

# Krioprotekcija hematopoetskih matičnih stanica

---

Šoić, Antonia

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:245807>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Antonia Šoić**

# **Krioprotekcija hematopoetskih matičnih stanica**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Sanje Dabelić.

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sanji Dabelić na suradnji, strpljenju i svakom danom savjetu.*

*Hvala dragim prijateljima koji su studentske dane učinili lakšima i bili oslonac u teškim trenucima.*

*Hvala mom Dariu što je imao razumijevanja u danima provedenim uz knjigu i za svaki izmamljeni osmijeh na licu.*

*Posebno hvala mom ocu i bratu, te svoj rodbini, koji su vjerovali u mene i bili mi podrška tijekom cijelog studiranja.*

*Ovaj rad posvećujem osobi koja me naučila da se treba boriti do kraja, i bez koje danas ne bih bila to što jesam, mojoj majci. Hvala, anđele moj!*

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Povijest krioprotekcije.....	1
1.2. Princip krioprotekcije.....	1
1.3. Hematopoetske matične stanice .....	6
2. Obrazloženje teme .....	8
3. Materijali i metode.....	9
4. Rezultati i rasprava .....	10
4.1. Krioprotektanti .....	10
4.1.1. DMSO.....	10
4.1.1.1. Krioprotektivan učinak DMSO-a.....	10
4.1.1.2. Toksičan učinak DMSO-a.....	10
4.1.1.3. Smanjenje koncentracije DMSO-a .....	12
4.1.1.4. Uklanjanje DMSO-a prije infuzije.....	12
4.1.2. Alternative i dodaci DMSO-u.....	14
4.1.2.1. Šećeri i alkoholi .....	14
4.1.2.2. Inhibitori rekristalizacije leda .....	22
4.1.2.3. Inhibitori apoptoze .....	25
4.1.2.4. Antioksidansi .....	26
4.2. Zahtjevi uspješne krioprotekcije .....	27
4.2.1. Mjesto izvođenja krioprotekcije .....	28
4.2.2. Koncentracija stanica i vrijeme skladištenja do krioprotekcije.....	28
4.2.1. Brzina zamrzavanja .....	30
4.2.2. Pohrana stanica .....	32
4.2.3. Dugotrajno skladištenje krioprotektiranih HMS-a .....	32
4.2.4. Događaji prolaznog zagrijavanja .....	33

4.2.5.	Odmrzavanje stanica.....	34
4.2.6.	Obrada odmrznutih stanica.....	36
4.2.7.	Kontrola kvalitete odmrznutih stanica.....	37
5.	Zaključci .....	41
6.	Popis kratica, oznaka i simbola.....	42
7.	Literatura.....	44
8.	Sažetak/Summary .....	49
9.	Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card	

# 1. Uvod

## 1.1. Povijest krioprotekcije

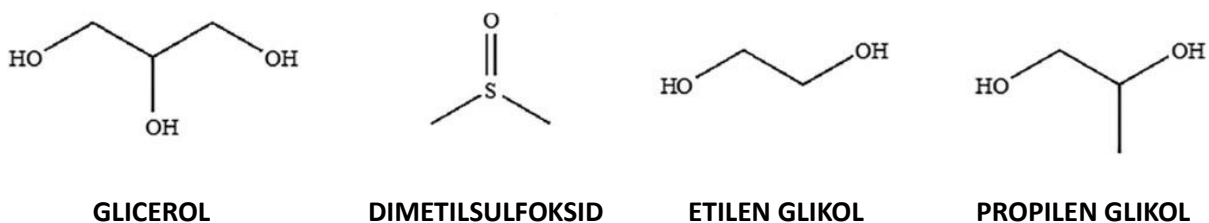
Nakon otkrića mikroskopa, Spallanzani je 1771. otkrio kako spermij očuva pokretljivost kada je izložen uvjetima niske temperature. U kasnim 1800.-ima znanstvenici su smrzavali spermije i eritrocite, no istraživanje je pokazalo slabosti u procesu koje su uzrokovale nedosljedne rezultate i čestu neplodnost uzrokovanu ranom embrionalnom smrću (Whaley i sur., 2021). Godine 1948., Polge i suradnici otkrili su da glicerol omogućuje spermatozoidima peradi da prežive zamrzavanje do  $-70^{\circ}\text{C}$  (Spoerl i sur., 2016). Prvu demonstraciju preživljavanja zamrzavanjem vjerojatno su izvijestili Gonzales i Luyet 1950. s tkivom dobivenim iz pilećih embrija. Znanstvenici su inkubirali živa srca pilećih embrija u 30% etilen glikolu (engl. *ethylene glycol*, EG) 6 minuta, a zatim su ih stavili u tekući dušik. Više od polovice tretiranih embrija preživjelo je zamrzavanje; no većina tih preživjelih embrija pokazala je neke znakove ozljede (Pavel i Laier, 2019). Preokret se dogodio 1950.-tih kada je James Lovelock otkrio da zamrzavanje uzrokuje osmotski stres i stvaranje kristala leda u stanicama (Whaley i sur., 2021), a 1959. zajedno s Bishopom opisao da se oštećenje stanica zamrzavanjem može spriječiti dodavanjem dimetilsulfoksida (engl. *dimethyl sulfoxide*, DMSO). Nekoliko godina kasnije, 1965., Bouroncle je objavio rad o očuvanju živih stanica na  $-79^{\circ}\text{C}$  u prisutnosti DMSO-a (Spoerl i sur., 2016). 1963. Mazur je otkrio da brzina promjene temperature prilikom hlađenja utječe na kretanje vode kroz stanične membrane, a time i na unutarstanično zamrzavanje. Istraživanja 1980.-tih pokazala su kako postupno zamrzavanje i odmrzavanje smanjuje stvaranje kristala leda i posljedično staničnu smrt (Whaley i sur., 2021). Sve navedeno dovelo je do današnjih saznanja o procesu krioprotekcije.

## 1.2. Princip krioprotekcije

Krioprotekcija (grč. *kryos* – hladno) je proces zamrzavanja i pohranjivanja stanica, tkiva i organa na vrlo niskim temperaturama kako bi se sačuvali za buduću upotrebu. Kriogeni temperaturni raspon je definiran od  $-150^{\circ}\text{C}$  do apsolutne nule ( $-273^{\circ}\text{C}$ ), pri kojem je molekularno gibanje najbliže teoretski mogućem potpunom prestanku ([www.britannica.com](http://www.britannica.com)).

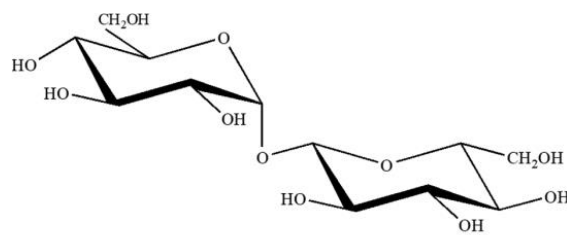
80% mase zdravog tkiva čini voda te izlaganje istog temperaturama ispod 0°C uzrokuje unutarstanično i izvanstanično stvaranje kristala leda. Whaley i suradnici navode dvije neovisne teorije koje objašnjavaju štetne učinke na zamrzavanje stanica: 1) kristali leda mehanički oštećuju stanične membrane što onemogućuje dobivanje strukturno netaknute stanice nakon odmrzavanja; 2) kako se kristali leda stvaraju unutar stanice, dolazi do smrtonosnog povećanja koncentracije otopljenih tvari u preostaloj tekućini. Mehanički i osmotski utjecaji zamrzavanja stanica bez krioprotektanata nespojivi su sa životom. Iz tog razloga potrebno je koristiti krioprotektante i izabrati odgovarajuću brzinu zamrzavanja i odmrzavanja.

Krioprotektanti su spojevi koji pomažu stanicama da prežive stres zamrzavanja i odmrzavanja. Većina krioprotektanata djeluje tako što stupa u interakciju s molekulama vode mijenjajući joj fazni prijelaz i/ili stabilizirajući staničnu membranu, proteine i organele (Jahan i sur., 2021). Krioprotektanti se mogu podijeliti u dvije skupine: propusne za membranu i nepropusne za membranu. Membrana-propusni krioprotektanti moraju imati visoku topljivost u vodi, čak i kod niskih temperatura, sposobnost prolaska kroz membrane, te nisku toksičnost. Najčešće korišteni membrana-propusni krioprotektanti su prvi otkriveni glicerol, DMSO, EG i propilen glikol (engl. *propylene glycol*, PG). Njihova fizikalna i kemijska svojstva, kao što su mala molekulska masa (ispod 100 daltona) i amfofilna priroda, omogućuju im lagan prolaz kroz stanične membrane gdje mogu ispoljiti svoje učinke. Njihova struktura (Slika 1.) omogućuje im stvaranje jake vodikove veze s molekulama vode, pri čemu se točka leđišta vode smanjuje te ostaje manje slobodnih molekula vode za međusobno povezivanje i stvaranje kristala leda. Dodatak membrana-propusnih krioprotektanata omogućuje uspješno skladištenje stanica u čvrstoj fazi na superhladnim temperaturama potrebnih za zaustavljanje biokemijskih procesa.



Slika 1. Strukture najčešće korištenih membrana-propusnih krioprotektanata (preuzeto i prilagođeno prema Whaley i sur., 2021).

Druga kategorija krioprotektanata su oni nepropusni za membranu. Kao takvi, svoje učinke ispoljavaju izvan stanice, istim mehanizmom kao i membrana-propusni krioprotektanti, ali u puno manjoj mjeri. Membrana-nepropusni krioprotektanti su obično veći i kovalentno povezani u dimere, trimere ili polimere. Neki od uobičajeno korištenih membrana-nepropusnih krioprotektanata su: polietilen glikol (engl. *polyethylene glycol*, PEG), polivinilpirolidon (engl. *polyvinylpyrrolidone*, PVP), rafinoza, saharoza i trehaloza (Slika 2.).



**TREHALOZA**

Slika 2. Struktura trehaloze, prirodnog disaharida s jedinstvenom  $\alpha$ -1,1-glikozidnom vezom koja sprječava C-1 hidrolizu i povećava stabilnost pri ekstremnim temperaturama i niskim pH uvjetima (preuzeto i prilagođeno prema Whaley i sur., 2021).

Krioprotektanti, i membrana-propusni i, u nešto manjoj mjeri, membrana-nepropusni, toksični su za stanice pri višim koncentracijama. Povećavaju staničnu smrt i smanjuju vijabilnost stanica. Kako bi se smanjila toksičnost krioprotektanata, stanice bi im trebale biti što kraće vrijeme izložene. Budući da i membrana-propusni i membrana-nepropusni krioprotektanti djeluju istim krioprotektivnim mehanizmom, dodatak membrana-nepropusnih u otopinu omogućuje uspješnu krioprotekciju s nižom koncentracijom membrana-propusnih krioprotektanata. Na taj način smanjuje se toksičnost i povećava vijabilnost stanica nakon odmrzavanja.

Druga stavka uspješne krioprotekcije je odgovarajuća brzina zamrzavanja i odmrzavanja. Krioprotekcija je uspješna ako se izbjegne stvaranje unutarstaničnog leda pa je zbog toga važno razmotriti kretanje vode kroz membrane prilikom procesa krioprotekcije (Slika 3.). Kako bi se smanjila vjerojatnost unutarstaničnog stvaranja leda, voda mora izaći iz stanice kako se temperatura smanjuje. Pokretačka sila kretanja vode prema van je razlika tlaka zbog superhlađenja unutarstanične vode. Unutarstanična voda ostaje u tekućoj fazi na temperaturama ispod  $0^{\circ}\text{C}$  zbog prisutnosti krioprotektanta koji snizuje točku smrzavanja.

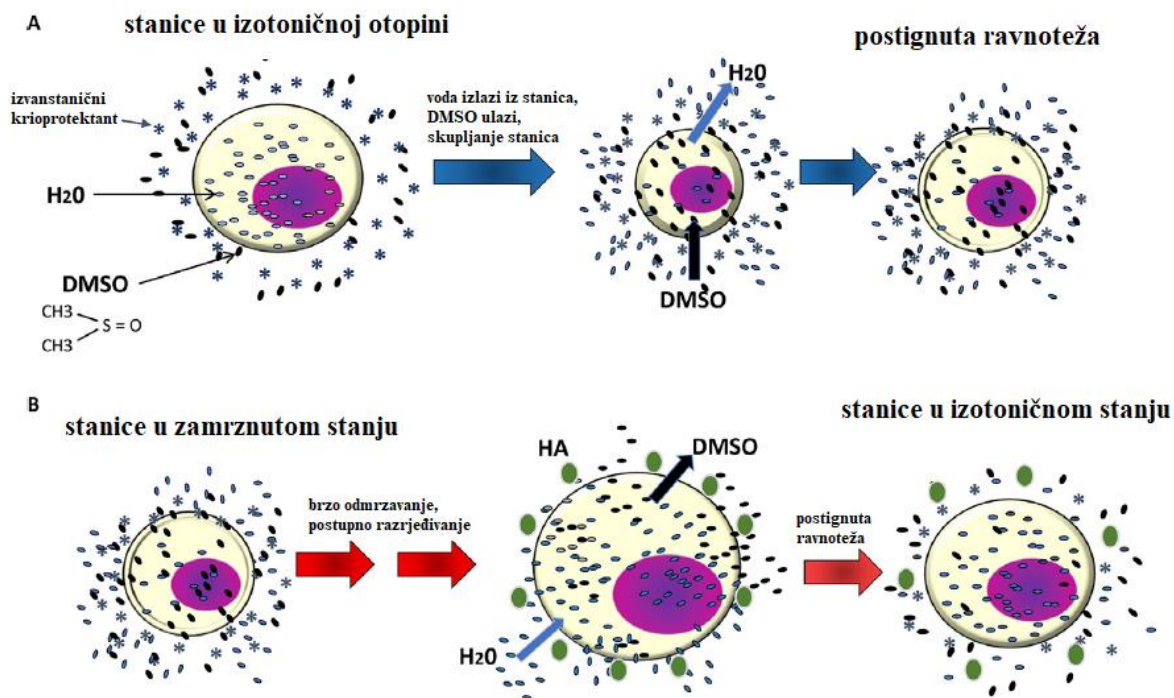


Tako ohlađena voda u citoplazmi ima veći tlak pare no izvanstanični led te ta razlika tlaka uzrokuje kretanje vode prema van i dehidraciju stanica. Na količinu zaostale vode u stanici u vrijeme skrućivanja utječe brzina istjecanja vode tijekom faze hlađenja. Razlika tlaka je neophodna da bi došlo do neto kretanja vode, no dodatna tri čimbenika utječu na brzinu istjecanja vode tijekom faze hlađenja: omjer površine i volumena stanice (P/V), propusnost membrane za vodu i brzina hlađenja. P/V je funkcija inherentne veličine stanice i ne može se mijenjati. Međutim, bitno je uzeti u obzir da je dehidracija većih stanica sporija od dehidracije manjih stanica. Kako bi se omogućio izlazak dovoljnog volumena vode iz velikih stanica prije nego što dođe do skrućivanja, potrebno je prilagoditi preostale dvije varijable: povećati propusnost membrane upotrebom odgovarajućeg membrana-propusnog krioprotektanta, te usporiti brzinu hlađenja (Whaley i sur., 2020). Mazur i sur. (1972) iznose važnost odgovarajuće brzine hlađenja i zagrijavanja. Ako su stanice hlađene prevelikom brzinom, voda ne uspijeva izaći dovoljno brzo te dolazi do stvaranja unutarstaničnog leda koji prilikom zagrijavanja (osobito sporog) raste procesom rekristalizacije. S druge strane, ako su stanice hlađene presporo, dolazi do promjena u unutarstaničnoj i izvanstaničnoj otopini kao što su povećanje koncentracija otopljenih tvari, dehidracija, promjene pH vrijednosti i taloženje otopljenih tvari. Stope hlađenja između 1 – 3 °C/min omogućavaju hematopoetskim matičnim stanicama (HMS-ma) da postupno dehidriraju kao odgovor na rastuću fazu leda i povećanje koncentracije izvanstanične otopljene tvari te postignu osmotsku ravnotežu prije nego što se postigne točka smrzavanja i izbjegne unutarstanična kristalizacija leda (Erol i sur., 2021).

Nakon uspješne krioprotekcije, stanice se pohranjuju u tekućem ili plinovitom dušiku (-135°C – -196°C) ili u mehaničkim zamrzivačima (-80°C). Odmrzavanje stanica, za razliku od zamrzavanja, mora biti brzo kako bi se spriječila rekristalizacija leda. Metastabilni kristali leda nastali tijekom smrzavanja su u višem energetske stanju i mogu se preurediti u veće kristale nižeg energetske stanja tijekom ponovnog zagrijavanja (Baust i sur., 2017). Protokol koji se koristi je brzo zagrijavanje u vodenoj kupelji na 37°C 90 – 120 sekundi. Brzina takvog zagrijavanja je približno 45 – 70°C/min između -140°C i 0°C. Međutim, neke studije dokazale su da zagrijavanje stanica bilo kojim brzinama između 2°C/min i 100°C/min nemaju utjecaj na vijabilnost stanica nakon odmrzavanja. Uzimajući to u obzir, uzorci bi se mogli odmrzavati na zraku ( $6,2 \pm 0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ ), što bi imalo dodatnu prednost u povećanju sterilnosti jer su vodene kupelji jedan od najčešćih izvora kontaminacije u laboratoriju (Whaley i sur., 2020).

