

Corso S.I.B.O 2010
Lucca 6/11/2010

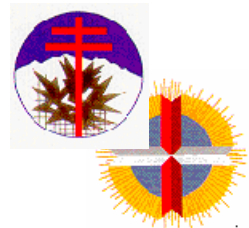
Membrana Amniotica vitale e non vitale: pro e contro

P.Indemini, A.Sava

Banca Membrana Amniotiche Regione Piemonte

P.Torresan

Banca Occhi Regione Marche



Tecniche di conservazione

Combinazione appropriata di condizioni che mantiene la qualità dei tessuti durante periodi di deposito specificati.

-Linee guida per il prelievo, la proc.....19-6-2007



Tecniche di conservazione

- Crioconservazione
 - uso di crioprotettore
 - raffreddamento controllato
 - conservazione T-140/-160,-196°C
 - vitale
- Congelamento
 - T non criogeniche -80°C
 - non vitale
- Liofilizzazione
 - rimozione acqua dopo congelamento (ghiaccio-gas)
 - non vitale, arresto attività enzimatiche
 - arresto reazioni di degradazione, T ambiente, 12 mesi

Tecniche di conservazione

- Glicerolizzazione glicerolo 85-87 %, +2-+10°C, non vitale
- Disidratazione gel di silice
 - Cornea, 6 mesi
- Conservazione in etanolo 70%
 - Sclera
 - T ambiente, 12 mesi
- Conservazione "a freddo" +4°C (+2/+10°C)
 - Scadenza 5-10 giorni
- Conservazione "a caldo" +31°C (+31/+37)
 - Scadenza >20 giorni



Vitalità

La vitalità cellulare può essere definita come numero di cellule sane in un campione: il risultato si esprime come percentuale di cellule vitali sul totale di cellule.



Test di vitalità

- Tali indagini devono essere eseguite prima del congelamento e al momento dello scongelamento per la validazione dei tessuti prima dell'impiego
- Sulla membrana amniotica vitale, si devono effettuare specifici controlli di vitalità, che devono essere definiti nelle procedure della Banca. Ogni Banca deve inoltre definire un livello di vitalità cellulare, al di sotto del quale il tessuto non può essere distribuito come tessuto vitale.

-Linee guida per il prelievo, la proc.....19-6-2007

Metodiche

- Colorimetrico
- Basato sulla fluorescenza
- Tecniche radioisotopiche



Parametri indicatori di vitalità

- Permeabilità membrana plasmatica
- Sintesi del DNA, delle proteine
- Attività metabolica
- Capacità di duplicarsi



Test di vitalità

- MTT
- RN
- CFE
-



MTT Test

- MTT
 - test colorimetrico
 - si utilizza un agente ossidante cromogeno, MTT bromide, ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali, »Formazano=composto cromogeno azotato»cristalli insolubili intracellulari ai quali la cell è impermeabile»colore giallo»blu scuro violetto
 - saggio metabolico che permette di valutare alterazioni a livello cellulare
 - stima il numero di mitocondri attivi » cells vitali nel campione
 - effetti sulla integrità della membrana cellulare

RN

- **Test del Rosso Neutro (Neutral Red Cytotoxicity Test)**
 - test colorimetrico
 - permette un'analisi della vitalità cellulare in base alla capacità delle cellule di trattenere il colorante all'interno dei lisosomi



CFE

- CFE (colony forming efficiency)
 - misura la capacità di formare colonie a partire da un numero definito di cellule piastrate o inoculate
 - misura la capacità proliferativa delle cellule
 - espressa in percentuale
 - conteggio microscopico delle cellule totali nella camera di Burcker

Il processo di criopreservazione

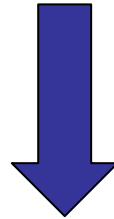
1. Congelamento del materiale biologico e raffreddamento fino ad una temperatura adeguata per lo stoccaggio
2. Stoccaggio del materiale biologico ad una temperatura adeguata
3. Scongelamento e riscaldamento del materiale fino alla temperatura di utilizzo.

Il congelamento: principi fisici

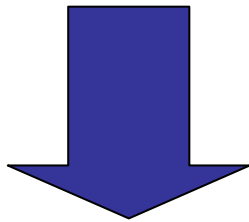
- Durante il raffreddamento, la formazione del ghiaccio ha inizio nell'ambiente extracellulare con concentrazione di soluti e conseguente disidratazione osmotica della cellula
- L'entità della disidratazione dipende principalmente dalla velocità di raffreddamento bassa o alta



Se la velocità di raffreddamento è troppo bassa



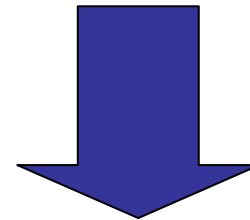
La cellula è esposta a concentrazioni crescenti di soluti cellulari dovute alla formazione di ghiaccio nel mezzo di soluzione



Alta concentrazione di soluti



Variazioni di pH

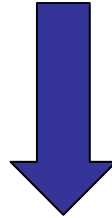


Disidratazione

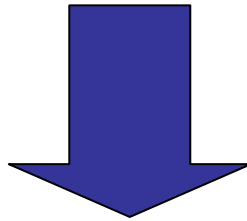


Aumento della pressione osmotica

Se la velocità di raffreddamento è troppo alta



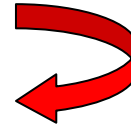
Formazione di nuclei di cristallizzazione sia nella soluzione
che all'interno della cellula



Danno meccanico



Cristalli interni



Cristalli esterni

Distruzione della membrana cellulare

Il congelamento: principi fisici

- Per ottimizzare la sopravvivenza cellulare occorre quindi raffreddare ad una velocità intermedia, sufficientemente veloce da non provocare eccessive concentrazioni di soluto e allo stesso tempo sufficientemente lenta da non indurre la cristallizzazione intracellulare.
- L'aggiunta di agenti crioprotettivi consente di aumentare la sopravvivenza cellulare dopo criopreservazione: essi alterano la rapidità dell'efflusso di acqua, la nucleazione e la formazione di cristalli di ghiaccio, modificando la modalità di congelamento delle cellule.

