



Erstellung eines Temperaturprofils zum “Schutz der Unberührten” kryokonservierten Proben

IN KOOPERATION MIT ILK DRESDEN & KRYOTECHNIK, TU DRESDEN

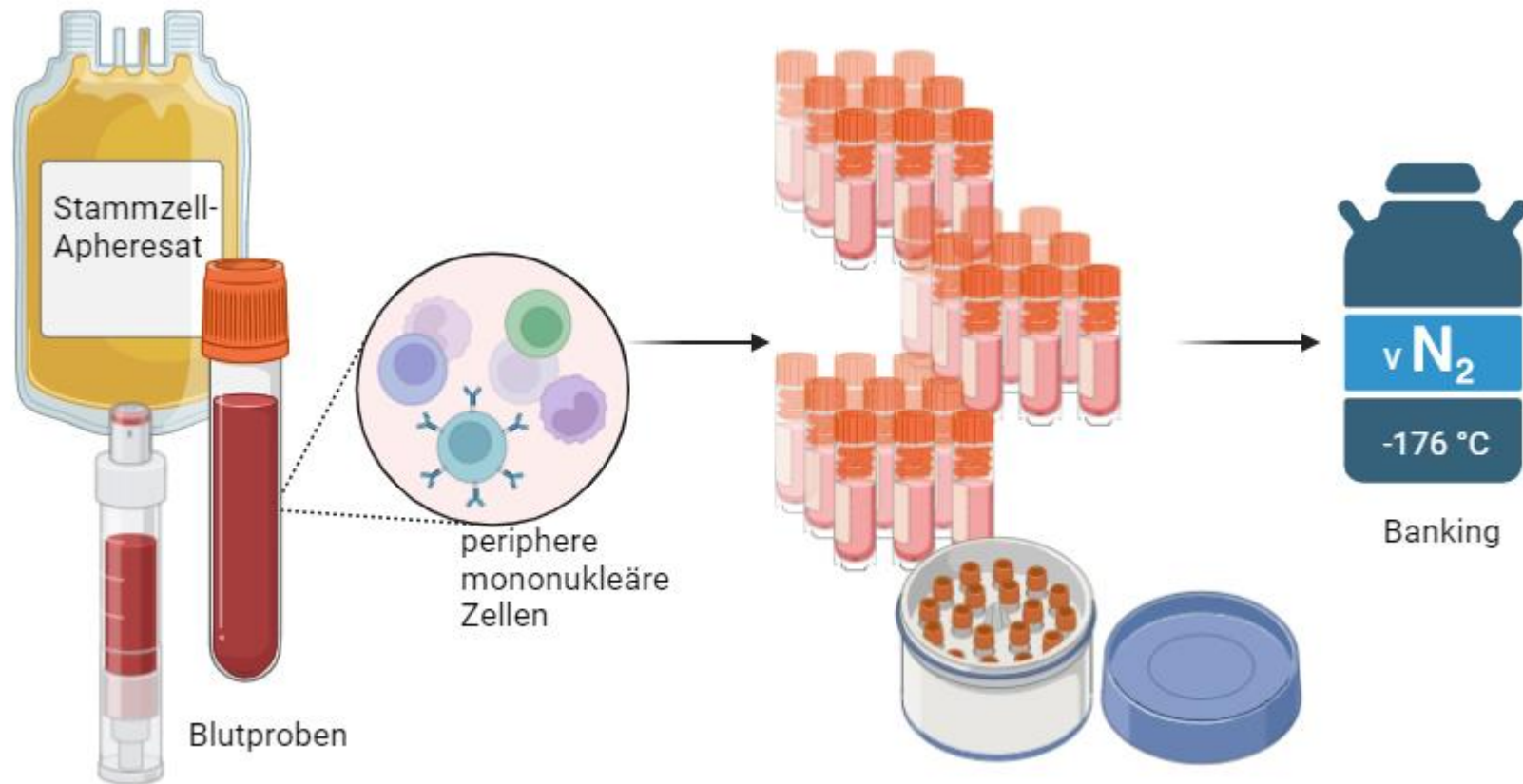


COLLABORATIVE BIOBANK

- CoBi -



COLLABORATIVE BIOBANK - CoBi -





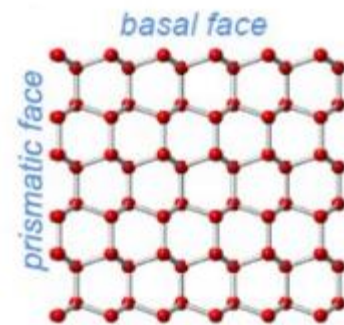
≠



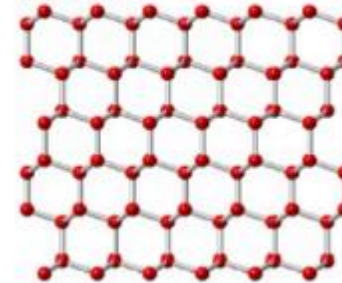
(a) layer of water ice



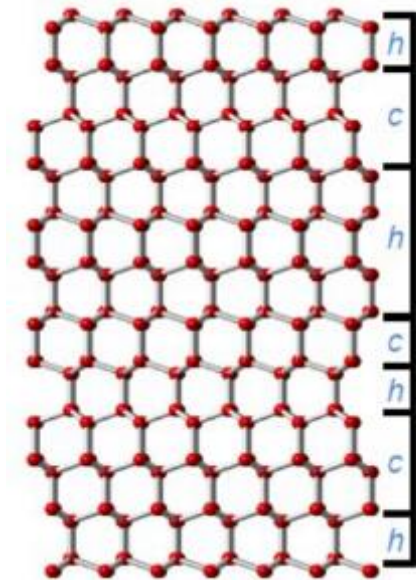
(b) hexagonal



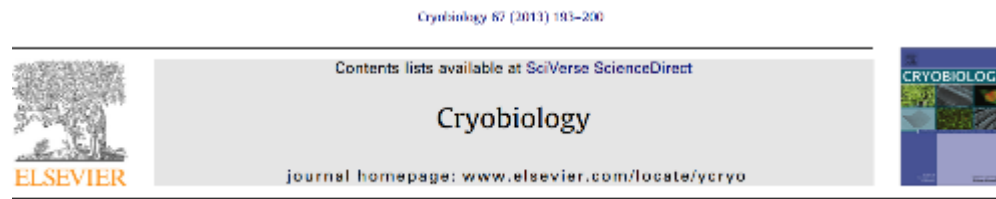
(c) cubic



(d) Stacking disordered



- -135 °C = Kritische Temperatur: Glas transition temperature of water GTTW
- -176 °C = Lagerung in der Gasphase des flüssigen N₂



Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function

Anja Germann^a, Young-Joo Oh^a, Tomm Schmidt^a, Uwe Schön^a, Heiko Zimmermann^{a,b}, Hagen von Briesen^{a,*}

^aTransfertechnik für Biomedizinische Engineering, Eschweimerstr. 48, 66386 St. August, Germany
^bLehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Biotechnologie/Nanotechnologie, Universität des Saarlandes, 66123 Saarbrücken, Germany

Yang et al. BMC Immunology (2016) 17:6
DOI 10.1186/s12865-016-0144-1

BMC Immunology

RESEARCH ARTICLE

Open Access

The effects of storage temperature on PBMC gene expression

Jun Yang¹, Norma Diaz¹, Joseph Adelsberger¹, Xueyuan Zhou¹, Randy Stevens¹, Adam Rupert¹, Julia A. A. Mike Baseler¹, Christine Barbon³, Tomozumi Imamichi¹, Richard Lempicki¹ and Louis M. Cosentino^{3*}



Current Stem Cell Reports (2022) 8:72–92
<https://doi.org/10.1007/s40778-022-00212-1>

POLICY: FROM CLINIC TO BENCH (G MOLL AND N DRZENIEK, SECTION EDITORS)



