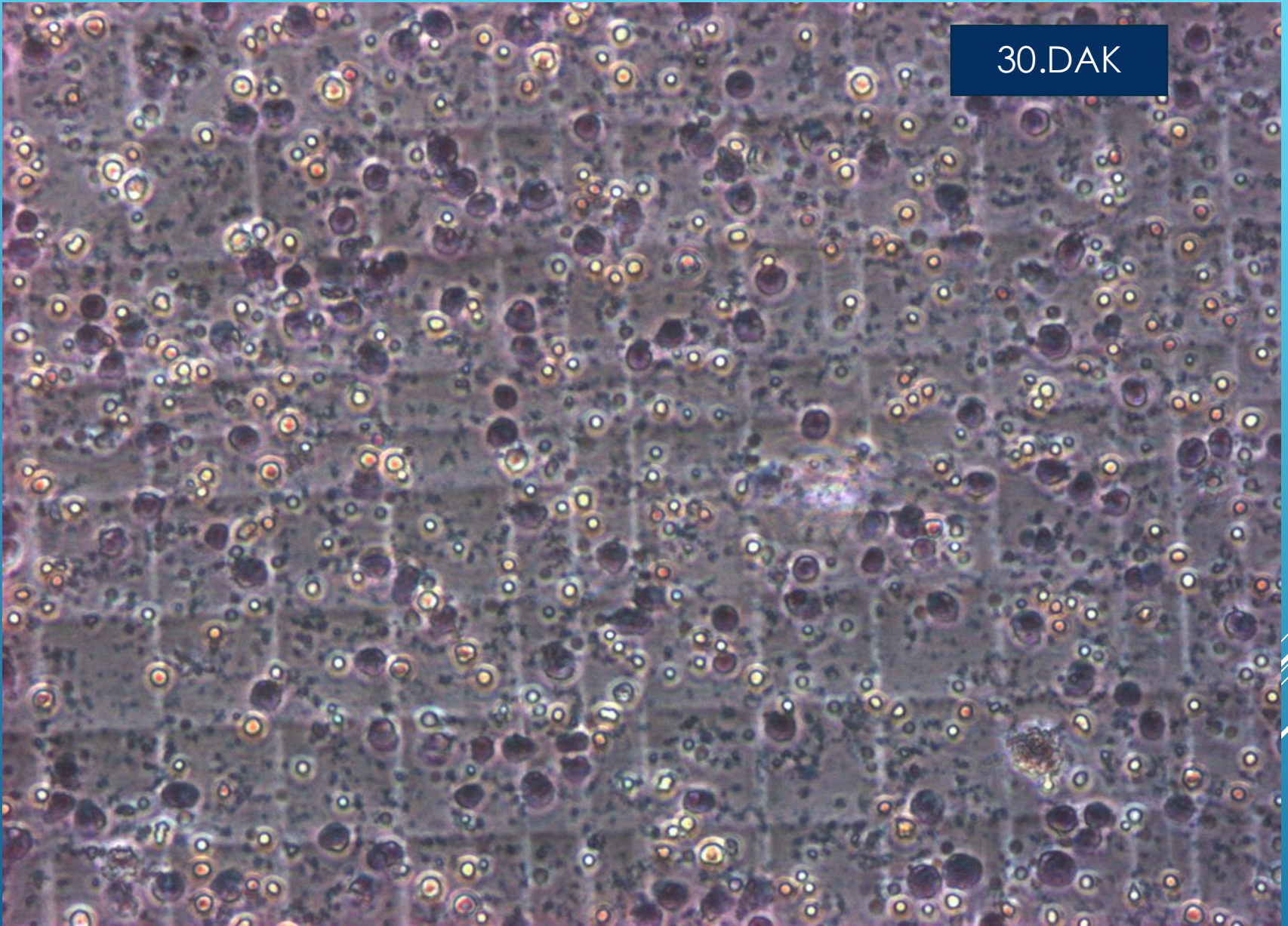
10.DAK

