

SIBO - Napoli 23 aprile 2016

Terreni di coltura per cornee autoassemblati: primi risultati

**Centro Conservazione Cornee P. Perelli
Ospedale San Luca - Lucca**

Dr. Marco Luporini

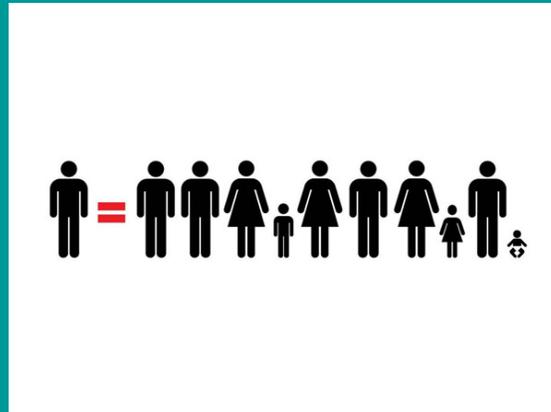


La Banca delle Cornee "Piero Perelli", Centro di riferimento regionale Toscano, ha come compito la valutazione, la conservazione e la distribuzione del tessuto corneale certificato idoneo al trapianto.

Oltre al tessuto corneale viene prodotta membrana amniotica da placenta in frammenti utili all'uso in oftalmologia e dermatologia.

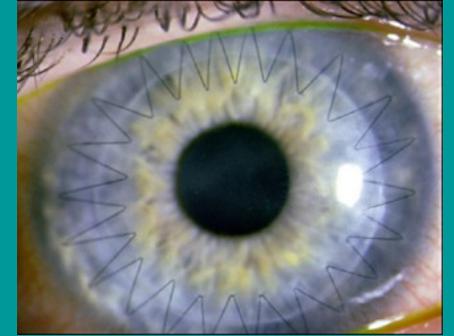


**Nel 2015 sono state prelevate circa 1200 cornee.
Sono state messe in coltura circa 900 cornee;
trapiantate 490 cornee.**



E' per noi fondamentale :

- cercare di garantire l'autosufficienza regionale;
- garantire la sicurezza dei tessuti;
- garantire la miglior qualità possibile;
- cercare di soddisfare le varie richieste dei nostri chirurghi, restando al passo con il progredire della tecniche e della strumentazione.



La necessità di fornire tessuti di qualità sempre migliore e il nostro costante impegno nel cercare di distribuire tessuti che siano sicuri, ha stimolato in noi l'interesse nel verificare se ci fosse la possibilità di auto-assemblare un terreno di coltura per le cornee con o senza siero fetale bovino.

Il terreno attualmente utilizzato nella nostra banca per la coltura dei tessuti è il TISSUE-C.

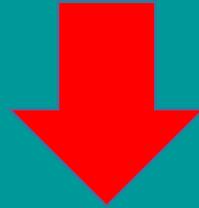
Un terreno auto-assemblato offrirebbe diversi vantaggi:

- ✓ maggior sicurezza (senza siero --> nessun rischio malattie da prioni);
- ✓ conoscenza della provenienza di ogni componente;
- ✓ qualità dei componenti utilizzati e possibilità di scegliere il migliore;
- ✓ possibilità di variare la tipologia e concentrazione degli antibiotici;
- ✓ possibilità di poter variare la composizione se necessario;
- ✓ possibilità di sostituire il terreno durante la coltura a basso costo;
- ✓ notevole risparmio economico.

✓ notevole risparmio economico

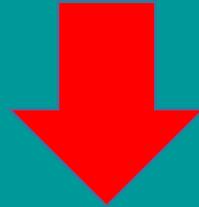


✓ notevole risparmio economico



Nel 2015 la spesa stimata per la sola coltura delle cornee si è aggirata intorno ai 70.000 – 80.000 €.

✓ notevole risparmio economico

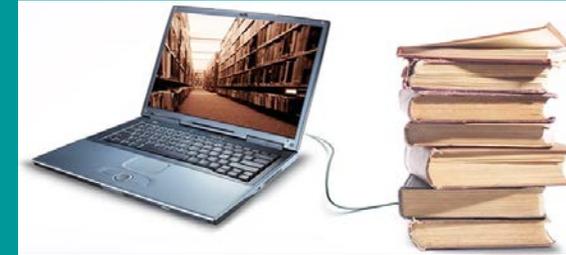


Nel 2015 la spesa stimata per la sola coltura delle cornee si è aggirata intorno ai 70.000 – 80.000 €.



Con un terreno auto-prodotto la spesa annua si ridurrebbe a circa 20.000 €, con un risparmio di circa 50.000 – 60.000 € solo per la coltura, se si aggiunge anche la produzione del terreno di trasporto il risparmio sarebbe circa il doppio.

La nostra attenzione si è concentrata inizialmente sullo studio e la ricerca in letteratura dei vari componenti e delle varie formulazioni dei terreni usati.



Abbiamo iniziato quindi a procurare i materiali necessari per fare le varie prove sia con che senza siero fetale bovino.



Tutte le varie prove sono state allestite utilizzando tessuti smaltiti perché non adatti ad essere destinati al trapianto.

Questi tessuti sono stati valutati a freddo considerando :

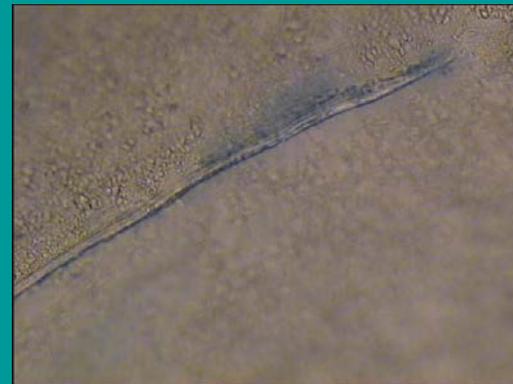
- ✓ la valutazione della mortalità endoteliale;
- ✓ la conta endoteliale se possibile;
- ✓ la morfologia cellule endoteliali;
- ✓ l'architettura endoteliale.

