

Kan ve İlik İşlenmesi, Kriyopreservasyonu, Depolanması ve Transportasyonu

Levent ÜNDAR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları, Hematoloji Bilim Dalı

Hematopoietik kök hücre (HKH) nakli uygulamalarında transplant hazırlama rejimlerinin gerektirdiği süre nedeniyle hastadan elde edilmiş olan hücrelerin saklanması bir zorunluluk oluşturmaktadır. Toplanan ürün oda sıcaklığında birkaç saat ya da +4°C' de buzdolabında birkaç gün (en fazla 9 gün) saklanabilmektedir. Bu nedenle toplama ile reinfüzyon arasında geçecek olan süre 72 saatten daha fazla olacak ise ürünün dondurulması gereklidir. Dondurma işlemi (kriyopreservasyon) genellikle otolog ürün için yapılmakla birlikte örneğin 40 saat içerisinde hastaya verimesinin garanti edilemediği durumlarda olduğu gibi allojenik ürün ya da akraba-dışı transplantasyon için belki de 10 yıllarca saklayabilmek amacıyla kordon kanı için de gereksinilebilir. Keza kadavradan alınan kök hücre de dondurulabilir.

Kriyopreservasyondan amaç, kemik iliği ya da çevre kanından elde edilen "canlı" pluripotent HKH'lerin yeniden eritildiklerinde canlılık ve fonksiyonel bütünlüklerinin yüksek oranda korunmuş olması ve toksik bir etki olmaksızın alıcıya infuze edilebilmesinin sağlanmasıdır. Bu süreç seçilen kriyoprotektan madde, dondurma hızı, donma sırasındaki hücre konsantrasyonu, saklama koşulları ve eritme işlemleri tarafından etkilenmektedir. Genellikle kriyopreservasyona bağlı olarak engraftman yetmezliği gözlenmez.

Dondurulmayan ürünlerde progressif bir HKH kaybı olmaktadır. Bununla birlikte dondurma işlemleri ya da saklama döneminde de beklenmedik hücre kayıpları olabilmektedir. Dondurma işlemleri sırasında hücre kaybının en önemli nedeni buz kristal formasyonudur. Bu hasar iki ayrı alt grupta değerlendirilebilir:

1. Hızlı soğutmalarda (>10 C/dak) intrasellüler buz kristalleri oluşmakta ve hücrenin mekanik olarak parçalanmasına ve hızlı hücre ölümüne neden olmaktadır.

2. Daha yavaş (<10 C/dak) soğutma hızlarında ise buz kristal oluşumu hücre dışı alanda oluşur. Ortaya çıkan hiperosmolar durum da hücrenin dehidrasyon ile ölümüne neden olmaktadır.

Hücre içi buz kristal oluşumu soğutma hızının yavaşlatılması ve kriyoprotektan madde eklenerek azaltılabilir. Kriyoprotektan madde olarak ise dimetil sülfoksit (DMSO), gliserol, polivinilpirolidon, hidroksietil starch (HES) kullanılmaktadır.

Dimetil Sülfoksit (DMSO)

Gliserolün kriyoprotektan özelliği ilk olarak 1949 yılında tanımlanmış, bundan 10 yıl kadar sonra DMSO'nun benzer özelliği belirlenmiştir. DMSO'nun hücre içine hızlı difüzyon özelliği, gliserolün reinfüzyon öncesi uzaklaştırılmasındaki güçlükler DMSO'yu günümüzde HKH dondurulmasında en yaygın kullanılan kriyoprotektan yapmıştır. İntrasellüler bir ajan olarak DMSO ekstrasellüler elektrolit dengesini sağlayarak ve intrasellüler ve ekstrasellüler osmolarite farkını azaltarak dehidrasyon hasarını önler.

DMSO temelde, insektisidler, fungusid ve herbisidler gibi çeşitli kimyasallarda çözücü olarak kullanılan bir ajandır. Saf DMSO kokusuz ve renksiz bir sıvıdır. Serumdaki ortalama yarı ömrü 20 saat kadardır ve temelde renal yolla uzaklaştırılmaktadır. Ancak düşük bir oranda dimetil sulfide indirgenen formu uygulamadan sonra 24 saatlik bir zaman içinde akciğerler yolu ile atılır ve bu uygulamada karşılaşılan karakteristik kokuya neden ol-

maktadır.

HKH dondurulmasında kriyoprotektan olarak gerek DMSO gerekse gliserol için optimal konsantrasyon %10 gibi değerlendirilmekle birlikte %5 e kadar azaltılan konsantrasyonu ile de transplantasyonlarda başarı sağlanabilmektedir.