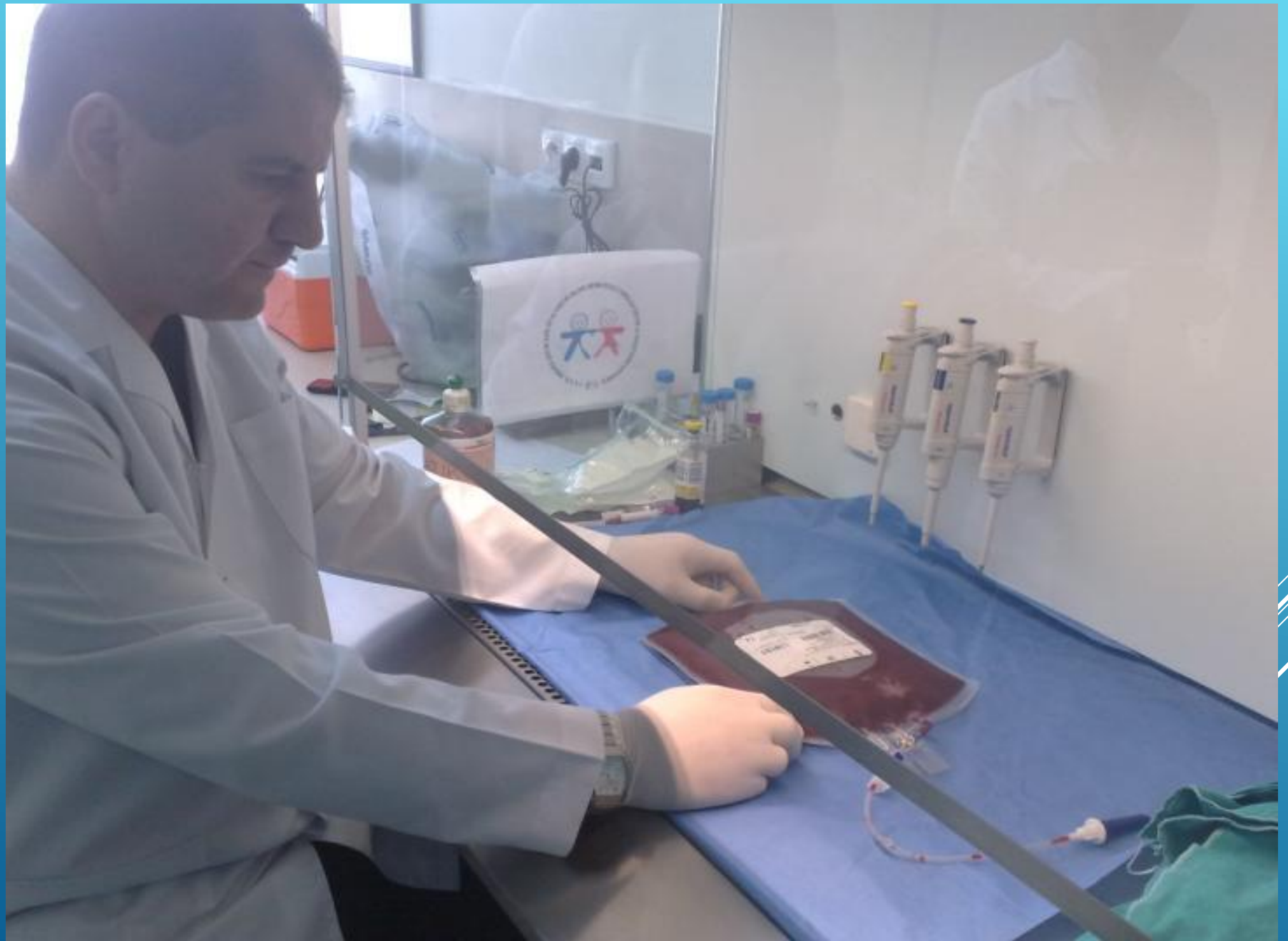


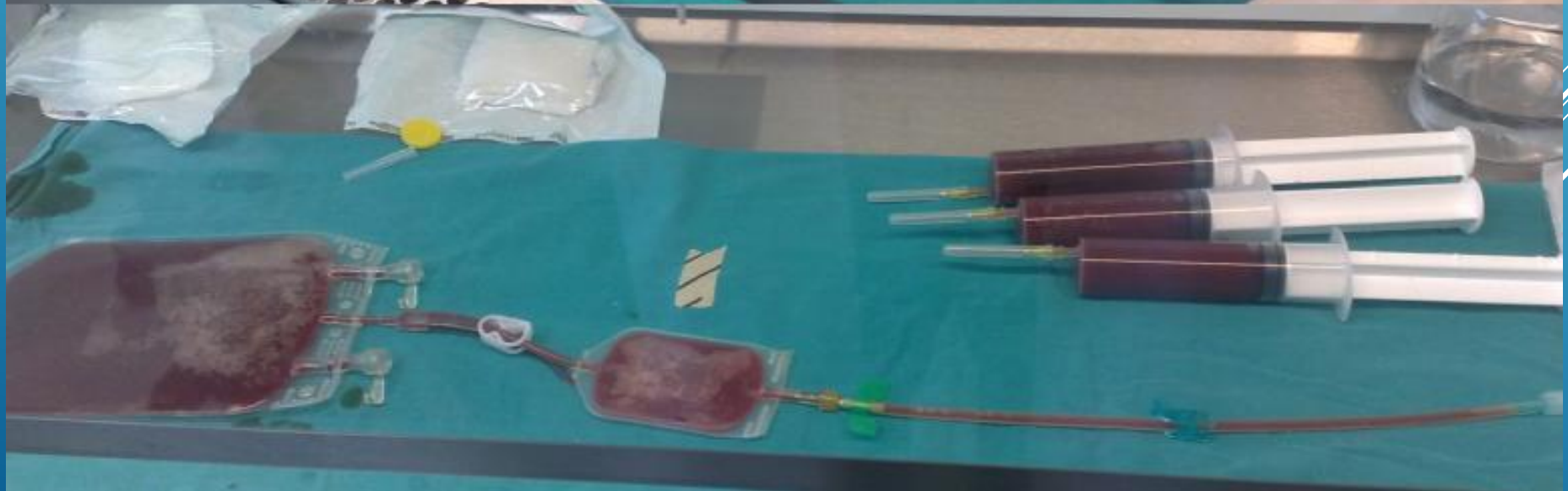