developed. At temperatures below **-130 °C**, metabolic activity is significantly reduced and cells can theoretically be stored for long periods without effects on properties and function [18].

Suboptimal cryopreservation results in a significant decrease of cell viability and number, and may also cause alterations of the cellular phenotype and a reduction of the immunogenic response to specific antigens [6,22,24,29,32,34,46,48]. Cryopreservation can af-

...SOME DEVICES HAS NOT BEEN APPLICABLE.

According to best practice [12], in order to maintain viability of PBMCs, they need to be stored below **-132 °C**, the glass transition temperature of water (GTTW). This is the temperature, at or below, that all biological activity stops [13]. Often, biospecimen storage temperature

Impact of Cryopreservation and Freeze-Thawing on Therapeutic Properties of Mesenchymal Stromal/Stem Cells and Other Common Cellular Therapeutics

Chasen Cottle¹ · Amanda Paige Porter¹ · Ariel Lipat¹ · Caitlin Turner-Lyles¹ · Jimmy Nguyen¹ · Guido Moll² · Raghavan Chinnadurai¹



- **Wie können die Proben einer Biobank bestmöglich vor Temperaturschwankungen geschützt werden?**

Insbesondere die „innocent samples“

- Anwenderspezifische Fragestellung für Lagerung und Nutzung von Biobank-Proben
- Vorgaben für Qualitätsmanagement
- Anbindung IT und Schnittstellen zu den Datenbanken/LIMS
- Wissenschaftler:innen → experimentelle Einbindung der Proben aus einer Biobank





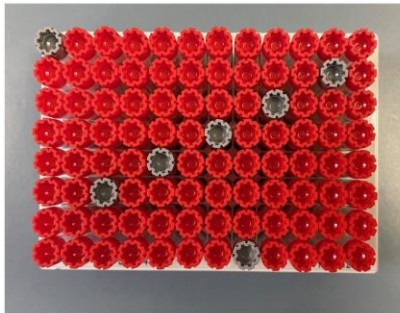
- **Zielsetzung:**

Wieviel Zeit steht für die Entnahme von Cryotubes zur Verfügung, bis die Temperatur in den Proben einen Grenzwert von -135 °C erreicht/überschreitet?

