

Kriyoprezervasyon ve Kök Hücre Bankacılığı



Dr. Zehra Narlı Özdemir
Prof. Dr. Osman İLHAN

Kriyoprezervasyon

- ▶ Kriyoprezervasyon “donmuş halde saklamak” anlamına gelen bir işlemler sürecidir.
- ▶ Ultra düşük ısılarda hücre, doku veya organların saklanması için kullanılır.
 - Derin dondurucularda -80°C ısıda
 - Buhar fazındaki azotta -150°C ısıda
 - Sıvı fazındaki azotta -196°C ısıda

Kriyoprezervasyon

- ▶ Dondurulan materyal böylesi düşük ısılarda “mutlak sessizlik” fazına girer, tüm fiziksel ve biyokimyasal reaksiyonlar durur.
- ▶ Kriyoprezervasyon işlemi, yapısal olarak canlı olan hücre veya dokuların düşük maliyetle uzun süre saklanmasını sağlar.

Kriyoprezervasyon basamakları

Materyal seçimi



Kriyoprotektan eklenmesi



Dondurma



Sıvı azotta saklama



Çözürme



Yıkama ve yeniden kültüre koyma



Canlılığı değerlendirme

Kriyoprotektan maddeler

Hücre içinde buz kristalleri oluşumunu engelleyerek kriyodestruksiyonu en aza indirirler.

Hematoloji pratiğinde kriyoprezervasyonun yeri

- ▶ Ülkemizde 2019 yılında toplam 5200 hastaya kök hücre nakli yapıldı.
 - 2600 tanesi otolog kök hücre nakli (OKHN)
- ▶ OKHN' de temel prensip tedavinin belli bir aşamasında kişinin kendi hücrelerinin aferez yöntemi ile toplanıp, dondurularak saklanmasıdır.
- ▶ Hastalara hazırlama rejiminin ardından, kendi hücreleri çözündürülerek infüzyon yapılır. (Nakil işlemi)
- ▶ Ayrıca hastanın uygun/gönüllü vericisinden toplanan hücreler hasta ve/veya ünite nakile uygun olmadığında dondurulup saklanmak zorunda kalmaktadır.

Mobilizasyon,
CD34+
hematopoietik kök
hücrelerin kemik
iliğinden çevre
kanına doğru
hareketlendirilmes
idir.

Çevre
kanından
CD34+ kök
hücreler
toplanır.

Elde
edilen
ürünün
işlenmesi

Elde
edilen
ürünün
işlenmesi

Aferez
işlemi
sonrası
ürünün
dondurulm
a öncesi
paketlenm
esi



**Kriyoprotek
tan DMSO
eklenmesi**

**Azot
tankı
öncesi
programlı
dondurma
işlemi**



DMSO TOKSİSİTE Sİ



DMSO TOKSİSİTE Sİ



ALINAN TEDBİRLE R



DMSO YAN ETKİLERİ



**ÜRÜNDEKİ
DMSO**

- Bradikardi
- Kalp blokları
- Baş ağrısı
- Ensefolopati
- Senkop
- Nöbet geçirme
- İdrar kaçırma
- Böbrek yetmezliği

Dondurulmuş hücre ile yapılan nakillerde bu yan etkiler yönünden iyi takip yapılmalıdır

**DMSO
YAN
ETKİLERİ**



DMSO TOKSİSİTE Sİ

**NAKİL
GÜNÜ
HÜCRELERİ
N
ERİTİLMESİ**

DMSO-free kriyoprezervasyondan beklenenler

- ▶ Toksisitenin olmaması yada çok daha az olması
- ▶ Canlılık-viabilite oranının daha yüksek olması
- ▶ Dondurulan ürünün paketlenme hacminin daha az olması
 - Kalp yetmezliği dahil ciddi hacim-sıvı yüklenmesi sorunu yaşanabiliyor
- ▶ Kök hücrelerin kendini yenileme-bölünebilme kapasitesi dahil, canlılığı çok daha uzun yıllar boyunca koruyabilmek
 - >10 yıl