Na kraju, važno je napomenuti da bez obzira na to koliko su dobro stanice pohranjene ili kako su odmrznute, smanjenje vijabilnosti nakon odmrzavanja je neizbježno. Stanice su podložne nepovoljnim promjenama u strukturi i funkciji nakon krioprotekcije. Smanjenje vijabilnosti i metaboličke aktivnosti nakon krioprotekcije rezultat su fizičkog i molekularnog oštećenja stanica. Fizičke ozljede uključuje unutarstanično stvaranje leda, učinke otopine, toksičnost krioprotektanata, a molekularna oštećenja očituju se kao promjene u ekspresiji gena, indukcija odgovora na stres i epigenetske promjene. Utvrđivanje kvalitete HMS-a nakon zamrzavanja i odmrzavanja obično uključuje protočnu citometriju za određivanje vijabilnosti i tipa stanica, kao i daljnje analize vijabilnosti i funkcionalnosti kao što su test jedinica koje stvaraju kolonije (engl. *colony-forming unit*, CFU) i određivanje ukupnog broja stanica koje sadrže jezgru (engl. *total nucleated cell count*, TNC). Protočna citometrija omogućuje identifikaciju vijabilnih stanica korištenjem organskih fluorofora i boja, kao što je 7-aminoaktinomycin D (engl. *7-aminoactinomycin D*, 7-AAD), koje vežu deoksiribonukleinsku kiselinu (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) i isključuju ih stanice s intaktnom staničnom membranom. Vrsta stanice može se odrediti pomoću protutijela koja se vežu na CD34+, površinski marker za HMS. Klinički, ovaj test ima ograničenu primjenu, budući da se broj CD34+ obično određuje prije zamrzavanja i ne odražava stanje stanica nakon odmrzavanja. TNC koristi se za određivanje kvalitete stanica i vjerojatnosti usađivanja. CFU je mjera koja pokazuje kako se stanice dijele i stvaraju kolonije tijekom vremena te se smatra najboljom mjerom funkcionalnosti matičnih stanica (Hornberger i sur., 2019).

Nakon odmrzavanja, stanice mogu izravno ići u infuziju, razrjeđene ili isprane i suspendirane u novu otopinu. Otopine za krioprotekciju obično su hipertonične, dok su otopine za ispiranje nakon odmrzavanja dizajnirane za smanjenje osmotskog stresa povezanog s razrjeđivanjem ili pranjem, budući da su stanice osjetljivije na bubrenje nego na skupljanje (Slika 3.). Također, stanice se mogu kultivirati kako bi se povratila vijabilnost i/ili funkcionalnost stanica izgubljena zbog krioprotekcije (Li i sur., 2019).



Slika 3. Shematski prikaz osmotskog stresa tijekom zamrzavanja i odmrzavanja. (A) Polagano dodavanje hipertonične otopine krioprotektanata (DMSO-a i izvanstaničnog krioprotektanta) potrebno je kako bi se izbjeglo akutno osmotsko oštećenje. Sigurno odstupanje volumena stanica je između 45% i 60% izotonične veličine za CD34<sup>+</sup> stanice. (B) Do bubrenja stanica dolazi tijekom odmrzavanja i razrjeđivanja zbog osmotske neravnoteže. Sigurno odstupanje volumena stanica tijekom odmrzavanja je između 130% i 140% izotonične veličine za CD34<sup>+</sup> stanice. HA – engl. *human albumin*, ljudski albumin (preuzeto i prilagođeno prema Jahan i sur., 2021).

### 1.3. Hematopoetske matične stanice

Hematopoetske matične stanice (HMS) definirane su svojim potencijalom samoobnavljanja, visokom stopom proliferacije, sposobnošću diferencijacije te osiguravanja višelinijske hematopoeze. Od prve transplantacije koštane srži 1950-ih, transplantacija HMS-a uspješno se provodi kao tretman za pacijente s hematološkim karcinomima, poput leukemije i limfoma, te kongenitalnih ili stečenih bolesti hematopoetskog sustava kao što je bolest srpastih stanica. Uz konvencionalnu upotrebu HMS-a za liječenje hematoloških zloćudnih bolesti, klinička uporaba se posljednjih godina proširila na liječenje teške sklerodermije, dijabetesa,

metaboličkih poremećaja, primjenu genske terapije (Hornberger i sur., 2019), pa čak i za regeneraciju jetre (Siapati i sur., 2022). HMS mogu se dobiti iz koštane srži aspiracijom iz šupljine kosti iliuma, iz periferne krvi korištenjem faktora stimulacije granulocitnih kolonija (engl. *granulocyte-colony stimulating factor*, G-CSF) za mobilizaciju HMS-a iz koštane srži u perifernu krv i odvajanjem stanica aferezom (Pavel i Laier, 2019), te iz krvi pupkovine sakupljene iz placente nakon poroda. Transplantacija HMS-a može se izvesti s autolognim HMS-a (dobivenim od pacijenta) ili alogenim HMS-a (dobivenim od donora). Autologne HMS nemaju kliničke rizike odbacivanja i razvoja bolesti presatka protiv primatelja (engl. *graft-versus-host disease*, GvHD), međutim, za hematološko liječenje raka, autologna koštana srž ili periferna krv mogu sadržavati zaostale stanice raka, što može rezultirati recidivom. Glavni nedostatak alogene transplantacije HMS-a je GvHD, što rezultira potencijalno vrlo teškim i po život opasnim oboljenjima kože, crijeva i jetre. Također može dovesti do kašnjenja u rekonstituciji imunološkog sustava, što može rezultirati povećanim stopama infekcija, smrtnosti povezanom s liječenjem i kroničnim GvHD-om. Uspješna alogena transplantacija HMS-a značajno se oslanja na dostupnost odgovarajućeg izvora donora. Za pacijente bez podudarne braće i sestara ili rođaka, pronalaženje donora koji odgovara ljudskom leukocitnom antigenu može biti izazovno i dugotrajno (Hornberger i sur., 2019). Neobrađene HMS mogu se čuvati na +4°C do 72 sata nakon prikupljanja bez masovne apoptoze i gubitka funkcije. Unutar tog vremenskog razdoblja mogu se transplantirati bez ikakvih problema, no za dulje skladištenje potrebni su dodatni protokoli. Krioprotekcija HMS-a uvelike produljuje njihov vijek trajanja i povećava sigurnost terapije osiguravajući vrijeme za provođenje kontrole kvalitete (mikrobiološke) i testiranja proizvoda (sadržaj HMS-a, analiza kolonija, CD34+ brojanje). Osim toga, pohranjivanje krvi pupkovine za osobne (privatno bankarstvo) ili svrhe transplantacije (biobanke) postaje sve popularnije i može zahtijevati bankarstvo i do nekoliko desetljeća. Iz tog je razloga važno da HMS zadrže svoj potencijal tijekom zamrzavanja, skladištenja i odmrzavanja (Erol i sur., 2021).

## 2. Obrazloženje teme

HMS koriste se za liječenje širokog raspona zloćudnih bolesti hematopoeze, ali i raznih nemalignih bolesti i solidnih tumora. Stanična terapija zahtjeva stabilnu pohranu stanica, a krioprotekcija je najučinkovitiji proces pohrane stanica tijekom dugog razdoblja.

Krioprotekcija HMS-a osigurava dugotrajno skladištenje stanica kako bi se premostila vremenska odvojenost prikupljanja stanica i njihove primjene. Unatoč tim dobrobitima, krioprotekcija HMS-a predstavlja nekoliko izazova, od kojih je najznačajnije smanjenje vijabilnosti stanica nakon odmrzavanja i nuspojave kod pacijenata zbog korištenih krioprotektanata. Mnogi čimbenici u krioprotekciji utječu na ishod stanične terapije, kao što su odabir medija za zamrzavanje, brzina hlađenja, uvjeti skladištenja, način odmrzavanja i obrada nakon odmrzavanja. Standardna metoda krioprotekcije HMS-a uključuje upotrebu DMSO-a za kojeg je dokazana *in vitro* i *in vivo* toksičnost. Kao rezultat toga, terapija HMS-a može rezultirati brojnim štetnim simptomima kod pacijenata zbog infuzije DMSO-a.

Koncentracija DMSO-a varira između različitih centara u skladu s njihovim internim standardima i obično ostaje unutar određenog raspona od 5-10 %. Još uvijek se raspravlja o optimalnoj koncentraciji, iako niže koncentracije mogu rezultirati smanjenom toksičnošću stanica i nuspojavama tijekom i nakon transplantacije. Dodatno se istražuju alternativni krioprotektanti koji bi zamijenili upotrebu DMSO-a. Ulažu se veliki naponi kako bi se očuvala vijabilnost i funkcionalnost stanica tijekom cijelog procesa krioprotekcije budući da svaki korak nosi sa sobom potencijal oštećenja stanice. Standardiziranje metode krioprotekcije HMS-a važno je za smanjenje varijabilnosti između proizvoda, osiguravanje odgovarajućeg hematološkog oporavka i smanjenje nuspojava povezanih s infuzijom. Cilj ovog diplomskog rada je dati kratki pregled čimbenika koji utječu na uspješnu krioprotekciju hematopoetskih matičnih stanica te kritički raspraviti prednosti i nedostatke trenutno korištenih i istraživanih krioprotektanata.

### 3. Materijali i metode

Za izradu ovog preglednog diplomskog rada korišteni su znanstveni članci objavljeni od 2016. godine do danas pretraživani pomoću PubMeda. Pri tome su korištene ključne riječi: *cryopreservation of hematopoietic stem cells, cryotherapy, cryoprotectant, dimethyl sulfoxide, DMSO-free cryoprotectant, thawing protocol of cryopreserved hematopoietic stem cells, trehalose cryoprotectant, pentaisomaltose, antifreezeglycoproteins in cryopreservation.*

Literatura je obrađivana od općih prema specijaliziranim člancima i pritom su obrađena 46 literaturna navoda. Iako literatura nudi mnoge nove krioprotektante i nove metode krioprotekcije, ovaj rad obuhvaća većinom samo one koje su provedene na HMS-a.

## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1. Krioprotektanti

#### 4.1.1. DMSO

##### 4.1.1.1. Krioprotektivan učinak DMSO-a

DMSO je bio ključan agens za razvoj kriobiologije, i do dan danas je ostao zlatan standard. Korištenje DMSO-a kao krioprotektanta prvi su predložili Lovelock i Bishop davne 1959. kada su ga koristili tijekom sporog smrzavanja humanih i goveđih eritrocita te sperme bika (Weng i Beauchesne, 2020). Zahvaljujući niskoj hidrofilnosti i maloj molekularnoj masi, DMSO lako prolazi kroz staničnu membranu. Sprječava nukleaciju kristala leda stvarajući vodikove veze s unutarstaničnom vodom i sprječava dehidraciju smanjujući količinu vode apsorbiranu u kristale leda (Erol i sur., 2021). Dodatno, štiti stanice od oštećenja povezanih sa sporim brzinama hlađenja očuvanjem volumena stanica i smanjenjem „učinaka otopine“. Pri sporim brzinama hlađenja, stanice ulaze u dehidrirano stanje pri čemu neće doći do unutarstaničnog smrzavanja. Taj gubitak volumena ometa membrane i izlaže stanicu vrlo visokim koncentracijama otopljenih tvari koje oštećuju organele i proteine. DMSO učinkovito razrjeđuje otopljene tvari i smanjuje temperaturu na kojoj se postiže kritična koncentracija soli. U isto vrijeme, kako zamjenjuje vodu u stanici, tako sprječava pretjerano skupljanje stanice (Jahan i sur., 2020). DMSO može smanjiti konformacijski poremećaj membrane koji se javlja tijekom zamrzavanja i odgoditi početak denaturacije proteina tijekom ponovnog zagrijavanja (Weng i Beauchesne, 2020). Kao krioprotektant male molekularne mase, DMSO ima koligativna svojstva, što znači da prisutnost molekula DMSO-a u otopini snižava točku smrzavanja. Otopina vode i DMSO-a ima daleko nižu točku ledišta od čistih sastojaka (Hornberger i sur., 2019).

##### 4.1.1.2. Toksičan učinak DMSO-a

Unatoč njegovoj učinkovitosti u zaštiti stanica od krioštećenja, DMSO je povezan sa značajnom kliničkom toksičnošću. Budući da je DMSO visoko hiperosmolaran, brza infuzija krioprotektiranih stanica u izoosmotski krvni sustav može uzrokovati osmotsko oštećenje, prekomjerno širenje stanica i smanjenu vijabilnost stanica. To može uzrokovati trenutne

nuspojave, ali isto tako i dugoročno utjecati na presađivanje. Intravenska primjena DMSO-a povezana je s lokalnom iritacijom i nekrozom, a visoke koncentracije DMSO-a mogu izazvati trenutnu hemolizu, nakupljanje bijelih krvnih stanica i taloženje fibrinogena (Erol i sur., 2021). Infuzija staničnih proizvoda koji sadrže DMSO povezana je sa širokim rasponom nuspojava: gastrointestinalnih (mučnina, povraćanje, bolovi u trbuhu, proljev), kardiovaskularnih (hipertenzija, hipotenzija bradikardija, tahikardija), respiratornih (dispneja, plućni edemi), dermatoloških (urtikarija, svrbež i crvenilo), alergijskih i neuroloških (epileptički napadaji), tresavica, neugodan miris nalik češnjaku (Erol i sur., 2021; Yao i Matosevic, 2021; Trummer i sur., 2020; Hornberger i sur., 2019).

*In vitro* je dokazano da prisutnost DMSO-a uzrokuje staničnu smrti, ugrožava propusnost membrane i izaziva neželjene epigenetske promjene (Yao i Matosevic, 2021). Produljena izloženost DMSO-u negativno utječe na staničnu funkciju i rast ometanjem metabolizma, enzimske aktivnosti, staničnog ciklusa i apoptoze. Iz tog je razloga vremenska izloženost stanica DMSO-u ograničena na 30 minuta prije zamrzavanja i poslije odmrzavanja (Li i sur., 2019). Smatra se da DMSO mijenja unutarstanične koncentracije kalcija i može inducirati ili inhibirati apoptozu i diferencijaciju, ovisno o tipu stanice, stupnju rasta i diferencijacije stanice, koncentraciji DMSO-a, trajanju izloženosti i temperaturi. Čak i vrlo niske koncentracije DMSO-a mogu utjecati na stanične procese uzrokujući promijenjenu ekspresiju gena, mijenjajući metilaciju DNA i deregulirajući tkivno specifične miRNA, te mogu utjecati na sudbinu matičnih stanica izazivanjem neželjene diferencijacije (Erol i sur., 2021; Verheijen i sur., 2019). Zabilježeno je da uzrokuje oštećenje funkcije imunoloških stanica, uključujući supresiju proizvodnje proupalnih citokina i kemokina te gubitak vijabilnosti imunoloških stanica (Yao i Matosevic, 2021). Molekularno modeliranje sugerira da DMSO mijenja strukturu i funkciju stanične membrane odnosno da može imati učinak stanjivanja membrane, stvarajući pore pri većim koncentracijama, koji je djelom odgovoran za njegove različite farmakološke učinke (Weng i Beauchesne, 2020; Hornberger i sur., 2019). Utvrđeno je da DMSO destabilizira proteine hidrofobnim interakcijama na temperaturi iznad nule, za razliku od stabilizirajućeg učinka na nižoj temperaturi (Weng i Beauchesne, 2020).

Kako bi se smanjili toksični učinci DMSO-om krioprotektiranih HMS-a tijekom transplantacije, infuzije se mogu podijeliti u više dijelova, danih u intervalima od nekoliko sati ili dana, ili alternativno koncentrirati daljnje transplantate HMS-a kako bi se smanjio krioprotektirani volumen i sadržaj DMSO-a. Dodatno, ispituju se alternative kao što su



različiti krioprotektanti za smanjenje ili zamjenu DMSO-a za krioprotekciju ili potpuno uklanjanje DMSO-a prije infuzije (Erol i sur., 2021).

#### 4.1.1.3. Smanjenje koncentracije DMSO-a

Velika većina trenutnih kliničkih i predkliničkih protokola krioprotekcije koristi DMSO u koncentracijama od 10% u kombinaciji s ksenogenskom komponentom kao što je fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) ili s ljudskim serumskim albuminom (Yao i Matosevic, 2021). Tijekom godina, DMSO je bio krioprotektant izbora u većini studija. Testiran je u različitim koncentracijama, od 2,5% do 10% s promjenjivim rezultatima. Općenito, niže doze DMSO-a pokazale su manju toksičnost, ali u nekim slučajevima i smanjenu vijabilnost stanica. Trummer i sur. (2020) usporedili su komercijalno dostupan krioprotektant PRIME XV-FreezIS (FreezIS) s *in-house* formuliranim DMSO-om od 5% i 10%. FreezIS je gotova otopina spremna za upotrebu, bez proteina i životinjskih komponenti, koja sadrži DMSO. Dizajnirana je za pripremu i čuvanje stanica tijekom skladištenja u zamrzivaču (-80°C – -196°C), te za poboljšanje vijabilnosti stanica nakon odmrzavanja i za oporavak funkcionalnosti ([www.irvinesci.com](http://www.irvinesci.com)). FreezIS je dostupan za komercijalnu i kliničku laboratorijsku upotrebu od 2014. godine. Komercijalno dostupan FreezIS sadrži 10% DMSO, no kada se koristi u omjeru 1:1, konačna koncentracija DMSO-a je 5%. Dobiveni rezultati studije pokazali su da smanjenje koncentracije DMSO-a s 10% na 5% značajno smanjuje nuspojave povezanih s infuzijom te poboljšava oporavak i vijabilnost CD34+ stanica. Dodatno, FreezIS rezultirao je s oporavkom i očuvanom funkcionalnošću HMS-a usporedivo s *in-house* 5% DMSO-om sa slično niskim stopama nuspojave povezanih s infuzijom. Unaprijed konstituirana priroda ovog medija smanjuje rukovanje i osigurava ponovljivost u različitim uređajima i institucijama.