→ Füllvolumen 1ml RPMI / 15 % HS / 10 % DMSO
(repräsentativ für Volumen / Konzentration unseres Einfriermediums für hPBMCs)

Setup-Options

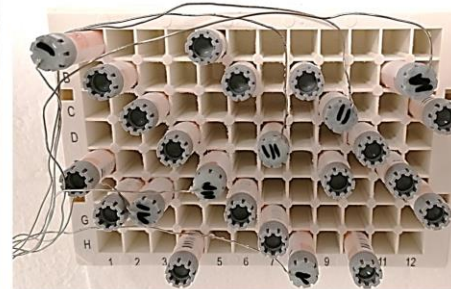
Thermoelemente im Vial Positionierung im Rack; 100 %



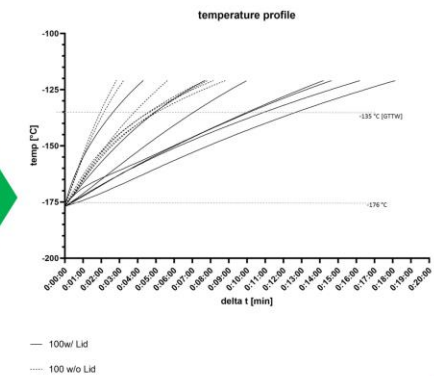
50 % Fülllevel



25 % Fülllevel



Temperatur
Profil
Start -176 °C



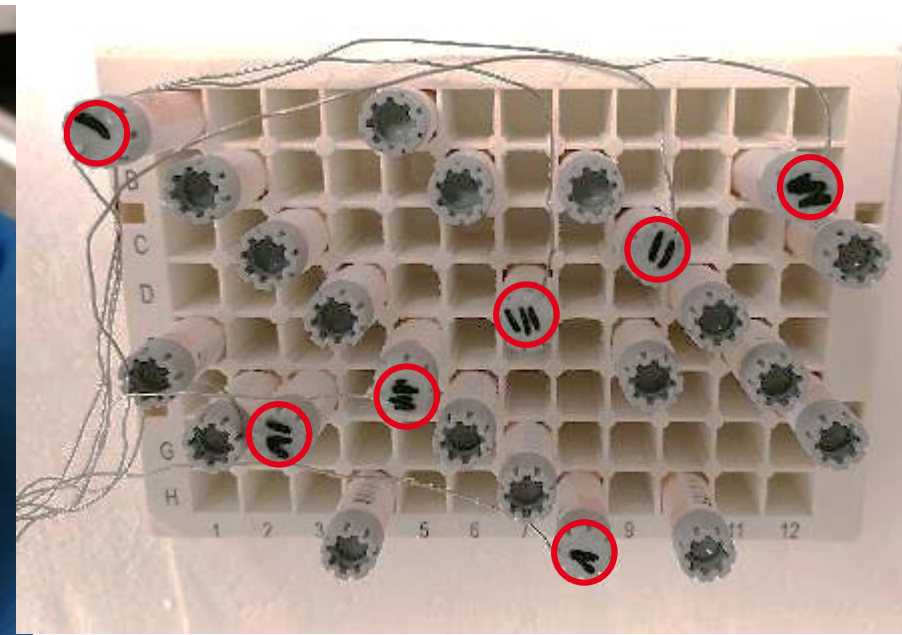
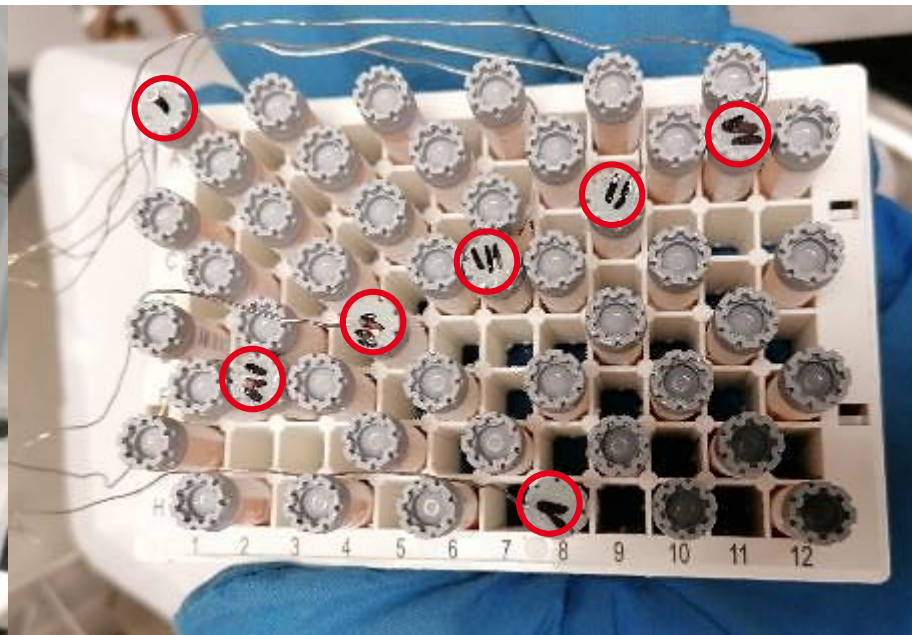
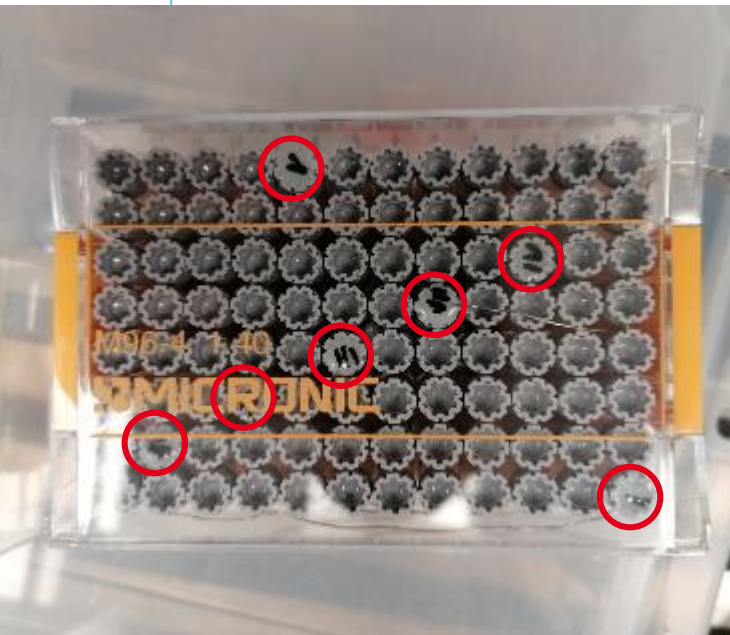