DMSO-free kriyo statejileri

DMSO yerine geçebilecek maddeler

Şeker ve şeker alkolleri

- ▶ Glukoz, sukroz, etilen glikol
- ▶ Treholaz, gliserol, etilen glikol
- ▶ Bazı böcekler, nematodlar, rotiferlerin aşırı kuraklık durumlarında ürettikleri ve anhidrobiyozis koşullarında canlı kalmalarını sağlayan maddeler
- ▶ Memelilerin hücre zarında sentezlenmezler
- ▶ Memeli hücre zarında düfüzyon kapasitleri sınırlıdır

Treholaz

- ▶ Treholaz hücre zarını geçemeyen–ekstrasellüler kriyoprotektan
- ▶ Çok yönlü cam oluşturucu ajan olarak bilinir
- ▶ Camsı matrikste moleküler hareketliliği sınırlar
- ▶ Su yer değiştirme (water replacement) teorisi ile hücre içi lipid ve proteinlerin yapısının bozulmasını engeller
- ▶ Hücre içine geçtiğinde donmuş, kurumuş veya dondurularak kurutulmuş hücrelerin canlılığını toksisite yaratmadan korur

Biyomalzeme bilimi ve nanoteknoloji bu işin neresinde

Memeli hücre zarını geçemeyen treholazı hücre içine sokmak

- ▶ Ph- yanıtı nanopartikül Pluronic F127–chitosan ile treholazı enkapsüle etmek ve hücre içine sokmak
 - 24 saat inkübasyon
- ▶ N–isopropylacrylamide–co–butyl acrylate ile treholazın enkapsülasyonu
 - 37°C ısıda 4 saat inkübasyon
- ▶ 400 mM kesilmiş herhangi bir şekerin elektroporasyon yöntemi ile hücre içine sokulması

Rao et al. ACS Appl. Mater. Interfaces 7 (2015)

5017–5028

Zhang et al. Nano Lett. 19 (2019) 9051–9061

Mutsenko et al. Cryobiology 91 (2019) 104–114

Biyomalzeme bilimi ve nanoteknoloji bu işin neresinde

- ▶ Tüm bu yöntemlerin dez avantajı az miktarda hücre üzerinde çalışılmış olmalarıdır.
- ▶ Hematoloji pratiğinde toplanan ürün miktarına göre değişmekle birlikte $>2 \times 10^6 / \text{kg}$ CD34+ kök hücre dondurma işlemi yapılmaktadır.
- ▶ Böylesi büyük hacimde–miktarda hücre donduracak stratejilere ihtiyaç vardır.
- ▶ Ayrıca uzun inkübasyon süresi kabul edilebilir bir durum değildir.
 - Aynı gün hücrelerin aferez yöntemi ile toplanması, sayılması ve dondurulup azot tanklarına yerleştirme işleminin bitmesi gerekmektedir.

Nano-rewarming effectuating large-volume vitrification

- ▶ Manyetik kaynaklı ısıtma % 0.05 (w / v) Fe₃O₄ nanoparçacıkları ile vitrifikasyon
- ▶ Demir oksit nanopartikülleri ile radyo-frekans alanlarının birleştirilmesi esasına dayanır
- ▶ Büyük miktarlarda hücre buz kristalleri oluşmadan dondurulabilmiştir.

Sonuç olarak,

- ▶ Biyomalzeme bilimi ve nanoteknoloji büyük hacimde biyomateryalin dondurulup uzun yıllar saklanması, ülkeler-kıtalar arası transportunun sağlanmasına katkıda bulunabilir.
- ▶ Viral pandemilerin önümüzdeki yıllarda dünyamızı daha da çok tehdit edeceği düşünüldüğünde; biyomateryal (özellikle T lenfosit alt tipleri gibi immun sistem hücrelerinin) dondurulması ve gerektiğinde kişinin kendisi veya bir başka alıcı için kullanılması konusu gündeme gelecektir.
- ▶ Hematoloji dışındaki tıp alanlarında da canlı tedaviler gündeme gelecek ve hücrelerin küçük hacimlerde dondurulup saklanması- transportunun önemi bir kez daha ortaya çıkacaktır.