#### 4.1.1.4. Uklanjanje DMSO-a prije infuzije

Kako bi se smanjile *in vivo* nuspojave povezane s toksičnošću DMSO-a nakon infuzije, i kako bi se stanice zaštitile od citotoksičnosti DMSO-a, često se uvodi korak ispiranja stanica prije infuzije. Ispiranje se obično provodi postupnim razrjeđivanjem kako bi se izbjeglo osmotsko

oštećenje stanica. Otopina za pranje često sadrži membrana-nepropusne krioprotektante, kao što su šećeri, kako bi se ublažio prodor vode u stanicu, koji se obično događa većom brzinom od brzine difuzije krioprotektanta iz stanice. Time se izbjegava osmotsko bubrenje i posljedično oštećenje stanice. Optimizacija uklanjanja DMSO-a zahtijeva poznavanje granica osmotske tolerancije određene vrste stanica koje se odmrzavaju i kombinaciju parametara uključujući sastav otopine za pranje i brzinu dodavanja. Za otopine koje uzrokuju veće osmotske razlike između unutarnje i vanjske strane stanica, stope razrjeđivanja obično su sporije. Za razliku od membrana-propusnih krioprotektanta, membrana-nepropusni krioprotektanti ne difundiraju u i izvan stanice, čime se olakšava njihovo uklanjanje (Yao i Matosevic, 2021). Općenito, DMSO se uklanja ili ručno ili pomoću uređaja. Uklanjanje DMSO-a potpomognuto uređajem omogućuje automatizaciju procesa i djeluje na temelju sekvencijalnog razrjeđivanja i centrifugiranja ili koraka razrjeđivanja i filtracije. U raznim studijama u kojima su se koristili komercijalno dostupni uređaji za pranje, dokazan je visok oporavak vijabilnih CD34+ stanica s dobrim potencijalom usađivanja nakon automatiziranog pranja (Hornberger i sur., 2019). Nove metode uklanjanja DMSO-a bez ovisnosti o centrifugiranju, uključujući filtraciju rotirajućom membranom, ekstrakciju DMSO-a difuzijom u mikrofluidnim kanalima i razrjeđivanje kroz membrane sa šupljim vlaknima. Filtracija pomoću rotirajuće membrane omogućuje da stanična suspenzija smanji volumen i završi u malom volumenu svježe otopine. Prednost ove metode je mali rizik od kontaminacije, a nedostatak gubitak stanica zbog zgrušavanja, te visoka cijena. Mikrofluidika se može koristiti za uklanjanje DMSO-a pomoću paralelnih struja stanične suspenzije i otopine za pranje. Ova metoda ograničena je na male uzorke, dok se za veće koriste membrane od šupljih vlakana. Uređaj se sastoji od velike cilindrične cijevi ispunjene tisućama tankih šupljih vlakana. Stanična suspenzija teče kroz tanka vlakna, a otopina za pranje teče kroz veću cijev u suprotnom smjeru. DMSO se prenosi iz stanice i na taj način ispire (Hornberger i sur., 2019).

Santurette i sur. (2022) usporedili su automatizirani uređaj koji koristi filtraciju rotirajuće membrane (Lovo) i poluautomatski sustav koji koristi tradicionalnu metodu centrifugiranja (COBE 2991). Iako su oba uređaja učinkovito uklonila DMSO (>97%), Lovo je pokazao bolji oporavak stanica CD34+ u usporedbi s COBE 2991 s održivom vijabilnosti tijekom vremena, što je korisno u slučaju odgođene transplantacije. Učinkovitost Lovo uređaja neovisna je o broju obrađenih odmrznutih vrećica HMS-a i otopina za pranje te zahtijeva jednog člana osoblja bez obzira na broj obrađenih vrećica. Dok se na COBE 2991 kit mogu spojiti najviše

tri vrećice, Lovo može obraditi do 21 L, što ga čini bržom solucijom u slučaju potreba pranja veće količine krioprotektiranih HMS-a.

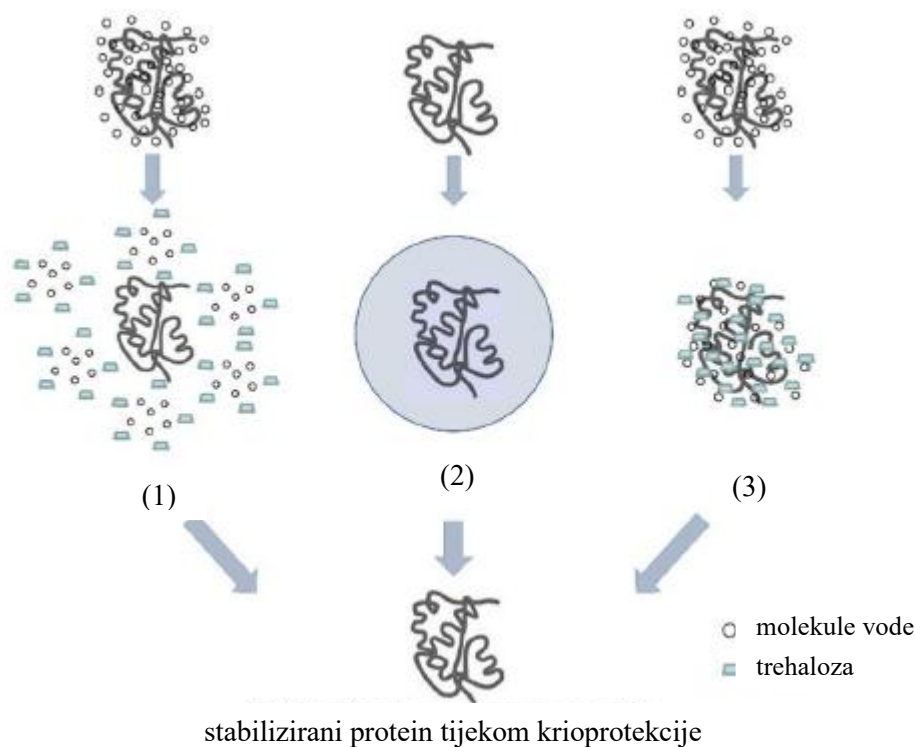
Iako se pokazalo da uklanjanje DMSO-a prije infuzije smanjuje nuspojave, metode nose dodatne probleme. Klasično ručno pranje zahtijeva puno vremena te predstavlja rizik od kontaminacije stanica, dok su automatizirane metode skupe. Oba pristupa dovode do gubitka stanica što produžuje vrijeme usađivanja stanica.

## 4.1.2. Alternative i dodaci DMSO-u

### 4.1.2.1. Šećeri i alkoholi

Mnogi organizmi u prirodi, uključujući bakterije, gljivice, insekticide, biljke i neke beskralježnjake, mogu postojati u dehidriranom obliku dulje vrijeme kroz fenomen koji se naziva anhidrobioza („život bez vode“). Nakupljajući šećere u tijelu, poput trehaloze i saharoze, preživljavaju ekstremne dehidracije i hladnoće. Šećeri štite stanice tijekom zamrzavanja stabilizirajući membrane i proteine putem vodikovih veza. Trehaloza je netoksični disaharid glukoze vezan  $\alpha$ -1,1-glikozidnom vezom. Acetalna veza sprječava redukciju C-1 u svakom monomeru što povećava njezinu stabilnost pri ekstremnim temperaturama i smanjuje osjetljivost na kiselu hidrolizu u uvjetima niske pH vrijednosti (Whaley i sur., 2021). Hu i sur. (2023) navode tri hipoteze o mehanizmima krioprotektivnog učinka trehaloze (Slika 4.). Prema (1) teoriji preferencijalne isključenosti, trehaloza ne stupa u izravnu interakciju s biološkim makromolekulama, već se natječe s njima oko molekula vode što dovodi do destrukcije hidratacijskog sloja oko biomolekula i stvaranja istog oko molekula trehaloze. Trehaloza stvara vodikove veze s vodom u svim usmjerenjima što uništava tetraedarsku mrežu molekula vode čime učinkovito ometa kristalizaciju leda. Drži molekule vode dalje od proteina, smanjujući njihov hidratizirani radijus i poboljšavajući njihovu kompaktnost i stabilnost kako bi se učinkovito spriječila denaturacija proteinskih molekula. (2) Vitifikacijska teorija govori o sposobnosti trehaloze skrućivanja od tekućine do stakla. Zbog svojih snažnih intermolekularnih interakcija, različitih polimorfnih oblika i visoke temperature staklastog prijelaza, otopina trehaloze tijekom zamrzavanja brzo povećava viskoznost i stvara stabilno stakleno nekristalno stanje. (3) Teorija zamjene vode odnosi se na izravnu interakciju trehaloze s biološkim strukturnama preko vodikovih veza. Stvarajući vodikove veze s proteinima i polarnim skupinama fosfolipida omogućava biomolekulama da

održe integritet strukture stanične membrane prilikom smrzavanja. Trehaloza djeluje kao stabilizator membrana, ali i proteina. Tijekom krioprotekcije, smatra se da sprječava inaktivaciju i agregaciju proteina pri niskim temperaturama. Također, nespecifično stabilizira i unutarstanične nukleinske kiseline i druge makromolekule, što dovodi do smanjenja pojave unutarstaničnog leda tijekom smrzavanja. Trehaloza povećava propusnost membrane za vodu na temperaturama ispod ništice i smanjuje količinu vode u stanici prije zamrzavanja, čime se smanjuje vjerojatnost unutarstaničnog leda tijekom zamrzavanja te sprječava pretjerano oticanje i osmotski šok.



Slika 4. Ilustracija različitih mehanizama krioprotektivnog učinka trehaloze: (1) teorija preferencijalne isključenosti; (2) vitrifikacijska teorija; (3) teorija zamjene vode (preuzeto i prilagođeno prema Hu i sur., 2023).

Trehaloza, kao prirodni šećer, nije toksična za stanice. Može se nespecifično metabolizirati, izlučiti egzocitozom ili razrijediti diobom stanica. Stanice sisavaca toleriraju unutarstaničnu trehalozu od najmanje 0,2 M bez oštećenja funkcija. Iz tih razloga, trehaloza se ne mora eliminirati iz krioprotektiranih stanica prije infuzije. Trehaloza je membrana-nepropusni krioprotektant zbog svoje velike molekularne mase i zbog činjenice da trehalozu ne proizvode stanice sisavaca pa posljedično ne postoje njeni transporteri. Za postizanje dovoljnog

krioprotektivnog učinka, trehaloza se mora dostaviti u stanice različitim metodama ili se mora kombinirati s drugim krioprotektantima. Kratki pregled istraživanih metoda kojima se trehaloza može dostaviti u stanice, zajedno s njihovim prednostima i ograničenjima prikazan je u tablici 1. Dokazano je da unutarstanična i izvanstanična trehaloza značajno povećava vijabilnost stanica u usporedbi sa samo izvanstaničnom. Za učinkovitu krioprotekciju, metoda unosa trehaloze u stanice ne bi trebala značajno promijeniti staničnu strukturu i funkciju ili dovesti do oštećenja i smrti stanice. Poželjne su metode koje dopuštaju selektivni unos trehaloze, jer ulazak ili izlazak drugih molekula može imati nepoželjan učinak. Nadalje, poželjne su metode koje omogućuju brz unos trehaloze jer inkubacija stanica obično treba biti dovršena unutar 24 sata (Hu i sur., 2023). Istraživana je krioprotekcija hematopoetske stanične linije, TF-1 stanica, s trehalozom kao krioprotektantom i  $\alpha$ -hemolizinom. TF-1 je eritroleukemijska stanična linija, CD34+, koja ima sposobnost diferencijacije u eritroidne, monocitne i megakariocitne linije te se koristi kao surogat za nezrele hematopoetske matične stanice.  $\alpha$ -hemolizin je protein iz *Staphylococcus aureus* koji stvara pore u staničnoj membrani. Stvorene neselektivne pore koje su osjetljive na izvanstaničnu koncentraciju cinka, omogućile su kontrolirani ulazak trehaloze u stanice. Stanice su bile pohranjene na  $-80^{\circ}\text{C}$  tjedan dana, zamrznute s trehalozom i izvan i unutar stanica. Stvorene CFU po veličini, morfologiji i broju bile su usporedive sa zamrznutim u 10% DMSO-u, te nije bilo vidljivih promjena u fenotipskim markerima diferencijacije između skupina tretiranih trehalozom i DMSO-om (Weng i Beauchesne, 2020). Iako je  $\alpha$ -hemolizin omogućio permeabilizaciju stanične membrane i krioprotekciju, kao egzogeni protein koji potječe iz bakterija, trebao bi biti uklonjen prije nego što bi se stanice mogle koristiti za staničnu terapiju, jer bi mogao generirati neželjeni imunološki odgovor. Istraživana je i aktivacija transmembranskog staničnog receptora P2Z kako bi se formirale neselektivne pore u membrani. P2Z je purinergički receptorski kanal koji se otvara u prisutnosti izvanstaničnog adenzin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*, ATP) i zatvara nakon dodatka magnezija. Postignut je priljev 200 mM trehaloze u HMS nakon čega su bile krioprotektirane. Stanice sačuvane trehalozom stvorile su 90% kolonija koje su proizvele netretirane kontrolne stanice, u usporedbi sa stanicama sačuvanim DMSO-om koje su stvorile samo 70% kolonija proizvedenih netretiranom kontrolom. Iako je ova strategija korisna u tome što iskorištava prirodnu staničnu komponentu za punjenje trehaloze, povećanje vremena poracije pokazalo je veliko smanjenje preživljavanja stanica, a maksimiziranje unutarstanične koncentracije trehaloze značilo je žrtvovanje stanične vijabilnosti. Obje metode stvaranja neselektivnih pora u membrani mogu dopustiti ne samo ulaz trehaloze, već istovremeno i ulaz i izlaz neželjenih

molekula. Također, stimulacija receptora P2Z može dovesti do apoptoze, nekroze ili neoplazije (Stewart i He, 2019).

Tablica 1. Kratki pregled istraživanih metoda unosa trehaloze u stanice, zajedno s njihovim prednostima i ograničenjima.

METODA UNOSA TREHALOZE U STANICU	PREDNOSTI	OGRANIČENJA
promjena fosfolipidne faze (termalnim, osmotskim ili električnim stresom)	povećana propusnost membrane i kontroliran ulazak trehaloze u stanice pomoću koncentracijskog gradijenta	hipertonična otopina trehaloze može uzrokovati morfološka oštećenja stanice, povećana propusnost membrane nespecifično dopušta ulazak i drugih tvari, narušena stabilnost membrane termalnim, osmotskim ili električnim šokom
stvaranje pora ( $\alpha$ -hemolizin)	ulazak trehaloze u niskim koncentracijama	invazivna metoda koja može oštetiti stanice
mikroinjektiranje	jedinstvena metoda za oocite	teško primjenjiva za manje stanice i velike količine
transporter trehaloze 1 (engl. <i>trehalose transporter 1</i> , TRET1) (izoliran iz anhidrobiotske ličinke afričkog hironomida)	specifičan i učinkovit ulazak trehaloze kroz staničnu membranu	potrebna genetska modifikacija stanica
sintetski polimeri koji prolazno povećavaju propusnost membrane	ulazak visoke koncentracije trehaloze pri relativno niskim osmolaritetima	dugo vrijeme inkubacije

liposomi	biokompatibilnost sa staničnim membranama	ulazak premalih koncentracija trehaloze, neučinkovito oslobađanje trehaloze iz vezikula
trehaloza inkapsulirana u nanočesticama	neinvazivna metoda, endocitoza nanočestica zbog njihove biokompatibilnosti, specifičan ulazak velike količine trehaloze u stanice bez modifikacija stanice	dugo razdoblje inkubacije
endocitoza	prirodan proces	nedovoljan ulazak trehaloze, dugo vrijeme inkubacije, hipertonična otopina trehaloze može uzrokovati morfološka oštećenja stanice
sonoporacija	brz i kontroliran ulazak trehaloze u stanicu	nespecifična propusnost membrane, ultrazvukovi mogu oslabiti aktivnost ili promijeniti morfologiju stanice
lipofilni derivati trehaloze (trehaloza heksaacetat)	derivati ne oštećuju stanicu, lako prolaze staničnu membranu i hidroliziraju se unutarstaničnim esterazama	najsporija od metoda koje uključuju perforaciju membrane

Drugi pristup krioprotekcije trehalozom je kombinacija s drugim membrana-propusnim krioprotektantima, kao što su DMSO, glicerol i EG. Prisutnost trehaloze kao dodatka u krioprotektivnoj otopini može značajno utjecati na morfologiju, oblik i veličinu formiranja kristala leda što može imati značajnu ulogu u ublažavanju fizičkih oštećenja zbog napredovanja kristala leda tijekom smrzavanja. Solocinski i sur. (2017) utvrdili su da dodavanje trehaloze u otopinu krioprotektanta koja sadrži 10% DMSO drastično smanjuje

površinu kristala leda i povećava broj nukleacijskih mjesta. Kako se molekule vode jače vežu za šećer nego za druge molekule vode, smanjuje se njena dostupnost u stvaranju kristala leda te nastaju kristali manje veličine. Brzi rast velikih kristala leda u izvanstaničnom prostoru povećava mogućnost oštećenja stanične membrane, pa posljedično stvaranje malih kristala zbog dodatka trehaloze ublažava moguća fizička oštećenja. Iako dodatak trehaloze u otopinu krioprotektanta povećava osmotski stres, integritet membrane i metabolička aktivnost nisu bili negativno pogođeni. To potvrđuje da struktura kristala leda ima izravan utjecaj na rezultate krioprotekcije i da se može modulirati dodavanjem šećernih aditiva u krioprotektansku otopinu.

Alkoholi, poput glicerola, utječu na vodikovu vezu između molekula vode, modificirajući na taj način zamrzavanje vode oko stanica i mijenjajući morfologiju kristala leda kako bi se smanjila oštećenja stanica. Također, inhibiraju stvaranje unutarstaničnog leda jačanjem vodikovih veza s nezamrznutom vodom (Weng i Beauchesne, 2020). Glicerol je jednostavan triolni spoj. Njegovi krioprotektivni učinci poznati su od ranih 1950-ih, kada je prvi put ispitan na spermatozoidima peradi, eritrocitima kunića i vodenoj amebi. Glicerol je koligativan krioprotektant koji sprječava oštećenja uzrokovana dehidracijom tako što povećava ukupnu koncentraciju otopine, uključujući natrijeve ione, čime se sprječava stvaranje leda i smanjuje količina vode apsorbirana na kristale leda. Glicerol u niskim koncentracijama (20%) nije dovoljan za potpuno sprječavanje kristalizacije, ali povoljno štiti stanice od smrti. Visoke koncentracije glicerola (70%) korištene su bez značajne toksičnosti i pokazalo se da pružaju značajnu zaštitu (Erol i sur., 2021).