DMSO oda sıcaklığında hücrelere toksiktir. Bu nedenle +4 C de sabit bir hızda eklenmeli ve hemen dondurma aşamasına geçilmelidir.

HES (Hidroksietil Starch)

Ekstrasellüler bir kriyoprotektan olan HES başlangıçta kırmızı küre saklanmasıyla başarıyla kullanılmış ve ardından değişik hücrelerde de etkili olduğu gösterilmiştir. Ekstrasellüler kriyoprotektanlar makromoleküler yapıda olup dondurma sırasında hücre dışında bir zırh oluşturmakta ve böylece dehidratasyonu engellemektedirler. Tek başlarına kullanılabilirle birlikte penetran olan intrasellüler koruyucularla birlikte kullanılmaları günlük uygulamadır.

In vitro kültürde progenitor hücre sağkalımı açısından %5 DMSO, %6 HES ve %4 insan serum albumin kombinasyonunun tek başına HES'e üstünlüğü gösterilmiş ve ardından klinik uygulama ile de desteklenmiştir. Tek başına DMSO ile DMSO/HES kombinasyonunun etkinliğini araştıran az sayıda çalışma vardır ve anlamlı bir fark ortaya konamamıştır. Bazı araştırmacılar DMSO ya HES eklenmesinin çözündürme işlemi takiben ortaya çıkan hücre kümeleşmesini azalttığını bildirmişlerdir.

Protein ve Şekerler

Plazma proteinleri kriyoprotektan etkinliğe sahiptirler ve olasılıkla viskozite değişikliği ile bu etkiyi gerçekleştirirler. Lenfositler tek başına serum kullanılarak dondurulabilmektedir. Kriyoprotektan solüsyona serum proteinlerinin eklenmesi HKH yaşamını olumlu etkilemektedir. Halihazırda kullanılan tüm kriyopreservasyon solüsyonları plazma proteinleri içermektedir. Değişik transplantasyon merkezlerinde kullanılan protein oranı çok farklılıklar göstermekte, bazıları %90 oranlarına kadar çıkabilmektedirler. Kemik iliği yağ ve hücresel debris bulaşığı, antikoagulan gereksinimi ve otolog plazmada kriyoglobulin bulunabilmesi gibi sakıncaları nedeniyle plazma yerine albumin daha fazla yeğlenmektedir.

Değişik şeker tipleri kriyoprotektan olarak kullanılabilir. Bunlar dehidrasyon ya da donuma işlemi sırasında hücre membranının stabilizasyonuna katkıda bulunmaktadır.

DONDURMA İŞLEMİ

Kriyoprezervasyon için Hematopoietik Hücrelerin Hazırlanması

Kök hücreler CD34 ekspresyon etmelerine dayanarak pozitif seçilme işlemi yapılmadıkça toplanan üründe hacim azaltılması yapılmalıdır. Bu en azından o transplant ünitesinin saklama alanının etkin kullanımı için gereklidir. Hacim azaldıkça kullanılan kriyoprotektan madde miktarı da azalacak böylece ürünün infüzyonu sırasında ortaya çıkacak gerek parçalanmış hücrelere gerek kriyoprotektana bağlı toksite riski ve ciddiyetini de azaltacaktır. Dondurma öncesi ya da çözündürme sonrası granülosit ya da trombositlerin parçalanması sonucu oluşan hücre kümeleri de uygulamada sorunlar oluşturabilir. Ayrıca eritrositlerin, özellikle in vitro ayıklama amaçlı kullanılan 4-hidroperoksikiklofosfamidin etkisini bozduğuna dair tamamlanmamıştır.

Bu nedenlerle dondurma işlemi öncesi olgun kan hücrelerinin uzaklaştırılması yararlı olmaktadır. Günümüzde kullanılan pek çok yeni kuşak aferez cihazları ile bu konuda başka ek işleme gerek kalmadan hücre toplanması olanaklıdır.

Tipik bir kriyoprotektan karışımı %10 DMSO ve %5 insan serum albumini içerir. Bu final solüsyon genellikle polyolefin gibi dondurma ve çözündürme işlemlerine dayanabilen 100-200 ml lik plastik torbalara aktarılır. Bu torbalardan ayrı olarak birkaç adet küçük örnek vial de in vitro koloni çalışmaları için saklanır.