- **Setup:**
- Thermoelemente [Typ Omega TJC2-NNIN-IM050U-800 0.50 mm type N] durch ein Loch im Kryotube-Deckel vollständig ins Einfriermedium eingetaucht
- Vials mit den Thermoelementen wurden an die vorgesehenen Positionen im Rack positioniert





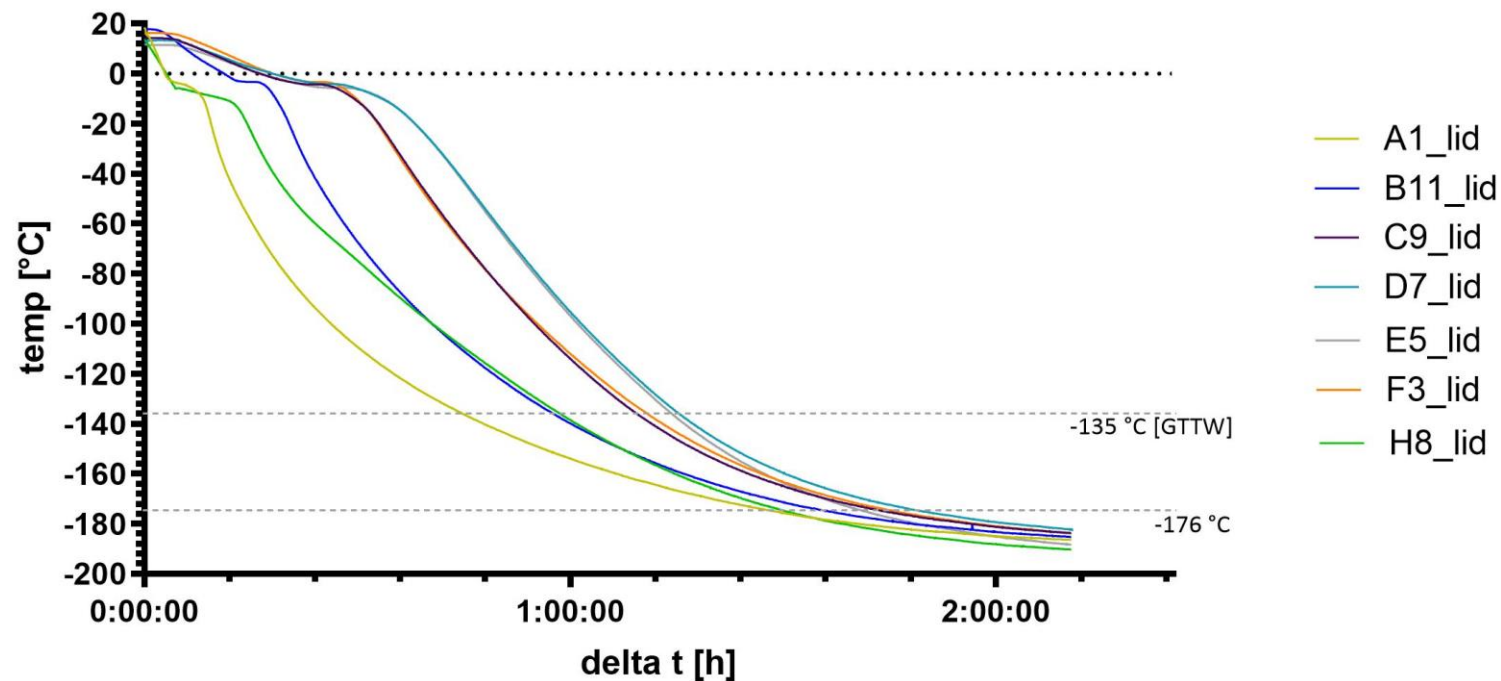
- **Setup:**
- Bedingungen: Füllstand des Racks (100 % / 50 % / 25 %), jeweils mit und ohne Abdeckung





- **Setup:**
 - Racks wurden in vLN2 temperiert
 - Profi Signal 4.2.0.50 Software
 - 7 Thermoelemente
 - 6 verschiedene Konditionen (3 verschiedene Rack-Fülllevel, mit und ohne Abdeckung)