Ntai i sur. (2018) pokazali su uspješnu krioprotekciju pluripotentnih matičnih stanica koristeći trehalozu samu i u kombinaciji s EG-om i glicerolom. Koristili su četiri različite otopine krioprotektanta (0,5 M trehaloza; 0,5 M trehaloza + 2,5% EG; 0,5 M trehaloza + 10% EG; 0,5 M trehaloza + 10% glicerol) i 10% DMSO kao kontrolu. Matične stanice pokazale su dobru vijabilnost, genomsku stabilnost, pluripotentnost i sposobnost diferencijacije nakon odmrzavanja. Ova studija pokazala je da 0,5 M trehaloza s dodatkom 10% EG-a ili glicerola može pomoći u postizanju prihvatljive stanične vijabilnosti i visoke stabilnosti uz zadržani potencijal samoobnavljanja i pluripotentnost, slično standardu od 10% DMSO. Kombinacija trehaloze s EG-om ili glicerolom je bolja solucija od kombinacije s DMSO-om, budući da su EG i glicerol manje toksični nego DMSO.



Pomeisl i sur. (2020) spojili su dva membrana-nepropusna krioprotektanta, PEG i trehalozu u nove kemijske spojeve – hibride pegilirane trehaloze. Proučavali su krioprotektivne učinke mješavina trehaloze i PEG-ova različitih duljina lanaca te hibrida pegilirane trehaloze. Trehaloza se interkalira u vanjski fosfolipidni sloj stanične membrane i stabilizira ga vezujući se za polarne dijelove fosfolipida vodikovim vezama. PEG inhibira rast kristala leda i povećava toničnost krioprotektivnih otopina što pomaže u sprječavanju ozljeda uslijed hlađenja. S druge strane, visoke koncentracije PEG-a mijenjaju površinu stanične membrane tako što uklanjaju hidratacijski sloj što sprječava blisko spajanje konvergentnih fosfolipidnih dvosloja. Interakcije PEG-a s vodom povećavaju odbojnost polarnih glava fosfolipida što rezultira destabilizacijom stanične membrane. Niži krioprotektivni učinak pegiliranih hibrida u odnosu na mješavinu PEG-a i trehaloze mogao bi se objasniti specifičnom interakcijom trehaloze i PEG-a sa staničnim membranama. Trehaloza zamjenjuje vodu na površini stanice. Kratki PEG-ovi uklanjaju površinski hidratacijski sloj stanice koji destabilizira staničnu membranu (nizak krioprotektivni učinak). Duži PEG lanci ne destabiliziraju tako snažno staničnu površinu i djeluju krioprotektivno uglavnom inhibirajući rast kristala leda (veći krioprotektivni učinak) – dugi PEG mogu imati više konformacija koje ih sprječavaju da se lijepe bliže membranama od kraćih PEG-ova. Ako se PEG dugog lanca i trehaloza pomiješaju, vodu na površini zamjenjuje zaštitna trehaloza, a dugi lanac PEG-a inhibira rast kristala leda i zbog činjenice da PEG-ovi nisu blizu površine stanice, ne destabiliziraju bitno staničnu membranu. Međutim, ako su PEG i trehaloza kemijski povezani u pegilirani hibrid, trehaloza se adsorbira na staničnu površinu, a molekule PEG-a koje su zbog kemijskog vezivanja s trehalozom blizu stanične površine uklanjaju hidratacijski sloj stanične površine i destabiliziraju staničnu membranu. U ovoj studiji primijenjena je nova tehnika za proučavanje svojstva trehaloze i PEG-a što je dalo uvid u bolje razumijevanje molekularnih djelovanja krioprotektanata.

Dekstran je razgranati polisaharid s  $\alpha$ -1,6-glikozidnim vezama između molekula glukoze. Dekstran može reagirati s lipoproteinima, enzimima i stanicama te ima sposobnost stabiliziranja proteina. Dekstran je netoksičan i blago antigeničan. Obično se koristi u koncentracijama od 10%, ali u kombinaciji s drugim krioprotektantima (DMSO ili glicerol). Koristio se u krioprotekciji HMS-a i spermija. Hidroksietilni škrob (engl. *hydroxyethyl starch*, HES) je sintetski polimer velike molekularne mase. Može se pročititi iz kukuruza ili krumpira. Zbog svoje veličine, ne može ući u stanicu, već se akumulira izvanstanično gdje ispoljava krioprotektivne učinke. Regulira protok vode tijekom hlađenja i grijanja, upija

molekule vode i održava ih toplinski inertnima. Iako ostaje izvan stanica, smanjuje unutarstanično stvaranje kristala leda i stabilizira staničnu membranu. Povećavajući izvanstaničnu viskoznost, sprječava osmotski stres i oštećivanje tako što smanjuje brzinu povlačenja vode iz stanica tijekom hlađenja (Erol i sur., 2021). Pentaizomaltoza (engl. *pentaisomaltose*, PIM) je ugljikohidrat male molekulske mase (1 kDa), biokompatibilan je i za razliku od dekstrana, nakon infuzije ne uzrokuje imunološke nuspojave. Nije dokazana nikakva stanična toksičnost povezana s PIM-om, pa njegovo korištenje za krioprotekciju HMS-a može eliminirati potrebu za infuzijom hladnih stanica koje su potrebne za proizvode koji sadrže DMSO. Nadalje, niskomolekularni PIM se brzo i potpuno izlučuje glomerularnom filtracijom, i za razliku od DMSO-a, PIM ne stvara potencijalno štetne metabolite kada se razgrađuje u ljudskom tijelu. PIM ima srednju masu od 1080 Da (5-6 jedinica glukoze), ali distribucija mase je šira, u rasponu od pojedinačnih molekula glukoze do polisaharidnih lanaca s više od 15 jedinica glukoze. Točan mehanizam kojim PIM može djelovati kao uspješan krioprotektant CD34+ stanica još nije istražen. Krioprotektivni učinak mogao bi biti rezultat nekoliko sinergističkih svojstava: sposobnost disaharida za interakciju s polarnim skupinama fosfolipida i stabilizaciju membrana tijekom hipertonične izloženosti za vrijeme rasta kristala leda te sposobnost većih polisaharida koji povećavaju viskoznost i smanjuju osmotski stres. Zbog svoje veličine, pretpostavlja se da PIM ostaje u izvanstaničnom prostoru, a unos glukoze pomoću GLUT transportera ili pinocitoze je zanemariv jer se stanice i otopine drže na ledu tijekom zamrzavanja. Svalgaard i sur. (2016) u svojoj studiji pokazali su da PIM ima ekvivalentnu učinkovitost kao DMSO u krioprotekciji HMS-a iz periferne krvi. Nisu pronašli razlike u pogledu oporavka CD34+ stanica, učestalosti subpopulacije CD34+ ili potencijala stvaranja CFU između stanica krioprotektiranih u PIM-u u odnosu na DMSO. Rezultati su pokazali da bi PIM potencijalno mogao zamijeniti DMSO kao sigurniji krioprotektant. U drugoj pretkliničkoj *in vivo* studiji (2018), Svalgaard i sur. pokazali su uspješno hematopoetsko presađivanje HMS-a krioprotektiranih u PIM-u u modelu miša koji razvija višelinjske hematopoetske stanice nakon transplantacije ljudskih HMS-a. Ovo je bila prva demonstracija da se HMS mogu krioprotektirati bez DMSO-a i održati visoku aktivnost usađivanja ta da PIM može djelovati samostalno kao netoksični krioprotektant. Haastrup i sur. (2021) u svojoj kliničkoj studiji pokazali su da 10% PIM smanjuje koncentraciju DMSO-a na svega 1 – 2% potrebnu za učinkovitu krioprotekciju T-stanica. T-stanice krioprotektirane s 10% PIM i 2% DMSO pokazale su veću vijabilnost i bolju sposobnost proliferacije no stanice krioprotektirane s 10% DMSO.

Kaushal i sur. (2022) usporedili su krioprotektivne učinke PIM-a i tri komercijalno dostupna krioprotektanta bez DMSO-a za HMS iz krvi pupkovine s tradicionalnim krioprotektantom DMSO/dekstran. CryoScarless (CSL) je medij bez ksenogenih komponenti i seruma formuliran za dugotrajno skladištenje stanica na  $-80^{\circ}\text{C}$  ili u tekućem dušiku. CryoNovo P24 (CN) je u potpunosti proizveden od prirodnih krioprotektanata. CryoProtectPureSTEM (CPP-STEM) je krioprotektant na bazi soli bez DMSO-a i seruma koji sadrži derivate glikola i netoksične proteinske komponente ksenogenog podrijetla s malim imunogenim implikacijama. Od četiri testirane otopine za krioprotekciju, CPP-STEM omogućio je najbolji oporavak vijabilnih CD45<sup>+</sup> i CD34<sup>+</sup> stanica nakon odmrzavanja i najbolju zaštitu od gubitka integriteta staničnih membrana (kao i DMSO). Također se pokazalo da CPP-STEM zadržava visoku moć i aktivnost presađivanja HMS-a, što ga čini krioprotektantom od interesa za HMS iz krvi pupkovine. CSL je postigao druge najbolje rezultate, a slijede ga PIM i, konačno, CN, koji je pružio najnižu vijabilnost i oporavak. PIM nije pokazao odgovarajući oporavak i vijabilnost CD45<sup>+</sup> i CD34<sup>+</sup> stanica u odnosu na DMSO. Za razliku od izvornih studija gdje se PIM koristio za krioprotekciju HMS-a iz periferne krvi, ova studija isključuje korištenje samostalnog PIM-a u krioprotekciji HMS-a iz krvi pupkovine. PIM ne uspijeva na odgovarajući način zaštititi HMS od krioozljeda, što dovodi do pucanja stanične membrane, vjerojatno zbog pretjeranog stvaranja intracelularnog leda. Učinkovita kombinacija PIM-a s membrana-propusnim DMSO-om u koncentraciji od svega 2% u krioprotekciji T-stanica (iz studije Haastrup i sur., 2021) podupire strategiju kombiniranja izvanstaničnih i unutarstaničnih krioprotektanta za optimizaciju krioprotekcije.

#### 4.1.2.2. Inhibitori rekristalizacije leda

Kako bi se smanjila ili izbjegla upotreba tradicionalnih krioprotektanta kao što je DMSO, specijalizirani polimeri i male molekule mogu se dizajnirati tako da oponašaju prirodne (gliko)proteine protiv smrzavanja (engl. *antifreeze (glycol)proteins*, AF(G)Ps). Vrste koje izbjegavaju zamrzavanje, kao što su antarktičke ribe, koriste AF(G)P za modulaciju učinka leda na žive stanice kroz toplinsku histerezu, dinamičko oblikovanje leda i inhibiciju rekristalizacije leda. Posljednjih godina istraživači su pronašli ili sintetizirali sve veći broj spojeva koji pokazuju AF(G)P funkcije, kao što su O-arilglikozid, N-aril-d-alidonamidi,

poli(vinil alkohol) (engl. *poly(vinyl alcohol)*, PVA), poliamfolit i poliprolin (Weng i Beauchesne, 2020).

Inhibitori rekristalizacije leda (engl. *ice recrystallization inhibitors*, IRIs) sprječavaju rast kristala tijekom zamrzavanja i odmrzavanja. Vežu se na površinu kristala leda što ometa njihov rast. Prirodni antifrizni glikoprotein AFGP je polipeptid sa specifičnim ponavljajućim jedinicama [L-Ala-L-Ala-L-Thr-g-disaharida], gdje je disaharid galaktoza-N-acetil galaktozamin. Hidrofobni dialanin i hidrofilni disaharid u ponavljajućoj jedinici AFGP-a omogućuju povoljne interakcije polimera s kristalima leda. Uravnotežena struktura hidrofilnih i hidrofobnih svojstava ključna je u dizajniranju učinkovitog IRI spoja zbog činjenice da su površine kristala leda prilično hidrofobne. Struktura im mora omogućiti prijanjanje na površinu kristala leda, a sprječati međusobno spajanje (Piao i sur., 2022).

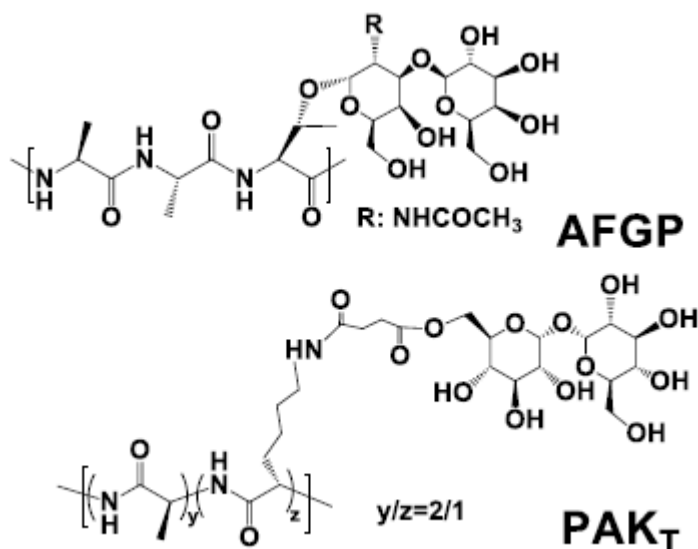
Briard i sur. (2016) sintetizirali su niz N-aril-d-alidonamida i procijenili njihovu sposobnost inhibicije rekristalizacije leda. Koristeći ih kao dodatke konvencionalnoj krioprotektantskoj otopini (10% DMSO i dekstran u 0,9% fiziološkoj otopini) u krioprotekciji HMS-a iz krvi pupkovine, pokazali su poboljšanu funkciju HMS-a nakon odmrzavanja. Njihovi rezultati upućuju da IRI spojevi imaju zaštitni učinak na sposobnost CD34+ stanica da proliferiraju i diferenciraju nakon odmrzavanja.

Jahan i sur. (2020) krioprotektirali su stanice krvi iz pupčane vrpce 10% DMSO-om uz dodatak N-(2-fluorofenil)-D-glukonamid. Analize nakon odmrzavanja pokazale su da je korišteni IRI netoksičan za HMS te da nije utjecao na samoobnavljanje i diferencijaciju stanica. Nadalje, stanice iz krvi pupkovine krioprotektirane uz dodatak IRI pokazale su bolje usađivanje trombocita i poboljšano dugoročno usađivanje koštane srži od onih krioprotektiranih samo DMSO-om. Ova je studija dokazala je da nadopuna krioprotektantske otopine s IRI može povećati vijabilnost i funkciju HMS-a nakon odmrzavanja te poboljšati ishode presađivanja.

Gilfanova i sur. (2021) testirali su nove krioprotektante inspirirane prirodnom strukturom AFGP-a na HMS-ma iz koštane srži. XT-Thrive-A i XT-Thrive-B su sintetski krioprotektanti bez DMSO-a, seruma i proteina koji kontroliraju stvaranje leda. Sadrže dodatne hranjive tvari, kao što su saharidi za energiju, soli za održavanje ionske ravnoteže, stabilizatore membrane za jačanje membrane na niskim temperaturama, antioksidanse za hvatanje slobodnih radikala i druge molekule za održavanje odgovarajuće osmotske ravnoteže. Usporedili su njihove učinke s 10% DMSO-om na preživljavanje stanica nakon odmrzavanja,

na kratkoročnu proliferaciju nakon 72 sata te na usađivanje HMS-a u imunodeficientnim miševima 12 tjedana nakon transplantacije. Broj vijabilnih stanica nakon odmrzavanja bio je statistički isti za stanice krioprotektirane u XT-Thrive-A, XT-Thrive-B i DMSO-u, a nakon *in vitro* proliferacije za stanice krioprotektirane XT-Thrive-B bio je viši nego kod DMSO-a. Učestalost matičnih stanica izmjerena je 12 tjedana nakon transplantacije na temelju usađivanja eritroidnih, mijeloidnih, B-limfoidnih i CD34+ progenitora u koštanu srž mjereno protočnom citometrijom. Nisu primijećene značajne razlike u učinkovitosti triju krioprotektanata u procjeni usađivanja HMS-a u miševe. Ova studija pokazuje da krioprotektanti razvijeni biomimikom prirodnih proteina protiv smrzavanja nude zamjenu za toksičan DMSO za krioprotekciju HMS-a.

Piao i sur. (2022) dizajnirali su i istražili poli(Ala-co-Lys)-g-trehalozu (engl. *poly(L-alanine-co-L-lysine)-graft-trehalose*, PAK<sub>T</sub>) kao mimetički sustav AFGP-a i potencijalni nositelj trehaloze. Usporedba strukture AFGP-a i PAK<sub>T</sub>-a prikazana je na slici 5. PAK<sub>T</sub> je nasumični kopolimer L-Ala i L-Lys-g-disaharida s omjerom 2/1 L-Ala/L-Lys-g-disaharida po molu, gdje je disaharid trehaloza. Usporedili su oporavak stanica nakon krioprotekcije na -196 °C tijekom 7 dana između dva protokola, sa i bez predinkubacije s PEG-PAK<sub>T</sub>-om, kako bi se dokazalo jesu li aktivnost IRI-a i/ili intracelularno isporučeni PAK<sub>T</sub> važni u stabilizaciji stanice tijekom krioprotekcije. U protokolu I, mezenhimalne matične stanice (MMS) krioprotektirane su u prisutnosti PAK<sub>T</sub>-a i slobodne trehaloze, a u protokolu II MMS su prethodno inkubirane na 37°C u otopini PAK<sub>T</sub>-a tijekom 5 sati, a zatim krioprotektirane u prisutnosti slobodne trehaloze. Ista koncentracija trehaloze od 10% korištena u oba protokola smanjila je veličinu kristala leda, međutim oporavak stanica bio je značajno veći u protokolu s predinkubacijom. Oporavljene stanice iz protokola II pokazale su izvrsnu proliferaciju i diferencijaciju, slično MMS-ma krioprotektiranim u tradicionalnom sustavu 10% DMSO-a. Ovo otkriće pokazalo je da smanjenje veličine kristala leda nije glavni mehanizam poboljšanog oporavka stanica. Pretpostavlja se da PEG-PAK<sub>T</sub> ulazi u stanice makropinocitozom i endocitozom ovisnoj o caveolinu te da unutarstanični PEG-PAK<sub>T</sub> stupaju u interakciju s vodom i stabiliziraju stanice tijekom krioprezervacije. Aktivnost inhibicije rekristalizacije leda polimera/trehaloze pridonijela je oporavku stanica, međutim, intracelularno ispušten PEG-PAK<sub>T</sub> bio je glavni doprinos poboljšanom oporavku stanica u protokolu II.