Torbalara aktarmadaki en kritik basamak ısıyla torba kapatması yapmadan önce tüm havanın torbalardan uzaklaştırılmasıdır. Bu titizlikle yapılmazsa likit nitrojenin oda sıcaklığına çıkarıldığında torbanın patlamasına neden olur.

Hücre Konsantrasyonu

Periferik kan HKH dondurulmasında torbalardaki 0,4 ila 8.0 x 10⁸/mL (ortanca 3,7 x 10⁸/mL) hücre konsantrasyonlarının engraftman yönünden farklılık ortaya koymadığı saptanmıştır. Dondurma işlemi sırasında ya da çözündürme sonrası CD34+ hücre kaybı oranı hücre konsantrasyonundan etkilenmezken CFU-GM koloni kapasitesi hücre konsantrasyonu ile ters korelasyon göstermektedir.

Soğutma ve Çözündürme Hızları

Yavaş soğutma ve hızlı çözündürmenin temelinde hücrelerin bu sırada karşılaşacakları termal hasradan en az etki ile kurtarılması prensibi yatmaktadır. Değişik hücrelerin farklı dondurma hızları olduğu gibi kullanılan kriyoprotektan solüsyo-

non özellikleri de dondurma hızını etkilemektedir. Genelde yüksek hücre içi koruyucu daha yavaş bir soğutma hızına gereksinim duymaktadır. Aksine ekstrasellüler koruyucu kullanımı durumunda ise dondurma hızı artırılmak zorundadır. %10 DMSO ile süspanse edilmiş insan HKH dondurulmasında optimal hızın 10C/dakika olduğu, bundan yavaş ya da 3 C/dakikadan daha hızlı soğutmaların hücrelerin proliferasyon kapasitelerini olumsuz etkilediği gösterilmiştir.

Birçok merkezde optimal soğutma koşullarını sağlamak amacıyla programlı dondurucular kullanılmaktadır. Bu sistemde dondurma odacığına sabit bir hızda (genellikle 2 C/dak) sıcaklık düşecek şekilde sıvı nitrojen pompalanmaktadır. Sıcaklık -120 C ye ulaştığında ürün saklama amaçlı kullanılan sıvı nitrojen tankına alınır.

HES içeren dondurucu karışım kullanılarak -80 C lik mekanik dondurucularla da hem kemik iliği hem de periferik kök hücre dondurulabileceği gösterilmiştir. Daha ucuz ve kolay uygulanabilir olması nedeni ile mekanik dondurma uygulamaları giderek yaygınlaşmaktadır.

Dondurulmuş Hücrelerin Saklanması

Çoğu merkezde hücreler -135 C mekanik dondurucular ya da buhar (-156 C) ya da sıvı faz (-196 C) nitrojen tanklarında saklanmaktadır. Burada temel neden -130 derece üzerinde kristalleşmenin olabileceğidir. Ancak -80 derecede saklanan hücreler ile yapılan çalışmalarda da başarılı sonuçlar elde edilmiştir. 4 C de 96 saat (hatta 9 gün) saklanan ürünlerle de başarılı engraftman sağlanabilmiştir. Eğer birkaç hafta ya da ay içerisinde transplant yapılacaksa DMSO/HES ile -80 C de saklamak yeterlidir. Bu şekilde 22 aya dek saklanan ürünle başarılı transplant yapılabilmektedir.

Buhar faz saklama durumunda tankın üst ve alt bölümleri arasında çok belirgin bir sıcaklık gradiyenti ortaya çıkmaktadır. Bunun önüne geçebilmek için sıcaklığı daha iyi iletebilen özel alüminyum çerçeveler kullanılmalıdır. Bu kısıtlılık nedeni ile sıvı nitrojen faz saklama daha çok tercih edilir durumdadır. Ancak bu durumda da ciddi bir viral enfeksiyon geçişi riski söz konusudur.

Uygun koruyucular ve saklama koşulları sağlandığında hücrelerin saklanma süreleri belirsizdir; 11 yıla kadar saklanan hücreler ile transplantasyon yapılabilmektedir. Ne şekilde saklanırsa saklansın istenmeyen bir çözünmeye karşı her merkezde bir alarm sistemi ve mutlaka bir yedek/alternatif saklama olanağı mevcut olmalıdır.

Transport

Akraba-dışı donör ya da ayıklama işlemi görece otolog ya da allojenik transplantasyon durumlarında kök hücrenin başka bir merkeze gönderilmesi gerekebilir. Kök hücrenin bu transport sırasında da saklanma sıcaklığı korunmalıdır.