Dopo la valutazione i tessuti sono stati messi nei vari terreni e rivalutati ogni 6/8 giorni fino ad un tempo massimo di 30/35 giorni.

Ad ogni controllo i tessuti sono stati colorati con trypan blue e osservati al microscopio invertito a grande e piccolo ingrandimento.

Ad ogni osservazione si valutava:

- ✓ l'andamento della mortalità,
- ✓ l'andamento della densità endoteliale;
- ✓ la morfologia cellule endoteliali;
- ✓ l'architettura endoteliale.



Prove con siero fetale bovino (FBS)

Prova con FBS

La **prima prova** è stata svolta utilizzando un terreno formulato con:

- IMDM con rosso fenolo e hepes buffer e glutamax
- Antibiotico, antimicotico
- **FBS γ irradiato**

Sono stati messi in coltura 7 tessuti.

L'analisi ha mostrato:

- ✓ Cellule endoteliali ben visibili;
- ✓ Riduzione mortalità;
- ✓ Mantenimento integrità dell'architettura del mosaico endoteliale.

Confronto tra FBS e TISSUE-C

La **seconda prova** si è svolta mettendo in coltura due cornee di uno stesso donatore.

- Una cornea è stata messa in coltura nel terreno TISSUE-C da noi attualmente utilizzato,
- L'altra cornea è stata messa in coltura nel terreno formulato con :
 - DMEM/HAMF12 con rosso fenolo
 - HEPES BUFFER
 - GLUTAMAX
 - Antibiotico, antimicotico
 - **FBS γ irradiato**

Dal confronto si è osservato:

- ✓ Buon mantenimento della cellularità endoteliale;
- ✓ Riduzione della mortalità endoteliale;
- ✓ Mantenimento integrità del mosaico endoteliale.



Prove con sostituti del siero fetale bovino (FBS)

Prova con sostituto del FBS (Insulina, Transferrina e Selenio (ITS))

La **prima prova** è stata svolta utilizzando un terreno formulato con :

- DMEM/HAMF12 con rosso fenolo
- HEPES BUFFER
- GLUTAMAX
- Antibiotico, antimicotico
- **Insulina, Transferrina e Selenio (ITS)**

Sono stati messi in coltura 14 tessuti,

L'analisi ha mostrato:

- ✓ Netto declino della cellularità;
- ✓ Scarsa riparazione endoteliale;
- ✓ Leggera sofferenza endoteliale;
- ✓ Epitelio opaco e molto edematoso.

Prova con sostituto del FBS (HL-1 supplement)

La **seconda prova** è stata svolta utilizzando un terreno formulato con :

- DMEM/HAMF12 con rosso fenolo
- HEPES BUFFER
- GLUTAMAX
- Antibiotico, antimicotico
- **HL-1 supplement (sostituto chimico del siero fetale)**

Sono stati messi in coltura 9 tessuti.

L'analisi ha mostrato:

- ✓ Cellule endoteliali ben visibili;
- ✓ Lieve riduzione mortalità;
- ✓ Difficoltà nel mantenere l'integrità del mosaico endoteliale (comparsa di zone di scopertura).

Prova con sostituto del FBS (XF-205)

La **terza prova** è stata svolta utilizzando un terreno formulato con :

- DMEM/HAMF12 con rosso fenolo
- HEPES BUFFER
- GLUTAMAX
- Antibiotico, antimicotico
- **XF-205 (additivo sintetico alternativo al siero fetale, 5 volte più concentrato)**

Sono stati messi in coltura 10 tessuti.

L'analisi ha mostrato:

- ✓ Margini e cellule endoteliale ben visibili;
- ✓ Riduzione significativa dell'eventuale mortalità presente;
- ✓ Mantenimento integrità del mosaico endoteliale, con pochissimo polimorfismo;
- ✓ Epitelio trasparente e poco edematoso.

Confronto sostituto del FBS (XF-205) e TISSUE-C

La **quarta prova** è stata svolta confrontando il terreno da noi prodotto con aggiunta di XF205 con il TISSUE-C.

Sono stati messi in coltura 4 tessuti, provenienti da 2 donatori.

Per ogni donatore:

- 1 tessuto è stato messo in TISSUE-C
- l'altro nel terreno con XF205

Dal confronto è emerso:

- ✓ Mantenimento ottimale della cellularità endoteliale;
- ✓ Riduzione della mortalità endoteliale;
- ✓ Mantenimento integrità del mosaico endoteliale;
- ✓ Buona trasparenza epiteliale.



CONCLUSIONI

Dall'analisi dei vari risultati ottenuti dalla coltura dei tessuti nei diversi terreni è emerso quanto segue:

Il terreno auto-assemblato con DMEM/HAM-F12 con aggiunta di XF-205 come sostituto del siero fetale ha dimostrato di ridurre significativamente la mortalità endoteliale e mantenere in ottimo stato le cellule endoteliali che appaiono ben visibili e con un ottima organizzazione del mosaico.

Riteniamo quindi che sia necessario svolgere prove ulteriori che valutino le ottime premesse di tale terreno.

Altro passo fondamentale



Altro passo fondamentale



VALIDAZIONE DELL'INTERO PROCESSO PRODUTTIVO



GRAZIE PER L'ATTENZIONE !