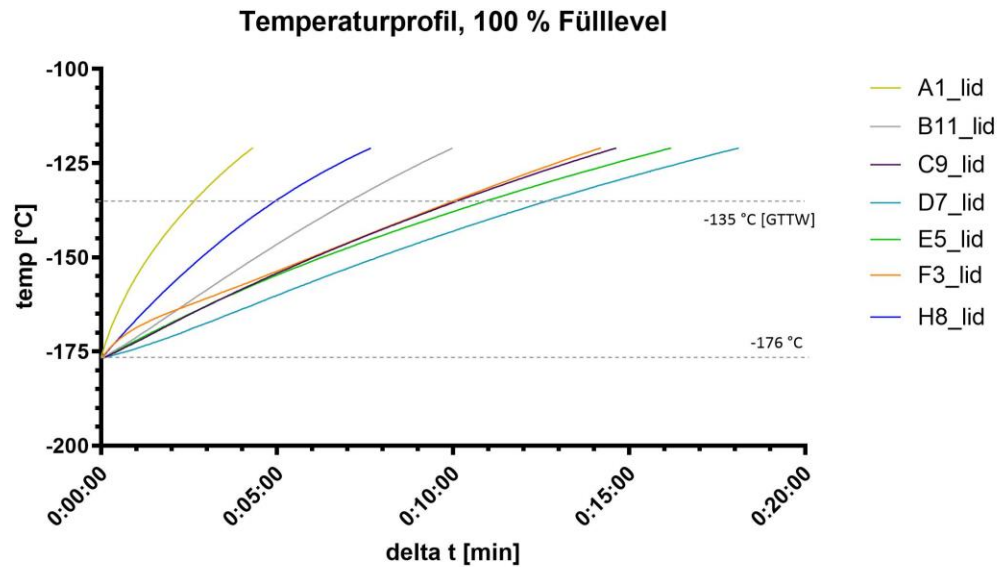
Abkühlung im Tank, 100 % Fülllevel





- Temperaturprofil eines Racks mit 100 % Fülllevel

- -176 °C = Temperatur vLN₂
- -135 °C = Kritische Temperatur: GTTW



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	02:33											
B											06:54	
C									09:51			
D							12:22					
E					10:38							
F		09:46										
G												
H								04:49				

mit Abdeckung



- -176 °C = Temperatur vLN₂
- -135 °C = Kritische Temperatur: GTTW

- **Temperaturprofil eines Racks mit 100 % Fülllevel**



mit Abdeckung

• Ohne Abdeckung:
1/2 der verfügbaren Zeit



ohne Abdeckung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	02:33											
B											06:54	
C									09:51			
D							12:22					
E					10:38							
F			09:46									
G												
H								04:49				

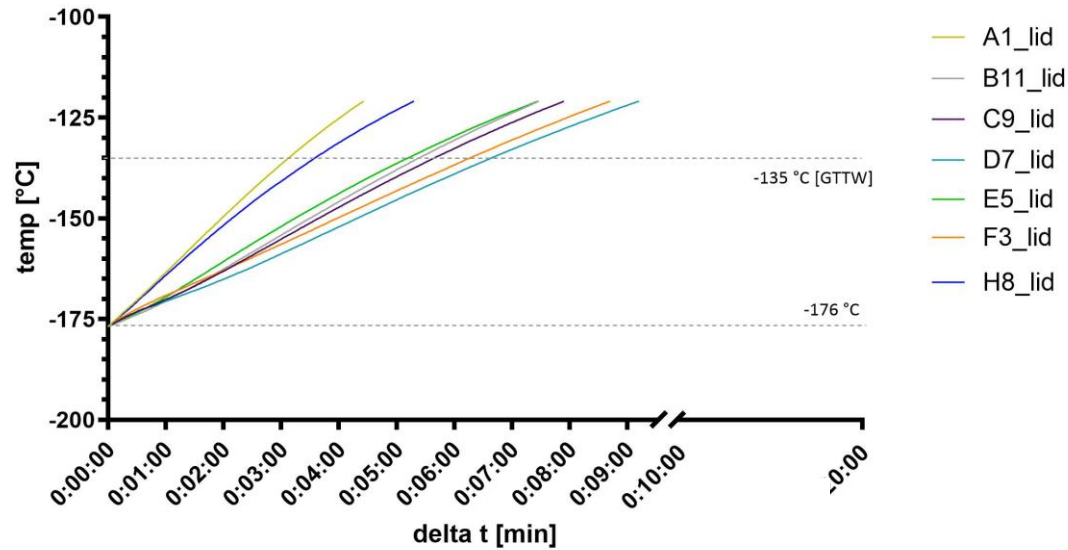
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01:54											
B											03:43	
C									04:26			
D								04:52				
E					04:27							
F			04:45									
G												
H									02:06			