Slika 5. Usporedba strukture AFGP-a i PAK<sub>T</sub>-a. AFGP je polipeptid sa specifičnim ponavljajućim jedinicama [L-Ala-L-Ala-L-Thr-g-disaharida], gdje je disaharid galaktoza-N-acetil galaktozamin. PAK<sub>T</sub> je nasumični kopolimer L-Ala i L-Lys-g-disaharida s omjerom 2/1 L-Ala/L-Lys-g-disaharida po molu, gdje je disaharid trehaloza. Uravnotežena struktura hidrofилnih i hidrofobnih svojstava omogućuje povoljne interakcije polimera s kristalima leda (preuzeto iz Piao i sur., 2022).

#### 4.1.2.3. Inhibitori apoptoze

Apoptoza ili programirana stanična smrt uključuje obitelj proteaza zvanih kaspaze koje se aktiviraju kao odgovor na unutarnje ili vanjske proapoptičke signale. Aktiviranje putova apoptoze može biti potrebno za staničnu diferencijaciju, biti rezultat stanične ozljede ili se pojaviti kao posljedica oštećenja krioprotekcijom. Indukcija apoptoze ovisne o kaspazi u CD34<sup>+</sup> stanicama nakon odmrzavanja utječe na klonogenost stanica. Pokazalo se da inhibitor kaspaze zVAD-fmk poboljšava klonogenost nakon krioprotekcije HMS-a iz periferne krvi, te klonogenost i usađivanje HMS-a iz krvi pupkovine kod miševa (Desoutter i sur., 2019).

Proučavani su i inhibitori povezani s Rho-kinazom (engl. *rho-associated protein kinase*, ROCK). ROCK inhibitori djeluju na Rho-kinazni put, koji ima ulogu u širokom rasponu staničnih fenomena, ali prvenstveno u funkciji citoskeleta. Za razliku od krioprotektanta, ROCK inhibitori nemaju značajan učinak na proces zamrzavanja ili vijabilnost stanica neposredno nakon odmrzavanja, već djeluju tijekom naknadnog uzgoja stanica sprječavanjem

apoptoze koja je možda izazvana krioprotekcijom. Takav učinak ROCK inhibitora dokazan je za različitim tipovima matičnih stanica, uključujući ljudske embrionalne matične stanice, mezenhimalne matične stanice dobivene iz koštane srži i inducirane pluripotentne matične stanice (Weng i Beauchesne, 2020). Međutim, ROCK inhibitore treba koristiti s oprezom za krioprotekciju HMS-a. Iako je dokazano da ROCK inhibitor Y-27632 povećava preživljavanje ljudskih embrionalnih matičnih stanica nakon krioprotekcije, druge studije su otkrile da ROCK inhibitor Y-27632 negativno utječe na širenje/preživljavanje i svježih i krioprotektiranih CD34+ stanica dobivenih iz krvi pupkovine (Hornberger i sur., 2019).

#### 4.1.2.4. Antioksidansi

Oštećenje i smrt stanica tijekom procesa zamrzavanja i odmrzavanja događa se u dijelu HMS-a kao rezultat oštećenja membrane i stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS). ROS su toksični produkti staničnog metabolizma i štetni su za ljudske matične stanice jer povišene razine intracelularnog ROS-a mogu uzrokovati oštećenje DNA, što zauzvrat izaziva apoptozu. Postoje dokazi koji upućuju da bi ROS mogao biti uključen u početak i progresiju hematoloških zloćudnih bolesti, kao što su mijelodisplastični sindromi i akutna mijeloična leukemija, kao i iscrpljenost mirujućih CD34+ stanica koštane srži i loša funkcija presatka nakon alogene transplantacije. S druge strane, ROS igra ulogu u normalnoj hematopoezi tako što potiče samoobnavljanje, migraciju i razvoj matičnih stanica. Umjerene količine ROS-a potrebne su za hematopoezu tijekom embrionalnog razvoja, kao i za hematopoetsku hemostazu u odrasloj dobi (Bai i sur., 2018).

Velika količina ROS-a proizvedena tijekom krioprotekcije može uzrokovati oksidaciju proteina, lipida i nukleinskih kiselina što može uzrokovati nepovratna oštećenja stanica i dovesti do apoptoze. Klasični propusni i nepropusni krioprotektanti ne uspijevaju smanjiti oksidativno oštećenje stanica. Stoga se antioksidansi i krioprotektanti mogu koristiti zajedno za sveobuhvatno smanjenje štete krioprotekcije (Liu i sur., 2021).

Makashova i sur. (2016) procijenili su učinkovitost N-acetil-L-cistein (engl. *N-acetyl L-cysteine*, AC) antioksidansa tijekom krioprotekcije HMS-a iz krvi pupkovine s različitim koncentracijama DMSO-a. AC ima izravnu antioksidacijsku aktivnost te sudjeluje u sintezi glutationa i osigurava strukturu citoskeleta s tiolnim skupinama. Utvrđeno je da porast koncentracije DMSO-a (od 2,5%, 5%, 7,5% i 10%) i vrijeme izlaganja stanica krioprotektantu

(od 15 do 60 minuta) rezultira značajnim povećanjem količine stanica s viškom ROS-a (sa  $(7,5 \pm 0,8)$  % pri 5 % DMSO i 15 min inkubacije na  $(28,9 \pm 3,2)$  % pri 10 % DMSO i 60 min inkubacije), smanjenjem njihove vijabilnosti i stope očuvanja. Dodavanje 10 mM AC-a mediju za krioprotekciju dovelo je do smanjenja količine stanica s viškom ROS-a i povećanja stope njihovog očuvanja i vijabilnosti. Maksimalni učinak postignut je nakon dodavanja AC-a koncentracijama DMSO-a od 7,5 i 10%. Dokazano je da je uporaba antioksidansa pridonijela povećanju stope očuvanja i vijabilnosti HMS-a ako su koncentracija krioprotektanta i vrijeme izlaganja bili optimalni.

Korištenje specifičnih antioksidansa u odgovarajućim koncentracijama može značajno smanjiti štete od ROS-a i poboljšati učinkovitost krioprotekcije. Međutim, pogrešna uporaba antioksidansa može rezultirati negativnim rezultatima. Razlog može biti taj što antioksidansi ne samo da smanjuju ROS, već imaju i negativne učinke na endogeni mehanizam stanica protiv smrzavanja. Visoke koncentracije antioksidansa transformiraju stanice iz oksidativnog stresa u reduktivni stres, što također može imati negativne učinke na strukturu i funkciju stanica (Liu i sur., 2021). Nadalje, ROS igra važnu ulogu u hematopoezi i regulira samoobnavljanje, migraciju i mijeloidnu diferencijaciju HMS-a. Bai i sur. (2018) utvrdili su da stanice s višim razinama ROS-a imaju veću sposobnost stvaranja kolonija i koreliraju s kraćim vremenom usađivanja neutrofila. Oporavak broja neutrofila i trombocita nakon transplantacije HMS-a ključne su prekretnice koje definiraju uspješno usađivanje. S obzirom na značajan rizik od infekcije nakon transplantacije, kratkoročni oporavak broja neutrofila je od posebne važnosti i u konačnici određuje trajanje prijema u bolnici nakon transplantacije.

## 4.2. Zahtjevi uspješne krioprotekcije

Uspješna krioprotekcija ne ovisi samo o dodavanju krioprotektivnog sredstva stanicama prije zamrzavanja, već postoji raspon varijabli koje se moraju kontrolirati i optimizirati da bi se dobila učinkovita metoda krioprotekcije. To obuhvaća pravilnu pripremu stanica za krioprotekciju, kontroliranu brzinu smrzavanja, odgovarajuće uvjete pohrane stanica, odmrzavanje stanica te njihova obrada i kontrola kvalitete.



#### 4.2.1. Mjesto izvođenja krioprotekcije

Krioprotekcija se izvodi u tzv. čistim sobama kako bi se osigurala niska i kontrolirana razina kontaminacije (npr. mikroba u zraku i čestica aerosola). Čiste sobe već su godinama standard za krioprotekciju. Njihova konstrukcija i održavanje strogo su regulirani smjericama standardnih operativnih postupaka (engl. *standard operating procedures*, SOP) u skladu s dobrom proizvođačkom praksom (engl. *good manufacturing practice*, GMP). Čiste sobe moraju biti sterilizirane i opskrbljene filtriranim zrakom. Sterilizacija se mora izvesti korištenjem uobičajenih principa kao što su vlažna toplina, etilen oksid, UV zračenje. Zrak koji ulazi u čisti prostor se filtrira i unutra recirkulira kroz specifične visokoučinkovite filtere za čestice zraka (engl. *high-efficiency particulate air*, HEPA) i filtere zraka s ultra-niskim česticama (engl. *ultra-low particulate air*, ULPA). Čiste soba ključne su za održavanje određene razine kvalitete staničnih proizvoda koji moraju biti sterilni. Iako su prednosti čistih soba koje osiguravaju visoku kvalitetu prikupljenog staničnog proizvoda prevladavajuće, čiste sobe su prilično skupe (Spoerl i sur., 2016).

Uz visoke troškove povezane s uspostavom i održavanjem čistih soba, alternative konvencionalnim čistim sobama su sustavi zatvorenih vrećica za krioprotekciju. Sastoje se od čvrsto spojenih sterilnih vrećica za prikupljanje i krioprotekciju stanica, bez potrebe ponovnog otvaranja sustava u okviru postupaka krioprotekcije. Svi koraci od prikupljanja matičnih stanica do postupka zamrzavanja izvode se u “zatvorenom sustavu”. Sustavi zatvorenih vrećica ispitani su za krioprotekciju HMS-a iz periferne krvi i pokazalo se da su sigurni u pogledu kvalitete proizvoda i daljnjeg kliničkog ishoda nakon transplantacije (Spoerl i sur., 2016).

#### 4.2.2. Koncentracija stanica i vrijeme skladištenja do krioprotekcije

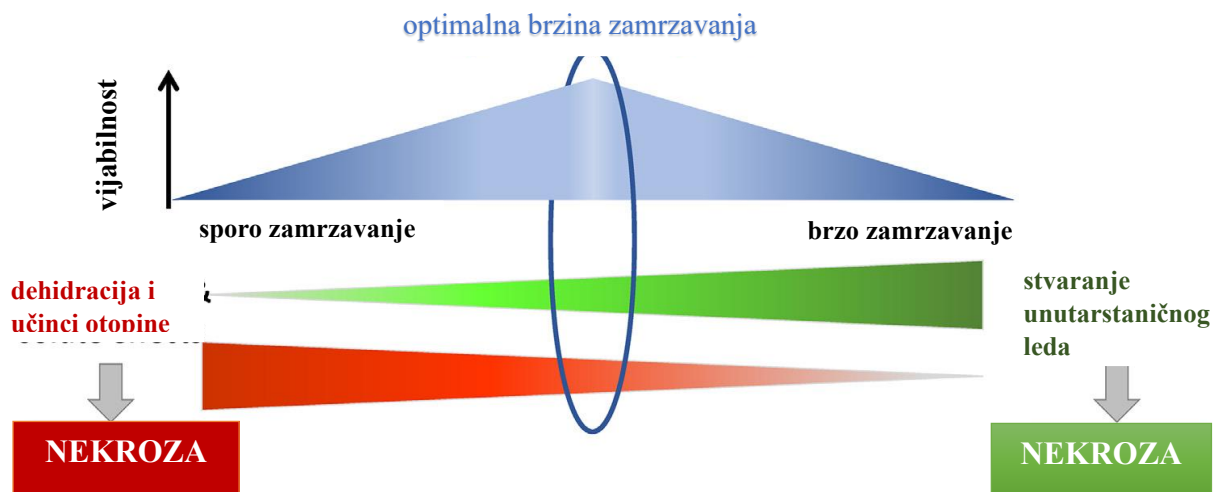
Po starim smjericama, koncentracija HMS-a iz koštane srži ili periferne krvi obično se prilagođava prije zamrzavanja u staničnoj suspenziji s  $20 - 40 \times 10^6$  leukocita/mL. Međutim, niska koncentracija stanica povezana je s većom upotrebom DMSO-a i posljedično većom toksičnošću za pacijenta. Dodatno, i višom cijenom zbog većih krioprotektiranih volumena, više zaliha, više DMSO-a te potreba za više prostora u zamrzivačima. Félix i sur. (2018) u

svojoj studiji dokazali su da odgovarajuće prikupljanje HMS-a iz periferne krvi, ukupne koncentracije leukocita od  $200 \times 10^6/\text{mL}$ , zamrzavanje s 5% DMSO-om i 6% HES-om bez zamrzivača s kontroliranom brzinom i pohranjivanje stanica na  $-80^\circ\text{C}$  daju izvrsno usađivanje. Daljnje povećanje koncentracije stanica može odgoditi presađivanje, bez utjecaja na sigurnost. Medijan usađivanja u pacijenata koji su primili infuziju s koncentracijom stanica  $<200 \times 10^6$  leukocita/mL bio je devet dana, s  $200 - 400 \times 10^6$  leukocita/mL 11 dana,  $400 - 600 \times 10^6$  leukocita/mL 12 dana i  $>600 \times 10^6$  leukocita/mL 14 dana. Važno je napomenuti da koncentracija stanica koja je previsoka može dovesti do gubitka stanica i zgrušavanja stanica nakon odmrzavanja ili napadaja tijekom infuzije stanica (Hornberger i sur., 2019).

Vrijeme između prikupljanja HMS-a i krioprotekcije, kao i koncentracija stanica mogu utjecati na vijabilnost i funkcionalnost stanica. Općenito, studije pokazuju da stanice održavaju bolju kvalitetu na temperaturama  $2 - 8^\circ\text{C}$  (u usporedbi sa sobnom temperaturom) i pri nižim koncentracijama do 72 ili 96 sati. Araújo i sur. (2022) istražili su kvalitetu HMS-a iz periferne krvi pohranjenih na temperaturi  $2 - 8^\circ\text{C}$  do 96 sati u niskim ( $270 - 300 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) i visokim ( $570 - 600 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) koncentracijama TNC-a. Nisu primijećeni značajni gubici vijabilnih CD34+ stanica i CFU u prva 24 sata, no nakon 48 sati, ove varijable pokazale su smanjenje pri visokoj koncentraciji stanica. Ukupan broj kolonija postupno se smanjivao tijekom vremena, i u uzorcima s niskom i visokom koncentracijom stanica, no najupečatljivije smanjenje primijećeno je u uzorcima s visokom koncentracijom TNC-a. Nakon 96 sati, broj kolonija u uzorcima visoke koncentracije stanica bio je upola manji u odnosu na uzorake niske koncentracije stanica. Vrijeme skladištenja negativno je utjecalo na kvalitetu uzoraka, osobito kod veće koncentracije TNC. Osim vremena, koncentracija TNC-a značajno je utjecala na kvalitetu stanica i stanični proliferativni potencijal, uspoređujući uzorke s visokom i niskom koncentracijom TNC-a do 96 sati. Kvaliteta proizvoda izravno utječe na kliničke rezultate, te ukupna starost proizvoda povezana je s povećanjem neuspjeha transplantacije. Maurer i sur. (2021) primjetili su trend povećanja neuspješne transplantacije HMS-a iz periferne krvi kod transplantata čija je ukupna starost proizvoda veća od 48 sati. Od pacijenata koji su primili proizvod star preko 48 sati, 13,6% doživjelo je neuspješno presađivanje u usporedbi s 3,3% pacijenata koji su primili proizvod star manje od 48 sati.

### 4.2.1. Brzina zamrzavanja

Optimalna brzina zamrzavanja razlikuje se među različitim vrstama stanica budući da ovisi o propusnosti stanične membrane za vodu i otopljene tvari. Hematopoetske matične stanice se sporo zamrzavaju ( $1 - 2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ), kao i mezenhemske matične stanice te hepatociti, dok je brzo hlađenje karakteristično za oocite, otočiće gušterače i embrionske matične stanice. (Whaley D. i sur., 2021.) Rano tijekom sporig zamrzavanja koje se koristi za HMS, formiranje izvanstaničnog leda povećava osmotski tlak u izvanstaničnom prostoru jer se otopine ograničavaju na smanjeni volumen vode. Neuravnotežen osmotski tlak dovodi do toga da voda osmozom izlazi iz stanica. Potencijalni nepovoljni učinci ovog fenomena izbjegavaju se korištenjem učinkovitog krioprotektanta i odgovarajućih brzina hlađenja kako bi se postigla dinamička ravnoteža i izbjegla štetna unutarstanična kristalizacija leda. Stvaranje unutarstaničnog leda događa se kada je voda unutar stanica u superhladnom stanju (tj. dosegne temperaturu ispod svoje točke smrzavanja). Pod optimalnim hlađenjem, dovoljno vode izlazi iz stanica osmozom zbog veće koncentracije otopljenih tvari izvan stanice i postiže se ravnoteža koja sprječava superhlađenje unutarstanične vode i što je najvažnije, sprječava unutarstaničnu kristalizaciju leda. Ako je brzina hlađenja previsoka, voda ne uspijeva izaći dovoljno brzo i unutarstanična voda će doći do superhladnog stanja, nakon čega slijedi unutarstanično zamrzavanje koje je povezano s vrlo niskom stopom vijabilnosti nakon odmrzavanja jer kristali leda ometaju organele i stanične membrane. S druge strane, ako je brzina hlađenja prespora, stanice će doživjeti ozbiljnu dehidraciju zbog prekomjerne egzozmoze koja će oštetiti staničnu membranu i dovesti do ozljeda učincima otopljenih tvari što će rezultirati nekrozom (Slika 6.) (Jahan i sur., 2021). Automatizirani uređaji za zamrzavanje, poput KRYO 10 serije III (Planer Products, Sunbury-on-Thames, Ujedinjeno Kraljevstvo), CryoMed 1010 (Forma Scientific, Marjetta, OH, Sjedinjene Države) i Cryomed (New Baltimore, MD, Sjedinjene Države) omogućuju smanjenje temperature kontroliranom brzinom (Erol i sur., 2021).