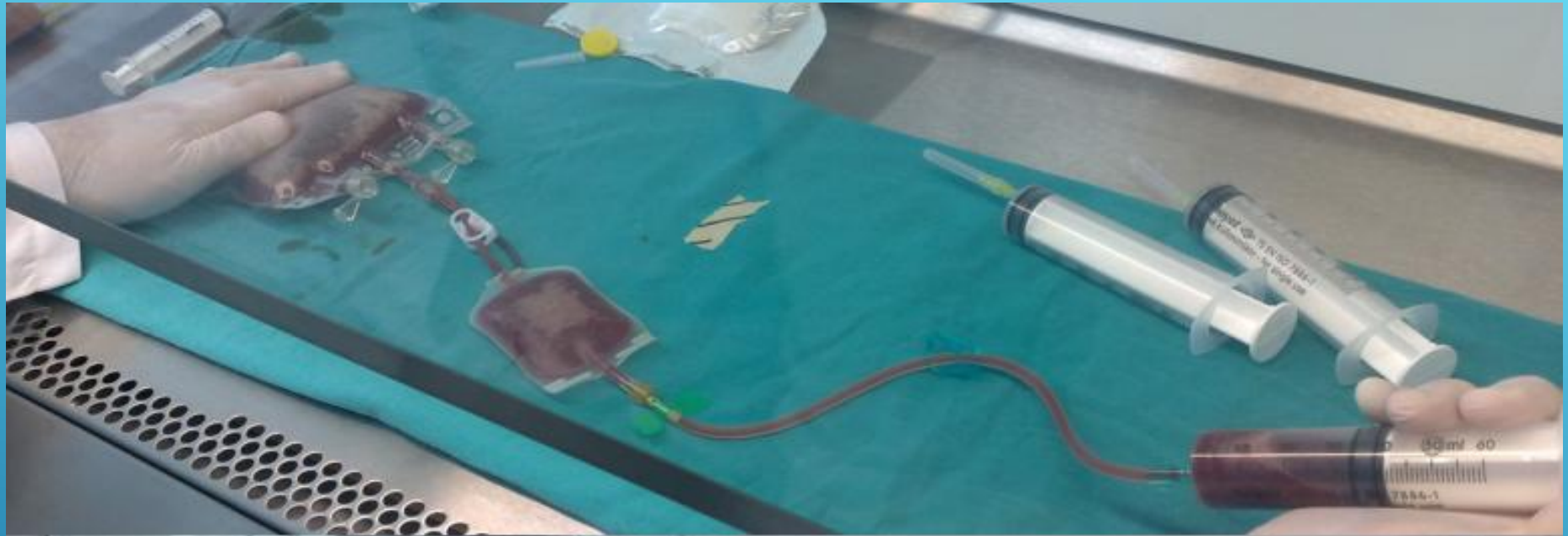
20.DAK