• Temperaturprofil eines Racks mit 50 % Fülllevel

- -176 °C = Temperatur vLN₂
- -135 °C = Kritische Temperatur: GTTW

Temperaturprofil, 50 % Fülllevel



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	03:03											
B											05:16	
C									05:32			
D							06:30					
E					05:04							
F			06:08									
G												
H								03:29				

mit Abdeckung



- -176 °C = Temperatur vLN₂
- -135 °C = Kritische Temperatur: GTTW

- **Temperaturprofil eines Racks mit 50 % Fülllevel**



mit Abdeckung

• Ohne Abdeckung:
1/3 der verfügbaren Zeit



ohne Abdeckung

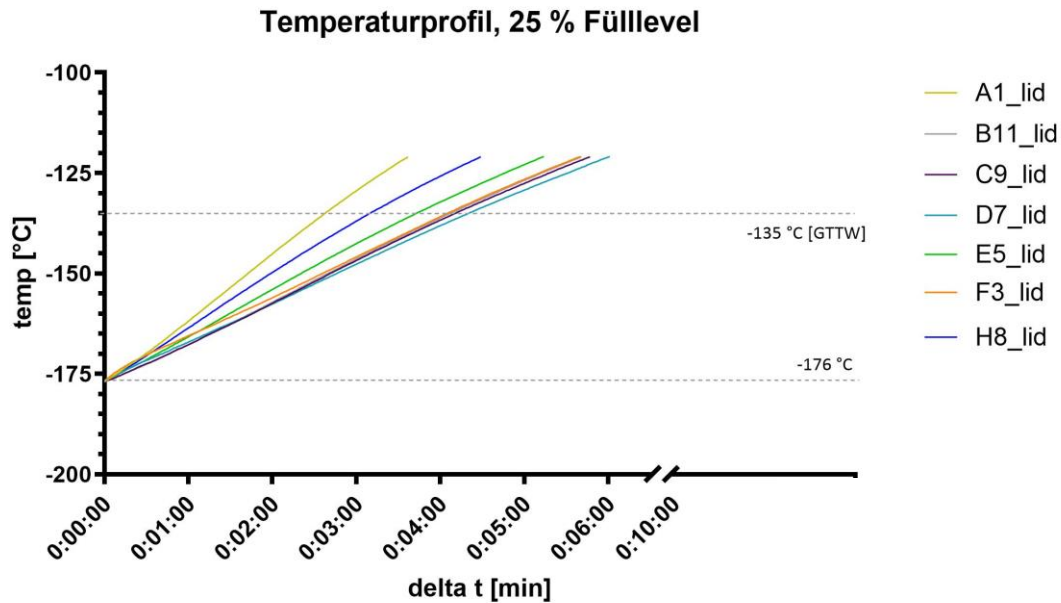
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	03:03											
B											05:16	
C									05:32			
D							06:30					
E					05:04							
F			06:08									
G												
H								03:29				

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01:31											
B											02:07	
C									01:38			
D								02:22				
E					01:50							
F			02:13									
G												
H									01:30			



- **Temperaturprofil eines Racks mit 25 % Fülllevel**

- -176 °C = Temperatur vLN₂
- -135 °C = Kritische Temperatur: GTTW



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	02:35											
B											04:02	
C									04:05			
D							04:14					
E					03:38							
F		04:00										
G												
H								03:05				

mit Abdeckung



- -176 °C = Temperatur vLN₂
- -135 °C = Kritische Temperatur: GTTW

- Temperaturprofil eines Racks mit 25 % Fülllevel



mit Abdeckung

• Ohne Abdeckung:
1/4 der verfügbaren Zeit



ohne Abdeckung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	02:35											
B											04:02	
C									04:05			
D							04:14					
E					03:38							
F			04:00									
G												
H								03:05				

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01:01											
B											00:53	
C									00:53			
D							01:01					
E					01:03							
F			01:00									
G												
H								01:02				

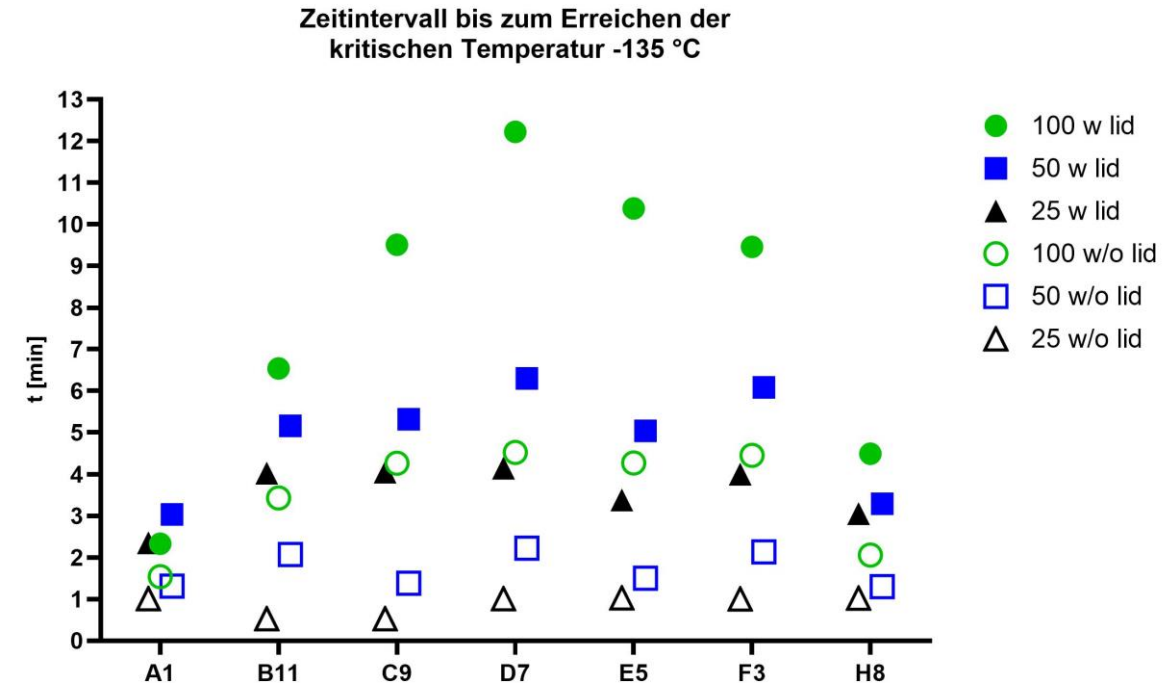


- Eck- bzw. Randbefindliche Tubes sind die gefährdesten:

Referenz A1:

1 min – 2 min in Abhängigkeit von der Nutzung einer Abdeckung

- Verfügbare Zeit steht im Zusammenhang zum Fülllevel und zur Nutzung der Abdeckung



→ Experimentelles Setting als Richtwerte für eine möglichst gute Übertragbarkeit auf verschiedenste Anwender

→ Biobank-spezifische Bedingungen (Tubes, Medien, Zelllinie, Entnahmeprozesse....)



→ Fazit:

Voraussetzung für gleichbleibende gute Qualität der Biobank-Proben ist es, die Zeit des Probenracks außerhalb des Temperaturbereichs so gering wie möglich zu halten und Temperaturschwankungen zu reduzieren

→ Grenzwerte von max. 2 min für den Entnahmeprozess bei Raumtemperatur einhalten



• **Perspektiven:**

- Festsetzung dieser Zeiten für Qualitätssicherung der CoBi-Proben
- Nutzung eines Cryopods (-176 °C) statt Trockeneis
- Weitere Experimente zu konkreten Auswirkungen zyklischer Temperaturschwankungen im Zuge der Kryokonservierung (Vitalität, DNA-Qualität, Proteom, Metabolom....)



Vielen Dank für die Aufmerksamkeit!



**Clinical Trials Unit der
DKMS Group gGmbH
– Johannes Schetelig**

Nicole Heymann
Lisa Heiduschke
Christian Klesse
Falk Heidenreich

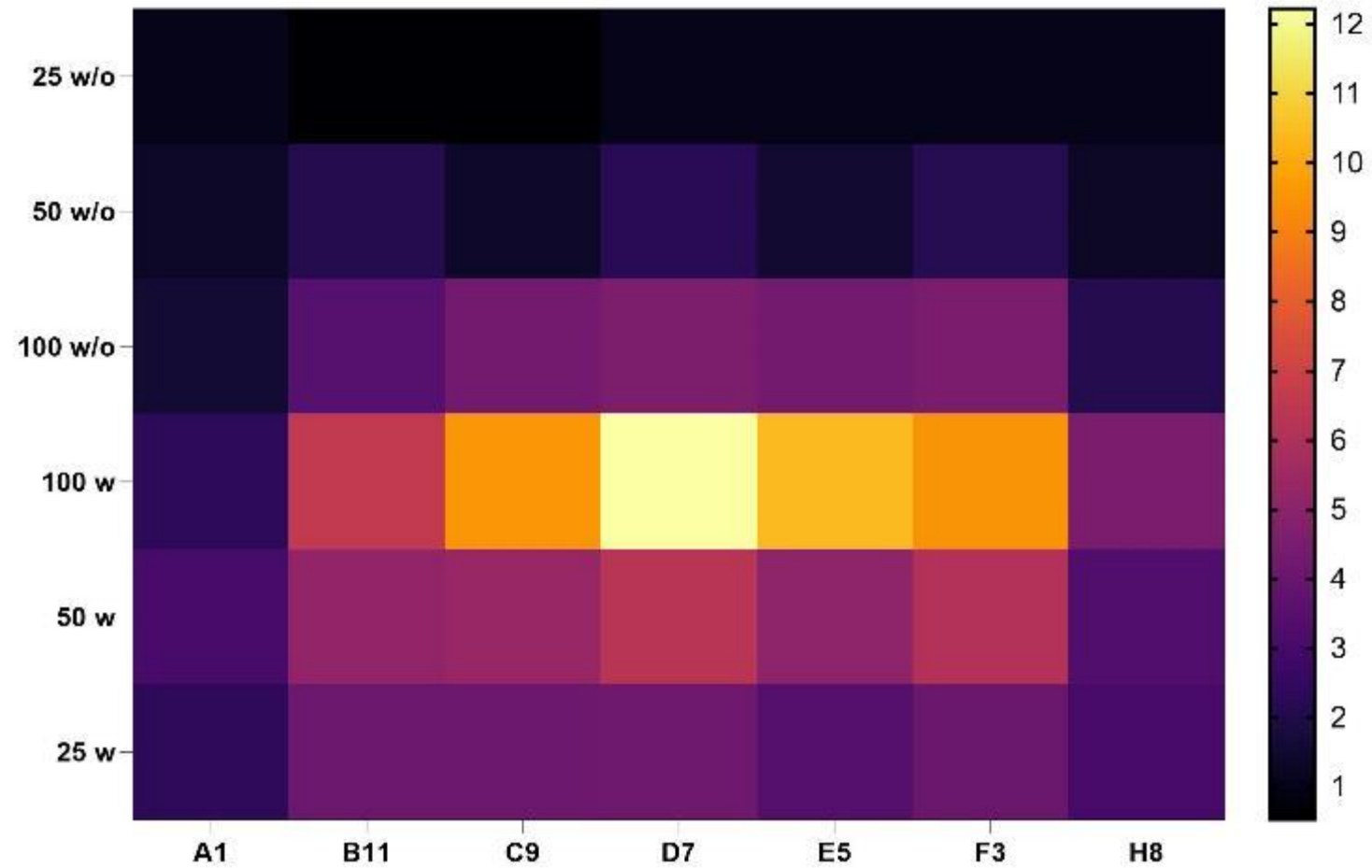


**Institut für Luft- und
Kältetechnik gGmbH,
IKL Dresden
René Kretschmer**

**TU Dresden Institut für
Energietechnik
Schaufler-Professur für
Kälte-, Kryo- und
Kompressionstechnik
Christoph Haberstroh
Sebastian Eisenhut**

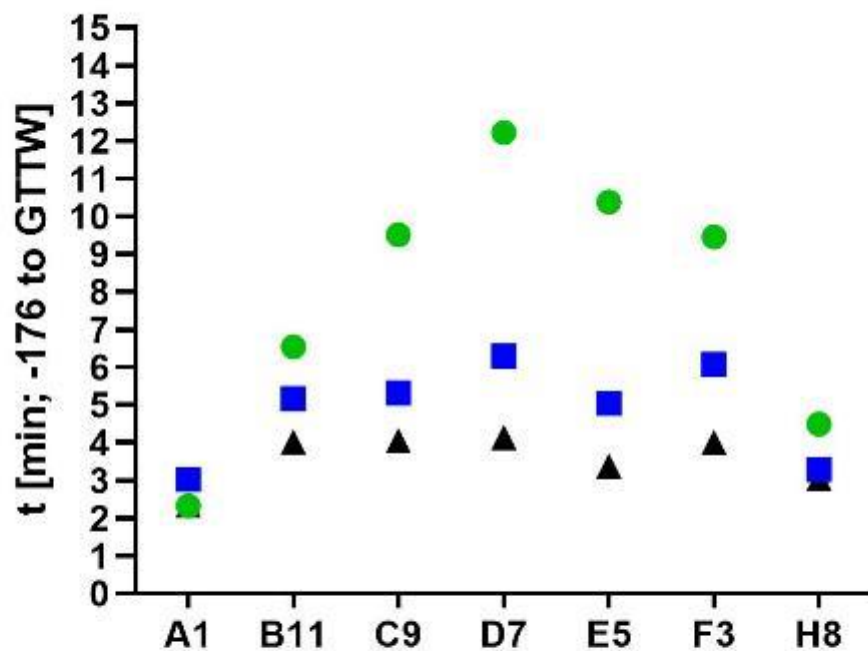


Zeitintervall in Minuten von -176 °C bis zum Erreichen der kritischen Temperatur -135 °C



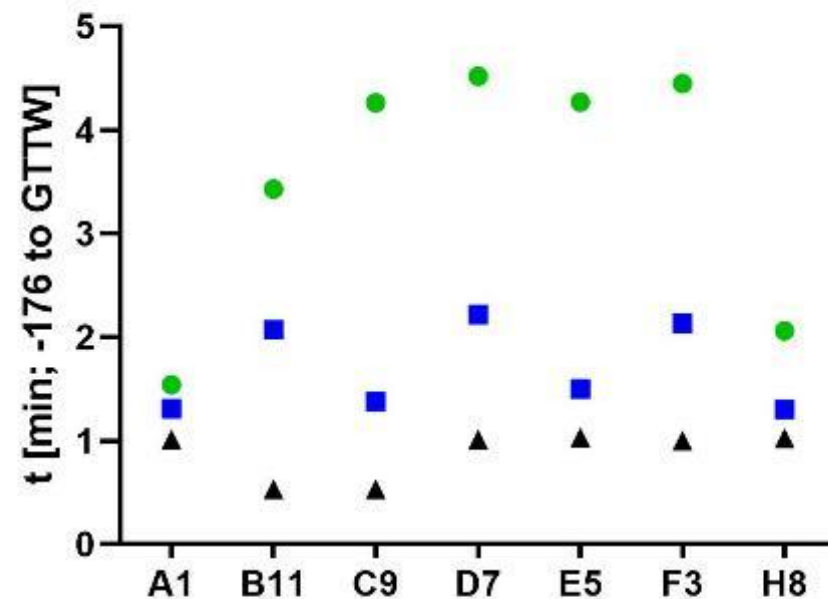


t [min; -176 °C to -135 °C]_with Lid



● 100 w lid	02:33	06:54	09:51	12:22	10:38	09:46	04:49
■ 50 w lid	03:03	05:16	05:32	06:30	05:04	06:08	03:29
▲ 25 w lid	02:35	04:02	04:05	04:14	03:38	04:00	03:05

t [min; -176 °C to -135 °C]_w/o Lid



● 100 w/o lid	01:54	03:43	04:26	04:52	04:27	04:45	02:06
■ 50 w/o lid	01:31	02:07	01:38	02:22	01:50	02:13	01:30
▲ 25 w/o lid	01:01	00:53	00:53	01:01	01:03	01:00	01:02