Slika 6. Shematski prikaz utjecaja brzine zamrzavanja na stvaranje leda, dehidraciju i preživljavanje stanica. Optimalna brzina zamrzavanja osigurava da dovoljno vode izađe iz stanica osmozom kako bi se unutarstanično stvaranje kristala leda svelo na minimum. Brzo i sporo zamrzavanje može biti povezano s visokom stopom nekroze zbog jake dehidracije i učinaka otopljenih tvari odnosno stvaranja unutarstaničnog leda (preuzeto i prilagođeno prema Jahan i sur., 2021).

Suprotno sporom hlađenju, vitrifikacija zahtijeva izuzetno visoku brzinu hlađenja i visoku izvanstaničnu koncentraciju krioprotektanta kako bi se podržao prijelaz vode izravno iz tekuće u amorfnu fazu bez stvaranja unutar- ili izvanstaničnih kristala leda. Tijekom vitrifikacije, stanice koje se drže u otopinama krioprotektanta (obično se zajedno koriste propusni DMSO ili glicerol i nepropusni HES, PVA ili trehaloza) nakratko se izlažu parama dušika, a potom uranjaju u tekući dušik. Tekućina se transformira u stakleno nekristalno kruto stanje zbog prekomjernog hlađenja bez smrzavanja (Erol i sur., 2021). Zanimljiv razvoj postignut je posljednjih godina kao što je super-brzo zamrzavanje koje koristi injekt glavu za zamrzavanje malih stanica sisavaca ( $< 20 \mu\text{M}$ ) bez upotrebe krioprotektanata. Međutim, trenutna ograničenja u pogledu brzina hlađenja i uređaja ograničavaju ove tehnike na male količine i male biološke uzorke kao što su spermiji, embriji i embrionalne matične stanice (Jahan i sur., 2021).

#### 4.2.2. Pohrana stanica

Nakon krioprotekcije, stanice se pohranjuju u kriogenim dewarovim spremnicima koji sadrže tekući dušik (plinska faza  $-160^{\circ}\text{C}$ , tekuća faza  $-196^{\circ}\text{C}$ ) ili u mehaničkim zamrzivačima ( $-80^{\circ}\text{C}$ ). (Jahan i sur., 2021) Pohranjivanje stanica u toplijim uvjetima, kao što je  $-80^{\circ}\text{C}$ , može omogućiti da se s vremenom pojave promjene koje smanjuju vijabilnost i funkcionalnost. Skladištenje na niskim temperaturama usporava, ali ne zaustavlja, sve stanične biokemijske reakcije dok temperatura ne padne ispod temperature staklenog prijelaza vode ( $-136^{\circ}\text{C}$ ). Budući da su biokemijski procesi ovisni o temperaturi, čak i na  $-20$  i  $-80^{\circ}\text{C}$ , biokemijske reakcije još uvijek se događaju, do određenog stupnja, što rezultira kontinuiranim oštećenjem uzoraka. Te su reakcije često neregulirane i nepotpune što vodi stvaranju i nakupljanju toksičnih intermedijarnih spojeva, kao što su slobodni radikali, nusproizvodi anaerobnog metabolizma i otpadni proizvodi koji se ne mogu očistiti zbog temperaturne supresije potrebnih puteva ili reakcija spašavanja. Ovi nusprodukti mogu rezultirati ili izravnim oštećenjem ili aktivacijom odgovora na molekularni stres nakon odmrzavanja (Baust i sur., 2017). Kratkotrajno skladištenje stanica ( $< 1$  mjesec) na  $-80^{\circ}\text{C}$  je prihvatljivo, ali ga treba svesti na minimum kako bi se osigurala maksimalna stabilnost ([www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)).

#### 4.2.3. Dugotrajno skladištenje krioprotektiranih HMS-a

Lysak i sur. (2021) istražili su učinak krioprotekcije na kvalitetu i aktivnost HMS-a iz periferne krvi pohranjene kratko (3 mjeseca) i dugo (10 godina) razdoblje u usporedbi s nativnim uzorcima. Vijabilnost CD34<sup>+</sup> stanica ostala je nepromijenjena tijekom skladištenja, apoptotičke stanice bile su zastupljene do 10% i nisu se razlikovale među skupinama. Klonogena aktivnost mjerena proizvodnjom ATP-a smanjila se s duljinom skladištenja što ukazuje da dugotrajno skladištenje može dovesti do blagog smanjenja klonogenog kapaciteta. Pri ispitivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija i aldehid dehidrogenaze te intracelularnog pH detektirane su samo granične promjene bez statističke značajnosti, što pokazuje njihovu dobru očuvanost tijekom skladištenja stanica. Ova studija pokazuje da krioprotekcija nema veći negativan učinak na kvalitetu i potencijal matičnih stanica, te se stoga mogu sigurno pohraniti dulje razdoblje od najmanje 10 godina.

Makhani i sur. (2022) provedli su retrospektivnu studiju u kojoj su usporedili ishode autologne transplantacije svježih HMS-a iz periferne krvi i krioprotektiranih HMS-a nakon dugog skladištenja na istoj velikoj skupini pacijenata (89) s multiplim mijelomom (MM). Svi pacijenti primili su stanični proizvod iz istog ciklusa prikupljanja za obje transplantacije. HMS bile su krioprotektirane i pohranjene u hladnjacima s tekućim dušikom na  $\leq -150^{\circ}\text{C}$ . Medijan trajanja pohrane između dana početnog prikupljanja i transplantacije bio je 5,4 godine (raspon od 1,0 do 19,7 godina). Kinetika usađivanja transplantacije krioprotektiranih HMS-a bila je usporediva s prvom transplantacijom svježih HMS-a. Također nije bilo povezanosti između trajanja skladištenja i vremena do usađivanja neutrofila ili usađivanja trombocita. Ova studija pokazuje da krioprotektirane HMS održavaju sposobnost usađivanja stanica čak i nakon gotovo 20 godina skladištenja.

#### 4.2.4. Događaji prolaznog zagrijavanja

Kako bi se osiguralo sigurno, dugotrajno skladištenje uzoraka, ključno je da se uzorci kontinuirano drže ispod temperature staklastog prijelaza otopine krioprotektanta, oko  $-120^{\circ}\text{C}$  za otopine na bazi DMSO-a (Kilbride i sur., 2020). Zamrznuti stanični proizvodi nisu stabilni kada su izloženi temperaturi okoline unatoč svom smrznutom izgledu. Događaji prolaznog zagrijavanja definirani su kao kratka izlaganja krioprotektiranog proizvoda temperaturama iznad preporučene kritične temperature skladištenja (Jahan i sur., 2021). Neželjene fluktuacije temperature skladištenja mogu se pojaviti tamo gdje je mnogo uzoraka pohranjeno zajedno, a preuzimanje jednog zahtjeva premještanje drugih, nenamjerno ih izlažući porastu temperature. Ako ovo odstupanje ide iznad temperature staklastog prijelaza za bilo koji određeni uzorak, tada se javlja rizik za stabilnost. Nekoliko izvješća o smanjenju ishoda nakon odmrzavanja nakon skladištenja u parama tekućeg dušika (ispod  $-120^{\circ}\text{C}$ ) vjerojatno su posljedica takvog nenamjernog zagrijavanja (Kilbride i sur., 2020). Za krioprotektirane HMS iz krvi pupkovine, kritična temperatura iznosi  $-150^{\circ}\text{C}$ . Temperatura staklenog prijelaza vode iz viskoznog stanja u tvrdo staklasto stanje je oko  $-136^{\circ}\text{C}$ . Događaji prolaznog zagrijavanja mogu rezultirati rastom malih kristala leda u veće kristale leda (rekristalizacija) što može nepovratno oštetiti stanice, smanjiti im vijabilnost i potencijal. Utvrđeno je da događaji prolaznog zagrijavanja imaju mali utjecaj na oporavak ukupnih stanica s jezgrom i na vijabilnost CD34 + stanica na temelju bojenja 7-AAD, ali smanjuju vijabilnost i oporavak CD45 + stanica. Štoviše, događaji

prolaznog zagrijavanja iznad  $-136\text{ }^{\circ}\text{C}$  pokazali su smanjenje CFU, dok događaji prolaznog zagrijavanja ispod  $-136\text{ }^{\circ}\text{C}$  nisu. Kako je primarni mehanizam oštećenja i smrti stanice uzrokovano događajima prolaznog zagrijavanja rekristalizacija, upotreba IRI u krioprotekciji može spriječiti gubitak funkcije stanica (Jahan i sur., 2021). Također, komparativna studija Kim i sur. (2017) pokazala je bolju vijabilnost i klonogenu aktivnost HMS-a iz krvi pupkovine kada su bile zamrznute pomoću BioArchive sustava koji izbjegava bilo kakav kontakt s temperaturom okoline, u usporedbi sa stanicama zamrznutim konvencionalnom metodom. U konvencionalnim postupcima, obrađene stanice se zamrzavaju u zamrzivaču s kontroliranom brzinom i prenose u spremnike tekućeg dušika za skladištenje. Prijenos iz zamrzivača u spremnik neizbježno dovodi do izlaganja zamrznutih stanica sobnoj temperaturi što rezultira prolaznim zagrijavanjem. BioArchive je automatizirani sustav koji sadrži zamrzivač s kontroliranom brzinom zamrzavanja i spremnik tekućeg dušika u jednom. Stoga, korištenjem sustava BioArchive, stanice ne moraju biti izložene sobnoj temperaturi tijekom procesa zamrzavanja. Osim toga, svaki stanični proizvod se čuva zasebno pa vađenje pojedinačnih uzoraka ne izlaže ostale događajima prolaznog zagrijavanja.

#### 4.2.5. Odmrzavanje stanica

Ispravna brzina odmrzavanja ovisi o korištenoj brzini hlađenja. Za sporo ohlađene uzorke HMS-a, standardna praksa je uranjanje smrznutih staničnih proizvoda u vodenu kupelj na  $37^{\circ}\text{C}$  i vrtnja proizvoda kako bi se povećala brzina odmrzavanja (Li i sur., 2019). Važno je da vrijeme između uklanjanja proizvoda iz zamrzivača ili dewarovog spremnika i stavljanja u vodenu kupelj bude što kraće, jer je u tom periodu uzorak izložen pasivnom zagrijavanju koje može imati negativne posljedice na stanice. Ukoliko spremnik za pohranjivanje krioprotektiranih proizvoda i aparat za odmrzavanje nisu u istoj prostoriji, potrebno je osigurati odgovarajuće transportne spremnike koji sadrže suhi led ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) ili tekući dušik ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Pohranjivanje uzorka na mokrom ledu ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) nije učinkovito i treba ga izbjegavati. U kliničkim i čistim prostorijama, vodena kupelj često se zamjenjuje sterilnim bazenom napunjenim toplom sterilnom vodom ili fiziološkom otopinom u nastojanju da se smanji rizik od kontaminacije proizvoda. Miješanje uzoraka tijekom procesa odmrzavanja potrebno je kako bi se smanjio toplinski gradijent u uzorku. Na taj način sprječava se pregrijavanje dijelova uzorka na vanjskim rubovima posude i podoptimalne brzine otapanja uzorka u

središtu posude. Brzina otapanja uzorka nije linearna, već ju karakterizira početna brza stopa zagrijavanja ( $\sim 125\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) između  $\sim -196^{\circ}\text{C}$  i  $-15^{\circ}\text{C}$  nakon čega slijedi sporiji produženi plato zagrijavanja ( $\sim 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) između  $\sim -15$  i  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  gdje uzorci zahtijevaju veliki unos toplinske energije da prođu kroz fazni prijelaz iz krutog u tekuće stanje (latentna toplina taljenja) (Baust i sur., 2017). Neadekvatne brzine odmrzavanja mogu izazvati mehanička oštećenja stanica. Ako je brzina otapanja prespora, unutarstanični i/ili izvanstanični kristali leda rekristalizirajuće se u veće kristale uzrokujući pucanje staničnih membrana i nepovratna mehanička oštećenja koja vode do nekroze. Također, kod sporog zagrijavanja stanice su duže vrijeme izložene krioprotektantu što može biti štetno za stanice (Jahan i sur., 2021). Iako neke studije sugeriraju da brzina zagrijavanja nije bitna za sporo ohlađene uzorke, potrebne su dodatne studije koje bi potvrdile učinke različitih brzina zagrijavanja na HMS. Konačna temperatura zagrijavanja treba biti između  $\sim 0$  i  $4^{\circ}\text{C}$ . Odmrzavanje se mora zaustaviti čim sav vidljivi led nestane i dok su uzorci još hladni. Zagrijavanje uzoraka na sobnu temperaturu ili topliju povećava citotoksični učinak krioprotektanta na stanice. Također je važno održavati uzorke na niskoj temperaturi ( $\sim 4^{\circ}\text{C}$ ) i vrijeme do daljnje obrade svesti na minimum (Baust i sur., 2017).

Razvijeni su i uređaji za kontrolirano odmrzavanje koji ne koriste vodenu kupelj, čime se smanjuje mogućnost kontaminacije i poboljšava dosljednost procesa odmrzavanja (Li i sur., 2019). Ovi sustavi koriste mehaničko zagrijavanje, kao što je topla metalna ploča i/ili zagrijane, ali zatvorene tekućine koje ne dolaze u izravan kontakt s uzorkom koji se odmrzava (Kilbride i sur., 2020). Uređaji za suho odmrzavanje osiguravaju kontinuirano i ravnomjerno miješanje uzorka te prilagođuju proces odmrzavanja kontrolirajući brzinu zagrijavanja i skraćujući plato faznog prijelaza (Baust i sur., 2017). Kilbride i sur. (2020) usporedili su vijabilnost stanica nakon klasičnog i suhog odmrzavanja te rezultati nisu pokazali značajne razlike između tehnika. Pozitivan odgovor uzoraka na odmrzavanje bez vode nudi potencijalne prednosti za kliničke situacije uklanjanjem subjektivnog elementa svojstvenog odmrzavanju u vodenoj kupelji i uklanjanjem mogućih problema s kontaminacijom.

Nedavne studije pokazale su da brzo odmrzavanje nije potrebno za somatske stanice sisavaca sve dok je ranija faza hlađenja odgovarajuće kontrolirana. Šteta pri zagrijavanju uzoraka obično je uzrokovana širenjem nepotpunih kristala leda kako više energije postaje dostupno za kretanje vode. Dok je uzorak još uvijek dovoljno hladan da očuva led, molekule vode će lakše migrirati na površine nepotpunih kristala i formirati veće kristale leda. Sporo hlađenje u



krioprotektantima na bazi DMSO-a, omogućuje potpuno stvaranje leda pri hlađenju i tako uvelike uklanja zahtjev za brzim zagrijavanjem (Kilbride i sur., 2020).

#### 4.2.6. Obrada odmrznutih stanica

Odmrznute stanice mogu se izravno infundirati, razrijediti ili isprati i suspendirati u otopini nosača. Ako u infuziju idu nemanipulirane stanice, odmrzavanje se provodi na mjestu isporuke pacijentu, kako bi se sprječilo smanjenje vijabilnosti stanica (Kilbride i sur., 2020). Otopine za krioprotekciju obično su hipertonične, a otopine za otapanje nakon odmrzavanja obično su dizajnirane za smanjenje osmotskog stresa povezanog s razrjeđivanjem ili pranjem, jer su stanice osjetljivije na širenje nego na skupljanje. Proizvod ubrizgan u pacijenta odražava prirodu obrade nakon odmrzavanja (razrijeđene, isprane ili nemanipulirane stanice) (Li i sur., 2019). Sastav otopine za otapanje također može utjecati na preživljavanje stanica. Većina otopina za otapanje sastoji se od fiziološke otopine s dodatkom dekstrana i/ili humanog albumina. Albumin je važan za održavanje visoke vijabilnosti HMS-a nakon odmrzavanja, zbog svoje stabilizirajuće funkcije. Razrjeđivanje treba biti učinjeno oprezno kako bi se izbjeglo pretjerano bubrenje stanica do kojeg dolazi tijekom dodavanja izotonične otopine u hipertoničnu staničnu otopinu. Plazmalit-A, izotonična otopina koja se koristi kao izvor vode i elektrolita, može se koristiti kao alternativa otopini na bazi dekstrana. Vijabilnost CD34+ stanica nakon odmrzavanja veća je u razrijeđenim ili ispranim uzorcima, u usporedbi s nemanipuliranim uzorcima, dok je CFU aktivnost i kinetika usađivanja slična između razrijeđenih i ispranih uzoraka. Potpuno uklanjanje krioprotektanta metodom ispiranja često rezultira gubitkom stanica, ali infuzija takvog proizvoda nosi manje štetnih učinaka (Jahan i sur., 2021).