Congelamento

- Un congelamento a discesa di temperatura programmata, controllando la nucleazione e permettendo di compensare il calore di solidificazione rilasciato dal materiale che solidifica, consente di massimizzare la vitalità cellulare
- Si usano congelatori programmabili, che sfruttano l'azoto liquido per il raffreddamento
- Per le membrana amniotiche è stato sviluppato un protocollo di congelamento che consente di massimizzare la vitalità cellulare post-scongelamento

Stoccaggio

La temperatura di stoccaggio influenza il tempo durante il quale il materiale biologico può essere conservato:

- minore è la temperatura, più lungo è il periodo di stoccaggio
- a temperature $< -130^{\circ}\text{C}$ si ha l'arresto di qualsiasi reazione chimica e pertanto anche dei processi degradativi. Campioni stoccati a temperature $<$ a questa possono essere conservati vitali per anni

Lo stoccaggio può avvenire direttamente in azoto liquido oppure nei vapori di azoto:

- **Lo stoccaggio in azoto liquido** garantisce una temperatura di conservazione stabile, ma può generare problemi di contaminazione e cross-contaminazione dei campioni, qualora l'azoto avesse la possibilità di penetrare all'interno dei contenitori di stoccaggio. La penetrazione dell'azoto all'interno dei contenitori potrebbe anche causare esplosioni del contenitore durante il riscaldamento a seguito dell'espansione associata alla trasformazione in fase gassosa
- **Lo stoccaggio in fase vapore** riduce i precedenti rischi, ma non garantisce una temperatura stabile di stoccaggio

Scongelamento

- Per poter essere utilizzate, le membrane amniotiche devono essere riscaldate e scongelate
- Ai fini della vitalità cellulare gli effetti della velocità di riscaldamento sono importanti quanto quelli della velocità di raffreddamento
- I due fattori interagiscono fortemente: la velocità di riscaldamento ottima dipende, infatti, dal precedente profilo di congelamento
- Si utilizza una velocità elevata di scongelamento per garantire il mantenimento della vitalità

Pro e contro

- Costi
- Spazi
- Tempi
- Contaminazione
- Variabili
 - Antibiotici (scarti)
 - Tempo prelievo-processazione
- Risultato clinico
 - -80 PATCH
 - -140/-160 GRAFT



Letteratura

- **Valutazione clinica sull'efficacia dell'innesto di MA (vitale-non vitale) nelle patologie della superficie oculare ed in campi non oculistici**

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2009 Dec;247(12):1691-700.

Comparison of cryopreserved and air-dried human amniotic membrane for ophthalmologic applications.

Thomasen H., Pauklin M., Steuhl KP., Meller D.

Department of Ophthalmology, University of Duisburg-Essen, Hufelandstrasse 55, 45122 Essen, Germany

- **Uso MA come supporto di crescita...**

J Tissue Eng Regen Med. 2009 Dec;3(8):651-4.

Impact of human amniotic membrane preparation on release of angiogenic factors.

Wolbank S., Hildner F., Redl H., van Griensven M., Gabriel C., Hennerbichler S.

Ludwig Boltzmann Institute for Experimental and Clinical Traumatology/AUVA Research Centre, Linz/Vienna, Austria.

- **Le differenti tecniche di preparazione e conservazione producono differenti effetti sulle proprietà fisiche e biologiche della MA**

Preservation, sterilization and de-epithelialization of human AM for use in ocular surface reconstruction

Riau A.K., Beuerman R.W., Lim L.S., Mehta J.S.

Biomaterials 31 (2010) 216-225

Curr Eye Res. 2007 Jul-Aug;32(7-8):611-6.

The expression of TIMPs in cryo-preserved and freeze-dried amniotic membrane

Koh JW., Shin YJ., Oh JY., Kim MK., KO JH., Hwang JM., Wee WR., Lee JH.

Department of Ophthalmology, Chosun University College of Medicine, Gwangju, and Seoul National University Hospital Clinical Research Institute, Korea

- Nuove possibilità di distribuzione della MA
 - AMX
 - Prokera
 - Acelagraft
- Quale metodo di preparazione scegliere.....
- In base all'impiego previsto....

Studio multicentrico

In Italia

| | Conservazione | Test di vitalità | |
|----------|---------------|------------------|----------|
| Bologna | -80°C | | |
| Cosenza | -80°C | | |
| Fabriano | -140°C | MTT test | |
| L'Aquila | -80°C | | |
| Lucca | -80°C | | |
| Roma | -140°C | Trypan blu | |
| Imola | -80°C | | Collirio |
| Treviso | -140°C | MTT test | |
| Cuneo | -140°C | | |



Grazie