Henüz dondurulmamış olan ürün, gidecek olduğu yer uzak değilse oda sıcaklığında gönderilebilir. Ancak bu süre 12 saati aşacaksa +4 C koşulları sağlanmalıdır. Hemen transplant yapılamayacaksa ya da zamanlanan transplant tarihinde donör uygun olmadığı için ürün önceden toplandıysa (donörün oluru alınmak koşulu ile) ürün yukarıda anlatıldığı şekilde dondurularak sıvı nitrojen içerisinde taşınması gerekir. Nitrojenin taşıma kabı duvarlarına absorbe edildiği "kuru taşıma" sistemleri bunun için en uygun olan yöntemdir. Bu sistemle nitrojenin buhar faz sıcaklığı (-180 C) 7-10 gün süreyle sağlanabilmektedir. Taşıma kabının ağırlığı sürekli ölçülerek taşıma öncesi nitrojen takviyesi yapılmalıdır.

Transportu gerçekleştirecek olan kişinin bu konuda yeterli bilgiye sahip hemşire, tıbbi teknisyen ya da hekim olmasında yarar vardır. Allojenik ürün için bu kişinin donör ya da hasta ile hiçbir ilişkisi olmamasına özen gösterilmelidir. Ürün, taşımadan sorumlu kişinin sürekli gözetiminde olmalı, asla kargo taşıma bölümlerinde bulundurulmamalıdır. Transplant merkezi ile taşıyıcı arasında sürekli haberleşebilme olanağı sağlanmalıdır. Seyahat ve bilet değişikliklerini hızla gerçekleştirebilmesi için maddi olanaklar düzenlenmiş olmalıdır.

Ürünün radyasyona maruz bırakılmaması ve bu nedenle x-ray cihazlarından geçirilmesinin önlenmesi gereklidir. Transplant merkezine ulaşan ürün alıcıya hemen transfüze edilir.

Çözündürme ve İnfüzyon

Buz kristalleri çözülürken hücre içerisinde oluşabilecek serbest suya bağlı olarak hücre lizisi ortaya çıkabilir. DMSO hücre membranından difüze olarak osmotik şoku azaltır ve bu hasara karşı hücreyi korur. Çözündürme işlemi için torba ve vialer 37-40 C lik su banyosuna konarak tümüyle sıvı faza geçinceye dek bekletilir. Ardından hemen santral venöz yol aracılığıyla ve kan transfüzyonu ilkeleri ile alıcıya infüze edilir. HES ve DMSO'nun uzaklaştırılması gerekmez. Çözündürme sonrası oda ısısında bekletilme ile 4 saat kadar sonra %20-25 hücre kaybı oluşmaktadır.

Çözündürme sonrası hücre debrislerinin oluşturacağı kümeleşmenin önüne geçmek için dondurma öncesi granülosit ve trombositlerin uzaklaş-

tırılması ya da ACD solüsyonu eklenmesi ve çözülme sonrası standart kan seti filtrasyonu (170 mikrometre) dışında başka işlem yapılmaması yararlı olacaktır.

Kriyoprotektan Toksikitesi

DMSO nun akut toksik dozu bilinmemektedir. Yine de çok fazla bir volüm söz konusu ise infüzyonun iki ardışık güne bölünmesinde yarar vardır. Ender fakat en dramatik toksisite anaflaktik reaksiyondur ve bilinen prensiplerle tedavi edilir. DMSO histamin deşarjı aracılığıyla hipotansiyon, flushing, dispne, abdominal kramp, bulantı ve ishal yapabilir. DMSO infüzyonuna bağlı belki de bulantı-kusma epizodlarıyla da ilişkili olarak hipertansiyon, bradikardi, kalp blokları ve kalp durması görülebilir. Baş ağrısı, ensefalopati ve nöbetler de bildirilmişse de bunlar ürünün hücre konsantrasyonuna ya da ACD ye de bağlı olabilir.

Kalite Kontrol ve Kalite Güvenliği

Dondurma torbalarının segmentleri ya da dondurulan üründen viallere alınan örnekler aynı zaman ve koşullarda dondurularak daha sonraki dönemde ürünün değerlendirilmesi için (örneğin CFU-GM) saklanır. Ne yazık ki HKH nin fonksiyonel değerlendirilmesi için ex-vivo bir test yoktur. CFU-GM ile nötrofil engraftmanı korelasyon göstermektedir. Keza üründeki CD34 sayısı da CFU-GM içeriği ile korelasyon göstermektedir. Bununla birlikte CD34 sayısının üründeki kök hücre klonogenitesi ile eş anlamlı olmadığı akıldan çıkarılmamalıdır.