Lachica i sur. (2023) usporedili su tri najčešće otopine kojima se razrjeđuju uzorci nakon odmrzavanja na vijabilnost HMS-a iz krvi pupkovine. To su 10% dekstran 40 u NaCl-u pripremljen s 5% humanim albuminom; 5% humani albumin u PBS/EDTA; 0,9% NaCl. Iako je broj živih CD34+ stanica bio nešto veći nakon odmrzavanja i razrijeđenja u otopini na bazi dekstrana, rezultati su bili statistički usporedivi s otopinom na bazi ljudskog albumina. Uočeno je da otopina na bazi albumina daje veći broj mononuklearnih i vijabilnih CD45+ stanica. Fiziološka otopina pokazala se značajno lošije u svim parametrima kvalitete, što je čini najmanje poželjnom otopinom za razrjeđivanje. Rezultati su pokazali da je 5% ljudski

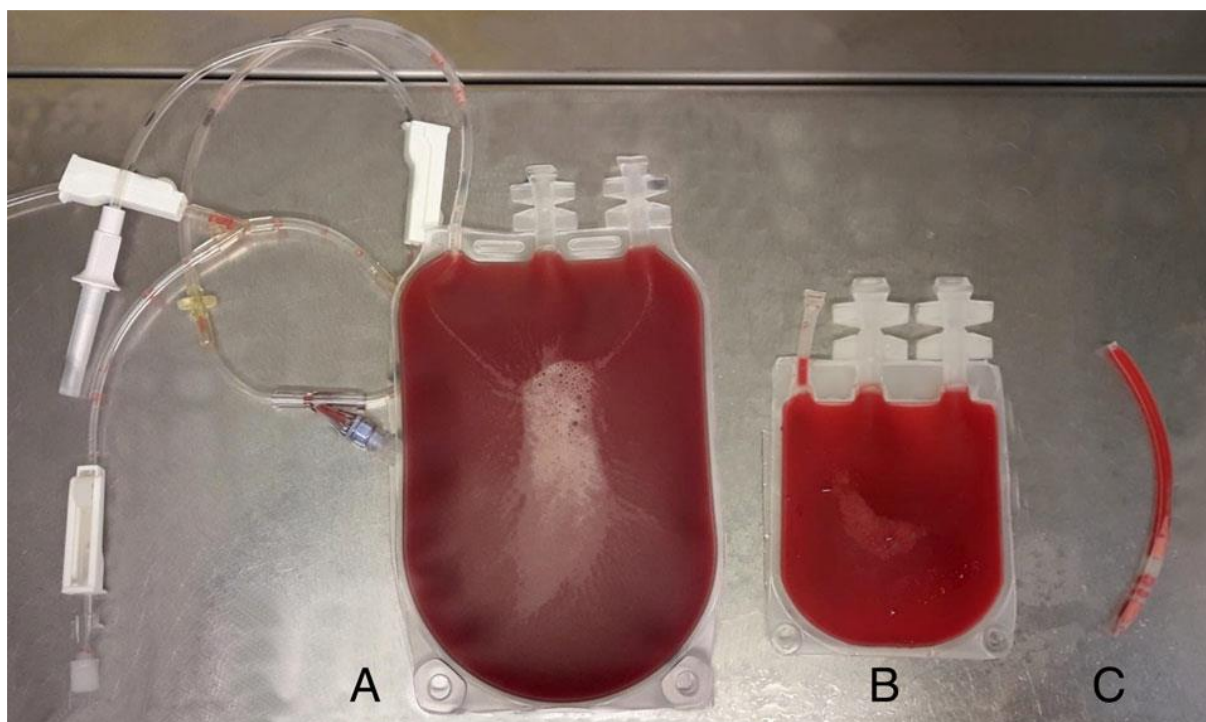
albumin najprikladnija otopina za razrjeđenje. Osim što daje veći broj ukupnih stanica, 5% humani albumin u PBS/EDTA smatra se lakšim za pripremu, dostupnijim i jeftinijim. Dalje su procijenili otopinu na bazi albumina korištenjem protokola odmrzavanja s trenutnim uklanjanjem DMSO-a (protokol odmrzavanja-ispiranja), na sposobnost održavanja vijabilnosti, funkcionalnosti i optimalne kvalitete stanica. Mononuklerane stanice bile su stabilne samo 4 sata nakon odmrzavanja i ispiranja, vijabilne CD34+ stanice bile stabilne do 6 sati, dok su vijabilne CD45+ stanice bile nestabilne čak i nakon 2 sata, kao što se očekivalo za poznatu krhkost granulocita. CFU analiza dokazala je proliferativni potencijal do 8 sati, iako se značajno smanjio nakon 4 sata i korelirao s brojem živih CD34+ stanica. Ova studija pokazala je da su HMS iz krvi pupkovine stabilne do 4 sata (čuvane na +4°C) nakon odmrzavanja i pranja upotrebom 5% humanog albumina te da u tom vremenskom razdoblju očuvaju vijabilnost, funkciju i proliferativni potencijal.

Korak pranja ostaje sporna točka: uklonjen je u nekim centrima kako bi se osigurao veći oporavak CD34+ stanica, održan u drugima kako bi se izbjeglo izlaganje stanica DMSO-u. Iako postupci pranja mogu u teoriji smanjiti rizik od komplikacija zbog zaostalog DMSO-a ili staničnih ostataka u odmrznutom proizvodu, to treba odvagnuti u odnosu na potencijalna kašnjenja koja mogu narušiti kvalitetu stanica i ishod za pacijenta. Halldorsdottir i sur. (2018) usporedili su ishode nakon infuzije autolognih HMS-a iz periferne krvi između pacijenata koji su primili stanice odmrznute uz krevet i onih koji su primili oprane stanice nakon odmrzavanja. Ni u jednoj skupini nisu zabilježene po život opasne nuspojave povezane s infuzijom. Nije bilo značajne razlike u srednjoj dozi infundiranih CD34+ stanica/kg u dvije skupine, niti u broju dana do usađivanja neutrofila i trombocita nakon transplantacije. I odmrzavanje uz krevet i ručno pranje matičnih stanica nakon odmrzavanja sigurni su postupci koji rezultiraju prihvatljivim staničnim presađivanjem i ishodom za pacijenta nakon transplantacije.

#### 4.2.7. Kontrola kvalitete odmrznutih stanica

Uspješno usađivanje HMS-a ovisi o količini infundiranih CD34+ po kg tjelesne težine. Prema temeljnim radovima, minimalni prag od  $2 - 2,5 \times 10^6$  CD34+/kg smatra se sigurnim za brzo usađivanje neutrofila, a doze  $5 \times 10^6$  CD34+/kg ili veće smatraju se optimalnima, osiguravajući potpuni i brži oporavak trombocita. Brojanje vijabilnih CD34+ stanica provodi

se rutinski neposredno prije zamrzavanja, međutim, krioprotekcija uzrokuje određeni stupanj ozljede stanica i gubitak vijabilnih CD34+ stanica. Stoga, mjerenje vijabilnosti CD34+ stanica nakon odmrzavanja je bolji prediktor usađivanja nego broj sakupljenih CD34+ stanica izmjeren prije smrzavanja. Štoviše, procjena odgovarajuće vijabilnosti za smrznute stanične proizvode prije infuzije potrebna je kao kontrola kvalitete. Procjena vijabilnosti stanica nakon odmrzavanja HMS-a iz periferne krvi može se napraviti izravno na vrećici prije infuzije (matična vrećica) ili na alikvotu afereze, zamrznutom odvojeno od matične vrećice, kao što su repovi vrećice (10 cm dugi terminalni dio cijevi kojim se puni matična vrećica) ili male vrećice (Slika 7.). Procjena vijabilnosti na odvojenom alikvotu prije planiranja infuzije matične vrećice omogućuje poduzimanje pravovremenih mjera u slučaju neadekvatne vijabilnosti. Međutim, vijabilnost CD34+ stanica u repovima vrećica često bude znatno niža nego u odgovarajućim matičnim vrećicama što može imati negativan utjecaj na planiranje infuzije, u smislu krivog izračuna potrebnog broja matičnih vrećica za optimalnu kinetiku usađivanja. Točan razlog manjeg broja vijabilnih stanica u repovima vrećica nije poznat, ali vjeruje se da mali volumen (600  $\mu$ L) i/ili oblik repa vrećice ima negativan utjecaj na vijabilnost HMS-a tijekom procesa zamrzavanja i odmrzavanja, te da se zamrznu mnogo brže od matične vrećice, što negativno utječe na klonogenu snagu HMS-a. S druge strane, male vrećice imaju isti oblik kao matična vrećica i sadrži veću količinu produkta afereze (5 mL) nego rep vrećice. Predstavljaju precizniji alat za mjerenje vijabilnosti CD34+ stanica matične vrećice prije infuzije, ali punjenje male vrećice zahtijeva veću količinu proizvoda afereze, što predstavlja potencijalni nedostatak za ovu metodu uzorkovanja, posebno kada je ukupan broj sakupljenih CD34+ stanica nizak. Kako bi se smanjila količina proizvoda afereze koji se koristi za potrebe procjene kvalitete, jednu trećinu konačnog volumena male vrećice čini 10 mL 5% otopine albumina (Marinelli Busilacchi i sur., 2020).



Slika 7. Vrećice za sakupljanje HMS-a aferezom koje su podvrgnute postupcima zamrzavanja i odmrzavanja: matična vrećica (A), mala vrećica (B) i rep vrećice (C) (preuzeto iz Marinelli Busilacchi i sur., 2020).

Oštećenje stanica neizbježno se događa tijekom procesa zamrzavanja i odmrzavanja HMS-a. Za procjenu ozljede HMS-a provodi se kontrola kvalitete uključujući: (1) kvantifikaciju CD34+; (2) postotak vijabilnosti CD34+ i (3) procjena funkcionalne sposobnosti HMS-a za formiranje kolonija (CFU) (Desoutter i sur., 2019). Testovi vijabilnosti stanica obuhvaćaju procjenu integriteta membrane te molekularne i enzimske mehanizme stanica. Mjerenje integriteta stanične membrane najčešće se provodi protočnom citometrijom koristeći fluorescentnu boju 7-AAD koja je isključena iz živih stanica s intaktnom membranom, ali prodire u mrtve ili oštećene stanice i veže se s visokim afinitetom na dvolančanu DNA interkalirajući se između GC parova baza. 7-AAD selektivno prodire kroz oštećene membrane mrtvih stanica, ali ne i apoptotičkih stanica. Naime, značajna razina stanične smrti, koja nije vidljiva odmah nakon odmrzavanja, manifestira se tijekom razdoblja od 24 do 48 sati nakon odmrzavanja kao rezultat odgođene apoptoze i nekroze. Ovaj fenomen je nazvan odloženom staničnom smrću izazvanom krioprotekcijom. Korištenje testova mjerenja integriteta membrane odmah nakon odmrzavanja daju lažno visok broj vijabilnih stanica (Baust i sur., 2017). Iz tog razloga, bolji pokazatelji vijabilnih stanica su testovi koji uključuju procjenu

molekularnih mehanizama ranih pokazatelja apoptoze koji prethode lizi membrane. U tu svrhu koriste se nespecifični markeri ranih apoptotskih stanica, kao što je Annexin V, Ca<sup>2+</sup>-ovisan fosfolipid-vezujući protein s visokim afinitetom za fosfolipid fosfatidilserin (PS) koji je u ranim apoptotskim stanicama premješten s unutarnjeg na vanjski dio membrane. Metoda koja otkriva još ranije apoptotičke događaje uključuje fluorescentno obilježeni inhibitor kaspaza (engl. *Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases*, FLICA) koji se kovalentno veže samo na aktivirane enzime kaspaze (Desoutter i sur., 2019). Nadalje, vijabilnost CD34<sup>+</sup> stanica ne odražava i njihovu funkcionalnu aktivnost nakon infuzije. Najčešći funkcionalni *in vitro* test za predviđanje usađivanja je takozvani CFU test. CFU test procjenjuje diferencijacijski potencijal HMS-a putem brojanja i identifikacije kolonija nekoliko dana nakon kulture u polučvrstom mediju. Mikroskopsko brojanje kolonija nakon 14 dana kulture najuobičajenija je metoda za kvantificiranje hematopoetskih progenitora, no metoda je sama po sebi subjektivna i teško ju je standardizirati. STEMvision (Stemcell Technologies) je automatizirani instrument i računalni sustav koji je posebno dizajniran za oslikavanje, klasificiranje i brojanje hematopoetskih kolonija koje proizvode HMS u CFU testovima. STEMvision omogućuje poluautomatsko prepoznavanje i brojanje CFU-granulocitnih makrofaga (engl. *CFU-granulocyte macrophage*, CFU-GM), CFU-granulocita (engl. *CFU-granulocyte*, CFU-G) i CFU-makrofaga (engl. *CFU-macrophage*, CFU-M) u jažicama. Ova standardizirana platforma poboljšava performanse i standardizaciju CFU analiza. Stanični proizvodi s visokom klonogenošću povezani su s brzom rekonstitucijom hematopoeze i niskim rizikom od posttransplantacijskih komplikacija i infekcija (Velier i sur., 2019).

## 5. Zaključci

Standardni postupak za krioprotekciju HMS-a uključuje upotrebu DMSO-a kao krioprotektanta, kontroliranu brzinu sporog zamrzavanja  $1 - 2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , čuvanje u tekućem dušiku na  $-196^{\circ}\text{C}$  i brzo odmrzavanje u vodenoj kupelji. DMSO se i dalje koristi za krioprotekciju HMS-a unatoč dokazanoj citotoksičnosti i štetnim nuspojavama povezanih s infuzijom. Kako bi se smanjile nuspojave povezane s DMSO-om, može se uvesti korak pranja staničnih proizvoda prije infuzije. Nadopunjavanje DMSO-a šećerima ili drugim krioprotektantima može se koristiti za smanjenje koncentracije DMSO-a i minimaliziranje opterećenja DMSO-om kod pacijenata. Najviše istraživani alternativni krioprotektanti su trehaloza, PIM, EG, glicerol, AFGP, koji su pokazali i učinkovit krioprotektivan učinak kao samostalni krioprotektanti. Nadalje, IRI sposoban kontrolirati rekristalizaciju leda može spriječiti gubitak funkcije stanica izazvane događajima prolaznog zagrijavanja tijekom pohrane stanica. Pravilna upotreba inhibitora apoptoze i antioksidansa u otopini krioprotektanta može smanjiti oštećenja i apoptozu stanica uzrokovanu krioprotekcijom. Uspješan razvoj optimiziranih mješavina krioprotektanata sa smanjenim sadržajem DMSO-a ili otopina bez DMSO-a predstavljat će značajno poboljšanje za krioprotekciju HMS-a.

Odgovarajuća tehnika krioprotekcije ključna je za osiguravanje optimalnog oporavka HMS-a. Pritom se mora voditi računa o odgovarajućim brzinama zamrzavanja i odmrzavanja, temperaturi skladištenja, koncentraciji stanica i smanjenju rizika od kontaminacija. Na kraju, važno je procijeniti kvalitetu stanica na odmrznutim stanicama, umjesto oslanjanja na podatke dobivene prije zamrzavanja, jer krioprotekcija utječe na vijabilnost i funkcionalnost HMS-a. Sveukupno, poboljšanje i standardiziranje protokola za krioprotekciju HMS-a rezultiralo bi s manjim brojem nuspojava kod pacijenata, poboljšanom sigurnošću i učinkovitosti terapije HMS-ma.

## 6. Popis kratica, oznaka i simbola

7-AAD – engl. *7-aminoactinomycin D*, 7- aminoaktinomicin D

AC – engl. *N-acetyl L-cysteine*, N-acetil-L-cistein

AF(G)Ps – engl. *antifreeze (glycol)proteins*, antifrizni (gliko)proteini

ATP – engl. *adenosine triphosphate*, adenzin trifosfat

CD34+ – površinski biljeg hematopoetskih matičnih stanica

CD45+ – površinski biljeg leukocitnih progenitora

CFU – engl. *colony-forming unit*, jedinica koja stvara kolonije

CFU-G – engl. *CFU-granulocyte*, CFU-granulociti

CFU-GM – engl. *CFU-granulocyte macrophage*, CFU-granulocitni makrofazi

CFU-M – engl. *CFU-macrophage*, CFU-makrofazi

DMSO – engl. *dimethyl sulfoxide*, dimetilsulfoksid

DNA – engl. *deoxyribonucleic acid*, deoksiribonukleinska kiselina

EDTA – engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, etilendiamintetraoctena kiselina

EG – engl. *ethylene glycol*, etilen glikol

FBS – engl. *fetal bovine serum*, fetalni goveđi serum

FLICA – engl. *Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases*, fluorescentno obilježen inhibitor kaspaza

GC – engl. *guanine-cytosine*, gvanin-citozin (bazni par)

G-CSF – engl. *granulocyte-colony stimulating factor*, faktor stimulacije granulocitnih kolonija

GMP – engl. *good manufacturing practice*, dobra proizvođačka praksa

GvHD – engl. *graft-versus-host disease*, bolest presatka protiv primatelja

HA – engl. *human albumin*, ljudski albumin

HEPA – engl. *high-efficiency particulate air (filter)*, visokoučinkoviti filter za čestice zraka

HES – engl. *hydroxyethyl starch*, hidroksietilni škrob

HMS – hematopoetske matične stanice

IRIs – engl. *ice recrystallization inhibitors*, inhibitori rekristalizacije leda

miRNA – engl. *micro ribonucleic acid*, mikro ribonukleinska kiselina

MM – engl. *multiple myeloma*, multipli mijelom

P/V – omjer površine i volumena stanice

PAK<sub>T</sub> – engl. *poly(L-alanine-co-L-lysine)-graft-trehalose*, poli(Ala-co-Lys)-g-trehaloza

PBS – engl. *phosphate-buffered saline*, fiziološka otopina s fosfatnim puferom

PEG – engl. *polyethylene glycol*, polietilen glikol

PG – engl. *propylene glycol*, propilen glikol

PIM – engl. *pentaisomaltose*, pentaizomaltoza

PS – engl. *phosphatidylserine*, fosfatidilserin

PVA – engl. *poly(vinyl alcohol)*, poli(vinil alkohol)

PVP – engl. *polyvinylpyrrolidone*, polivinilpirolidon

ROCK – engl. *rho-associated protein kinase*, Rho-kinaza

ROS – engl. *reactive oxygen species*, reaktivne kisikove vrste

SOP – engl. *standard operating procedures*, standardni operativni postupci

TNC – engl. *total nucleated cell count*, ukupni broj stanica s jezgrom

TRET1 – engl. *trehalose transporter 1*, transporter trehaloze 1

ULPA – engl. *ultra-low particulate air (filter)*, filter zraka s ultra-niskim česticama

UV – engl. *ultraviolet*, ultraljubičasto (zračenje)



## 7. Literatura

Araújo AB, Salton GD, Angeli MH, Furlan JM, Schmalfluss T, Röhsig LM. Effects of cell concentration, time of fresh storage, and cryopreservation on peripheral blood stem cells: PBSC fresh storage and cryopreservation. *Transfus Apher Sci*, 2022, 61, 103298.