30.DAK







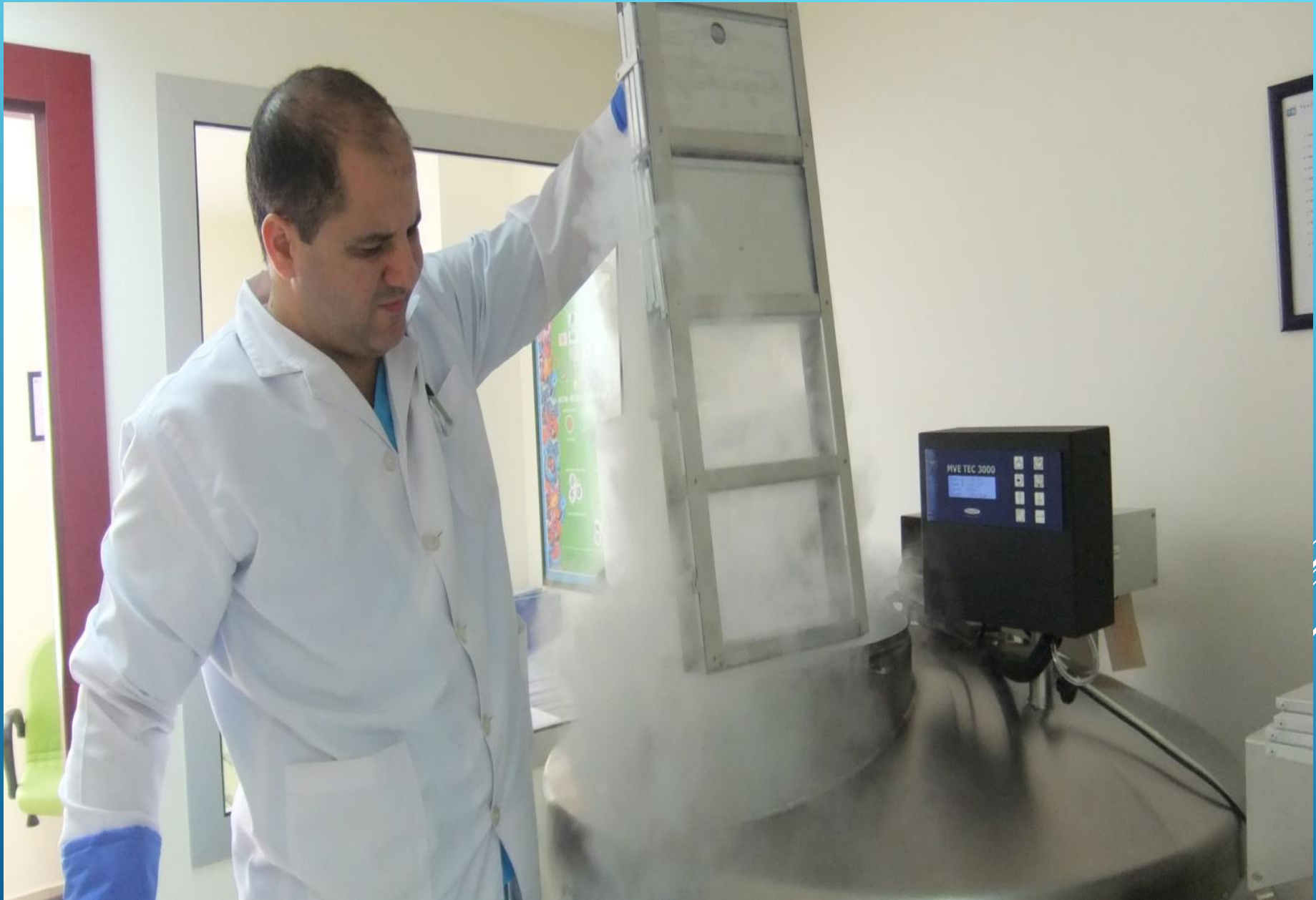














KÖK HÜCRE TRANSFERİNİ NASIL YAPABİLİRİM?

- 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 İşleme ve
Saklama Laboratuvarı



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

TEŞEKKÜRLER