Hücrelerin canlılık oranını göstermek için genellikle Tripan mavisi boya testi kullanılmaktadır. Ancak hücrelerin membrane bütünlüğünün kaybolmamasının o hücrenin "canlı" olduğu anlamına gelemeyebileceği de unutulmamalıdır. Bu nedenle laboratuvarlar transplantasyon sonrası engraftman hızlarını gözlemlemeli ve ürünün kalite kontrolu anlamında gözden geçirmelidirler.

Toplama işlemleri, ex-vivo işlem ve torba hasarları bakteriyel ve fungal kontaminasyona neden olur. Bu nedenle ürünler sterilite yönünden test edilmelidirler. Personel seçimi ve eğitimi, sürekli meslek-içi eğitim, cihaz ve işlemlerin validasyonu, dökümantasyon, etiket kontrolü, kaza raporlaması ve monitorizasyonu, bu işlemlerde sürekli iyileştirme de kalite güvenliğinin olmazsa olmaz unsurlarıdır.

KAYNAKLAR

1. Rowley SD. Hematopoietic stem cell cryopreservation. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, eds. Hematopoietic cell transplantation. Malden: Blackwell Science, 1999:481-492.
2. Galmes A, Besalduch J, Bargay J, et al. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5- percent dimethyl sulfoxide at -80 degrees C without rate controlled freezing. Transfusion 1996;36:794-797
3. Stiff PJ, Koester AR, Weidner MK, et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. Blood 1987;70:974-978
4. Rowley SD, Piantadosi S, Marcellus DC, et al. Analysis of factors predicting speed of hematologic recovery after transplantation with 4-hydroperoxycyclophosphamide-purged autologous bone marrow grafts. Bone Marrow Transplant 1991;7:183-191.
5. Rowley SD, Bensinger WI, Gooley TA, Buckner CD. Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. Blood 1994;83:2731-2736.
6. Keung YK, Cobos E, Morgan D, et al. High cellular concentration of peripheral blood progenitor cells during cryopreservation adversely affects CFU-GM but not hematopoietic recovery. J Hematother 1996;5:73-77.
7. Clark J, Pati A, McCarthy D. Successful cryopreservation of human bone marrow does not require a controlled-rate freezer. Bone Marrow Transplant 1991;7:121-125
8. Rowley SD. Techniques of bone marrow and stem cell cryopreservation and storage. In: Sacher R, AuBuchon J, eds. Marrow transplantation: Practical and technical aspects of stem cell reconstitution. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 1992:105-127.
9. Rowley SD, Byrne DV. Low temperature storage of bone marrow in nitrogen vapor-phase refrigerators: Decreased temperature gradients using aluminum racking system. Transfusion 1992;32:750-754.
10. Schafer TW, Everett J, Silver GH, Came PE. Biohazard-virus contaminated liquid nitrogen. Science 1976;192:24.
11. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. Lancet 1995;346:137-140.
12. Aird W, Labopin M, Gorin NC, Antin JH. Long-term cryopreservation of human stem cells. Bone Marrow Transplant 1992;9:487-490.
13. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. N Eng J Med 1996;335:157-166.
14. Davis JM, Rowley SD, Braine HG, Piantadosi S, Santos GW. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. Blood 1990;75:781-786.
15. Stroncek DF, Fautsch SK, Lasky LC, Hurd DD, Ramsay NKC, McCullough J. Adverse reactions in pati-

- ents transfused with cryopreserved marrow. *Transfusion* 1991;31:521-526.
16. Okamoto Y, Takaue Y, Saito S, et al. Toxicities associated with cryopreserved and thawed peripheral blood stem cell autografts in children with active cancer. *Transfusion* 1993;33:578-581.
 17. Menitove J. Standarts for hematopoietic progenitor cells. Bethesda, MD, USA. American Association of Blood Banks, 1996:10.
 18. Goldman JM. A special report: Bone marrow transplants using volunteer donors- recommendations and requirements for a standardized practice throughout the world-1994 update. *Blood* 1994;84(9):2833-2839.
 19. Cleaver SA, Warren P, Kern M, et al. Donor work-up and transport of bone marrow – recommendations and requirements for a standardized practice throughout the world the donor registries and quality assurance working groups of the world marrow donor association (WMDA). *Bone Marrow Transplant*. 1997; 20: 621-629.