Bai L, Best G, Xia W, Peters L, Wong K, Ward C, Greenwood M. Expression of Intracellular Reactive Oxygen Species in Hematopoietic Stem Cells Correlates with Time to Neutrophil and Platelet Engraftment in Patients Undergoing Autologous Bone Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018, 24, 1997-2002.

Baust JM, Campbell LH, Harbell JW. Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2017, 53, 855-871.

Briard JG, Jahan S, Chandran P, Allan D, Pineault N, Ben RN. Small-Molecule Ice Recrystallization Inhibitors Improve the Post-Thaw Function of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *ACS Omega*, 2016, 1, 1010-1018.

Cryogenics, <https://www.britannica.com/>, pristupljeno 3.7.2023.

Cryopreservation Basics: Protocols and Best Practices for Freezing Cells, 2023, <https://www.stemcell.com/>, pristupljeno 10.8.2023.

Desoutter J, Ossart C, Lacassagne MN, Regnier A, Marolleau JP, Harrivel V.

Cryopreservation and thawing of hematopoietic stem cell CD34-induced apoptosis through caspase pathway activation: Key role of granulocytes. *Cytotherapy*, 2019, 21, 612-618.

Erol OD, Pervin B, Seker ME, Aerts-Kaya F. Effects of storage media, supplements and cryopreservation methods on quality of stem cells. *World J Stem Cells*, 2021, 13, 1197-1214.

Félix OMWO, Tunes G, Ginani VC, Simões PC, Barros DP, Delbuono E, Alves MTS, Petrilli AS, Lee MLM, Gouveia RV, Zecchin VG, Seber A. The influence of cell concentration at cryopreservation on neutrophil engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Hematol Transfus Cell Ther*, 2018, 40, 233-239.

Gilfanova R, Callegari A, Childs A, Yang G, Luarca M, Gutierrez AG, Medina KI, Mai J, Hui A, Kline M, Wei X, Norris PJ, Muench MO. A bioinspired and chemically defined alternative to dimethyl sulfoxide for the cryopreservation of human hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Transplant*, 2021, 56, 2644-2650.

Haastrup EK, Munthe-Fog L, Ballesteros OR, Fischer-Nielsen A, Svalgaard JD. DMSO (Me<sub>2</sub>SO) concentrations of 1-2% in combination with pentaisomaltose are effective for cryopreservation of T cells. *Transfus Apher Sci*, 2021, 60, 103138.

Halldorsdottir AM, Atladottir S, Thorsteinsdottir MA, Arnason NA, Runarsson G, Jonsson T, Sigurjonsson OE, Reykdal S. To Wash or Not to Wash? Comparison of Patient Outcome after Infusion of Cryopreserved Autologous Hematopoietic Stem Cells before and after the Replacement of Manual Washing by Bedside Thawing. *Acta Haematol*, 2018, 140, 169-175.

Hornberger K, Yu G, McKenna D, Hubel A. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells: Emerging Assays, Cryoprotectant Agents, and Technology to Improve Outcomes. *Transfus Med Hemother*, 2019, 46, 188-196.

Hu Y, Liu X, Liu F, Xie J, Zhu Q, Tan S. Trehalose in Biomedical Cryopreservation-Properties, Mechanisms, Delivery Methods, Applications, Benefits, and Problems. *ACS Biomater Sci Eng.*, 2023, 9, 1190-1204.

Jahan S, Adam MK, Manesia JK, Doxtator E, Ben RN, Pineault N. Inhibition of ice recrystallization during cryopreservation of cord blood grafts improves platelet engraftment. *Transfusion*, 2020, 60, 769-778.

Jahan S, Kaushal R, Pasha R, Pineault N. Current and Future Perspectives for the Cryopreservation of Cord Blood Stem Cells. *Transfus Med Rev*, 2021, 35, 95-102.

Kaushal R, Jahan S, McGregor C, Pineault N. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation solutions for hematopoietic stem cell grafts. *Cytotherapy*, 2022, 24, 272-281.

Kilbride P, Meneghel J, Creasey G, Masoudzadeh F, Drew T, Creasey H, Bloxham D, Morris GJ, Jestice K. Automated dry thawing of cryopreserved haematopoietic cells is not adversely influenced by cryostorage time, patient age or gender. *PLoS One*, 2020, 15, e0240310.

Kim KM, Huh JY, Kim JJ, Kang MS. Quality comparison of umbilical cord blood cryopreserved with conventional versus automated systems. *Cryobiology*, 2017, 78, 65-69.

Lachica CA, Miele MJ, Herrera SM, Elanbari M, Deola S, Saleh A, Ejaz A, Aftab S, Olagunju D, Laoun R, Cugno C. Albumin-based solution is the ideal post-thawing suspension medium for cord blood hematopoietic stem cells: A stability and proliferative evaluation. *Transfusion*, 2023, 63, 1050-1059.

Li R, Johnson R, Yu G, McKenna DH, Hubel A. Preservation of cell-based immunotherapies for clinical trials. *Cytotherapy*, 2019, 21, 943-957.

Liu X, Xu Y, Liu F, Pan Y, Miao L, Zhu Q, Tan S. The Feasibility of Antioxidants Avoiding Oxidative Damages from Reactive Oxygen Species in Cryopreservation. *Front Chem*, 2021, 9, 648684.

Lysak D, Brychtová M, Leba M, Čedíková M, Georgiev D, Jindra P, Vlas T, Holubova M. Long-Term Cryopreservation Does Not Affect Quality of Peripheral Blood Stem Cell Grafts: A Comparative Study of Native, Short-Term and Long-Term Cryopreserved Haematopoietic Stem Cells. *Cell Transplant*, 2021, 30, 9636897211036004.

Makashova OE, Babijchuk LO, Zubova OL, Zubov PM. Optimization of cryopreservation technique for human cord blood nucleated cells using combination of cryoprotectant DMSO and antioxidant N-acetyl-Lcysteine. *Probl Cryobiol Cryomed*, 2016, 26, 295–307.

Makhani SS, Oza SP, Reich-Slotky R, Munshi PN, Biran N, Donato ML, Siegel DS, Vesole DH, Naam S, Rowley SD. Sustained Hematopoietic Engraftment Potential after Prolonged Storage of Cryopreserved Hematopoietic Stem Cells Used in Salvage Autologous Stem Cell Transplantation. *Transplant Cell Ther*, 2022, 28, 306.e1-306.e7.

Marinelli Busilacchi E, Costantini A, Mancini G, Bencivenga R, Olivieri J, Battaglini G, Velletri L, Viola N, Butini L, Capelli D, Poloni A, Olivieri A. A novel method to evaluate prethawing viability of cryopreserved CD34+ hematopoietic stem cells for autologous transplantation. *Transfusion*, 2020, 60, 1529-1535.

Maurer K, Kim HT, Kuczmarski TM, Garrity HM, Weber A, Reynolds CG, Liney D, Cutler C, Antin JH, Koreth J, Ritz J, Shapiro RM, Romee R, Wu CJ, Soiffer RJ, Nikiforow S, Ho VT, Goptu M. Impact of cryopreservation and transit times of allogeneic grafts on hematopoietic and immune reconstitution. *Blood Adv*, 2021, 5, 5140-5149.

Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res*, 1972, 71, 345-355.

Ntai A, La Spada A, De Blasio P, Biunno I. Trehalose to cryopreserve human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*, 2018, 31, 102-112.

Pavel P, Laier S. A Freezing Protocol for Hematopoietic Stem Cells. *Methods Mol Biol*, 2019, 2017, 177-192.

Piao Z, Patel M, Park JK, Jeong B. Poly(l-alanine-co-l-lysine)-g-Trehalose as a Biomimetic Cryoprotectant for Stem Cells. *Biomacromolecules*, 2022, 23, 1995-2006.

Pomeisl K, Richter J, Golan M, Kratochvílová I. Simple Syntheses of New Pegylated Trehalose Derivatives as a Chemical Tool for Potential Evaluation of Cryoprotectant Effects on Cell Membrane. *Molecules*, 2020, 25, 497.

PRIME-XV FreezIS, 2022., <https://www.irvinesci.com/>, pristupljeno 20. 7. 2023.

Santurette CC, Charron M, Bouyer S, Houzé P, Binnering S, Lavergne A, Mercier M, Giraud C. Study of a new device for washing and concentrating cryopreserved hematopoietic stem cells and mononuclear cells: a single center experience. *Cytotherapy*, 2022, 24, 86-92.

Siapati EK, Roubelakis MG, Vassilopoulos G. Liver Regeneration by Hematopoietic Stem Cells: Have We Reached the End of the Road? *Cells*, 2022, 11, 2312.

Solocinski J, Osgood Q, Wang M, Connolly A, Menze MA, Chakraborty N. Effect of trehalose as an additive to dimethyl sulfoxide solutions on ice formation, cellular viability, and metabolism. *Cryobiology*, 2017, 75, 134-143.

Spoerl S, Peter R, Krackhardt AM. Cryopreservation in Closed Bag Systems as an Alternative to Clean Rooms for Preparations of Peripheral Blood Stem Cells. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 951, 67-76.

Stewart S, He X. Intracellular Delivery of Trehalose for Cell Banking. *Langmuir*, 2019, 35, 7414-7422.

Svalgaard JD, Haastrup EK, Reckzeh K, Holst B, Glovinski PV, Gørløv JS, Hansen MB, Moench KT, Clausen C, Fischer-Nielsen A. Low-molecular-weight carbohydrate Pentaisomaltose may replace dimethyl sulfoxide as a safer cryoprotectant for cryopreservation of peripheral blood stem cells. *Transfusion*, 2016, 56, 1088-1095.

Svalgaard JD, Talkhonchek MS, Haastrup EK, Munthe-Fog L, Clausen C, Hansen MB, Andersen P, Gørløv JS, Larsson J, Fischer-Nielsen A. Pentaisomaltose, an Alternative to DMSO. Engraftment of Cryopreserved Human CD34+ Cells in Immunodeficient NSG Mice. *Cell Transplant*, 2018, 27, 1407-1412.

Trummer T, Fox R, Koç JR, de Lima M, Otegbeye F. Cryopreservation of hematopoietic cells using a pre-constituted, protein-free cryopreservative solution with 5% dimethyl sulfoxide. *Cytotherapy*, 2020, 22, 613-616.

- Velier M, Chateau AL, Malenfant C, Ouffai S, Calmels B, Chabannon C, Lemarié C. Validation of a semi automatic device to standardize quantification of Colony-Forming Unit (CFU) on hematopoietic stem cell products. *Cytotherapy*, 2019, 21, 820-823.
- Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, Clayton O, Nudischer R, Boerno S, Timmermann B, Selevsek N, Schlapbach R, Gmuender H, Gotta S, Geraedts J, Herwig R, Kleinjans J, Caiment F. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep*, 2019, 9, 4641.
- Weng L, Beauchesne PR. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation for cell therapy: A review. *Cryobiology*, 2020, 94, 9-17.
- Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mandoza A, Alexander M, Lakey JR. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplantation*, 2021, 30, 1-12.
- Yao X, Matosevic S. Cryopreservation of NK and T Cells Without DMSO for Adoptive Cell-Based Immunotherapy. *BioDrugs*, 2021, 35, 529-545.

## 8. Sažetak

Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica koristi se u liječenju širokog raspona malignih bolesti hematopoeze, ali i raznih nemalignih bolesti. Stanična terapija često zahtjeva stabilnu pohranu stanica tijekom dugog razdoblja. Krioprotekcija se definira kao dugotrajno čuvanje živih stanica i tkiva na ekstremno niskim temperaturama pri kojoj se stanični procesi privremeno zaustavljaju. Osnovno načelo uspješne krioprotekcije stanica je sprječavanje stvaranja unutarstaničnih i izvanstaničnih kristala leda tijekom zamrzavanja, jer je to primarni uzrok oštećenja stanica. Kako bi se izbjegli nepovoljni učinci zamrzavanja, potrebno je koristiti krioprotektante koji stupaju u interakciju s molekulama vode i snizuju točku ledišta vode. Dimetilsulfoksid (DMSO) je daleko najčešće korišteni krioprotektant, unatoč njegovoj citotoksičnosti i razvojem nuspojava kod pacijenata nakon infuzije staničnih proizvoda. Kako bi se smanjile neželjene reakcije povezane s DMSO-om, istraživane su razne metode uklanjanja DMSO-a prije infuzije, kao i pronalazak novih netoksičnih krioprotektanta. Osim dodavanja krioprotektanata stanicama, za uspješnu krioprotekciju potrebno je regulirati i niz drugih parametara, kao što su koncentracija stanica, brzina zamrzavanja, temperatura pohrane i brzina odmrzavanja. Na kraju, važno je procijeniti vijabilnost i funkcionalnost odmrznutih stanica kako bi se provjerila kvaliteta proizvoda i procijenila uspješnost usađivanja.

## Summary

Hematopoietic stem cells transplantation is used in the treatment of a wide range of malignant diseases of hematopoiesis, as well as various non-malignant diseases. Cell therapy often requires stable storage of cells over a long period. Cryoprotection is defined as long-term preservation of living cells and tissues at extremely low temperatures, during which cellular processes are temporarily stopped. The basic principle of successful cryoprotection of cells is to prevent the formation of intracellular and extracellular ice crystals during freezing, as this is the primary cause of cell damage. In order to avoid the unfavorable effects of freezing, it is necessary to use cryoprotectants which interact with water molecules and lower the freezing point of water. Dimethylsulfoxide (DMSO) is by far the most commonly used cryoprotectant, despite its cytotoxicity and the development of side effects in patients after infusion of cell products. In order to reduce the adverse reactions associated with DMSO, various methods of removing DMSO prior to infusion have been investigated, as well as the discovery of new non-toxic cryoprotectants. In addition to adding cryoprotectants to cells, for successful cryoprotection it is necessary to regulate a number of other parameters, such as cell concentration, freezing rate, storage temperature and thawing rate. Finally, it is important to assess the viability and functionality of the thawed cells to verify product quality and assess engraftment success.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### KRIOPROTEKCIJA HEMATOPOETSKIH MATIČNIH STANICA

**Antonia Šoić**

#### SAŽETAK

Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica koristi se u liječenju širokog raspona malignih bolesti hematopoeze, ali i raznih nemalignih bolesti. Stanična terapija često zahtijeva stabilnu pohranu stanica tijekom dugog razdoblja. Krioprotekcija se definira kao dugotrajno čuvanje živih stanica i tkiva na ekstremno niskim temperaturama pri kojoj se stanični procesi privremeno zaustavljaju. Osnovno načelo uspješne krioprotekcije stanica je sprječavanje stvaranja unutarstaničnih i izvanstaničnih kristala leda tijekom zamrzavanja, jer je to primarni uzrok oštećenja stanica. Kako bi se izbjegli nepovoljni učinci zamrzavanja, potrebno je koristiti krioprotektante koji stupaju u interakciju s molekulama vode i snižuju točku ledišta vode. Dimetilsulfoksid (DMSO) je daleko najčešće korišteni krioprotektant, unatoč njegovoj citotoksičnosti i razvojem nuspojava kod pacijenata nakon infuzije staničnih proizvoda. Kako bi se smanjile neželjene reakcije povezane s DMSO-om, istraživane su razne metode uklanjanja DMSO-a prije infuzije, kao i pronalazak novih netoksičnih krioprotektanta. Osim dodavanja krioprotektanata stanicama, za uspješnu krioprotekciju potrebno je regulirati i niz drugih parametara, kao što su koncentracija stanica, brzina zamrzavanja, temperatura pohrane i brzina odmrzavanja. Na kraju, važno je procijeniti vijabilnost i funkcionalnost odmrznutih stanica kako bi se provjerila kvaliteta proizvoda i procijenila uspješnost usađivanja.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 54 stranica, 7 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 46 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: krioprotekcija hematopoetskih matičnih stanica, dimetilsulfoksid, krioprotektanti bez DMSO-a

Mentor: **Dr. sc. Sanja Dabelić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sanja Dabelić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Domagoj Kifer**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: 5. rujna 2023.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of Biochemistry and Molecular Biology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### CRYOPRESERVATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS

**Antonia Šoić**

#### SUMMARY

Hematopoietic stem cells transplantation is used in the treatment of a wide range of malignant diseases of hematopoiesis, as well as various non-malignant diseases. Cell therapy often requires stable storage of cells over a long period. Cryoprotection is defined as long-term preservation of living cells and tissues at extremely low temperatures, during which cellular processes are temporarily stopped. The basic principle of successful cryoprotection of cells is to prevent the formation of intracellular and extracellular ice crystals during freezing, as this is the primary cause of cell damage. In order to avoid the unfavorable effects of freezing, it is necessary to use cryoprotectants which interact with water molecules and lower the freezing point of water. Dimethylsulfoxide (DMSO) is by far the most commonly used cryoprotectant, despite its cytotoxicity and the development of side effects in patients after infusion of cell products. In order to reduce the adverse reactions associated with DMSO, various methods of removing DMSO prior to infusion have been investigated, as well as the discovery of new non-toxic cryoprotectants. In addition to adding cryoprotectants to cells, for successful cryoprotection it is necessary to regulate a number of other parameters, such as cell concentration, freezing rate, storage temperature and thawing rate. Finally, it is important to assess the viability and functionality of the thawed cells to verify product quality and assess engraftment success.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 54 pages, 7 figures, 1 table and 46 references. Original is in Croatian language.

Keywords: cryopreservation of hematopoietic stem cells, dimethyl sulfoxide, DMSO-free cryoprotectant

Mentor: **Sanja Dabelić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Sanja Dabelić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Domagoj Kifer, Ph.D.** *postdoctoral researcher*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 5th, 2023.