



CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE CRIOPRESERVATE DA SANGUE DI CORDONE OMBELICALE : VALUTAZIONE DELLA POTENCY E VITALITA NELLA CONSERVAZIONE A LUNGO TERMINE

^{1,2}Taricani S., ^{1,2}Olioso P., ^{1,2}Capone A., ^{1,2}Villanova I., ^{1,2}Brattelli A., ^{1,2}Ricciardi I.R., ^{1,2}de Thomas V., ^{1,2}Zaccagnini A., ^{1,3}Giancola R., ^{1,2}Bonfini T., ^{1,2,3}Accorsi P.

¹ Dipartimento Oncologico Ematologico, Ospedale Civile di Pescara; ² Banca regionale di sangue di cordone ombelicale; ³ Laboratorio di Citofluorimetria

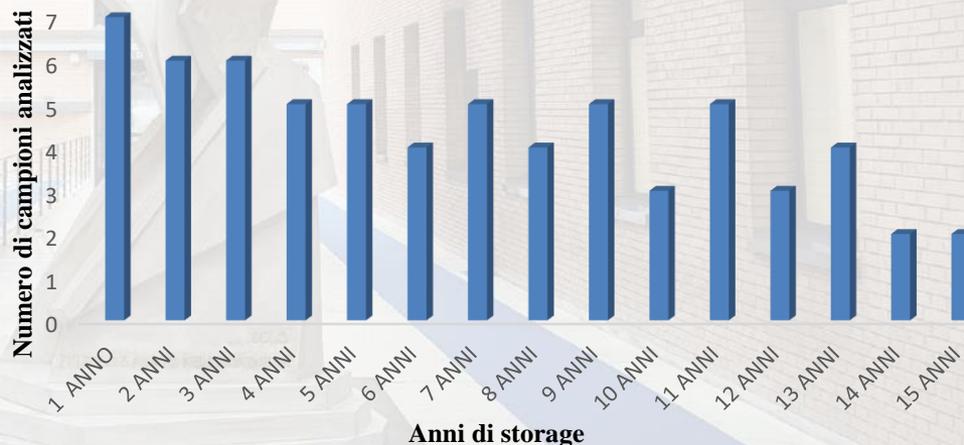
Introduzione

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE) rappresenta una terapia salvavita e di grande successo per la cura di numerose patologie ematologiche. Tale procedura, attraverso i fenomeni di HOMING (passaggio barriera endoteliale e adesione al compartimento midollare) ed ENGRAFTMENT (attecchimento), permette di ricostituire il sistema emopoietico nel paziente trapiantato.

La difficoltà nel reperire donatori HLA (Human Leucocyte Antigens) compatibili nell'ambito familiare o attraverso il registro internazionale (*BMDW*, *Bone Marrow Donor World Wide*) e la frequente necessità di un intervento terapeutico rapido (la ricerca di un donatore può richiedere vari mesi), hanno spinto ad individuare fonti alternative di CSE rispetto al midollo osseo e alle staminali periferiche.

Stimando una media di circa 130 milioni di nascite annuali globali, il sangue di cordone ombelicale (SCO) può essere considerato un possibile serbatoio di cellule staminali tanto che negli anni sono state istituite **"banche"**, per la conservazione delle CSE a lungo termine.

PARAMETRI	CRITERI	LIMITI (% casi)
Recupero TNC	≥50%	≥90
Vitalità TNC	≥40%	≥90
Recupero MNC	≥50%	≥90
Vitalità MNC	≥70%	≥90
Recupero CD34	≥50%	≥90
Vitalità CD34+	≥80%	≥90
Recupero CFU-GM	≥50%	≥80
Recupero CFC	≥50%	≥80



Scopo dello studio

Verificare vitalità e potency delle unità di sangue cordonale conservate presso la "Banca regionale del sangue placentare" PECBB ospedale "Santo Spirito" di Pescara, dopo 15 anni di criopreservazione in azoto, a temperature comprese tra -196°C e -150°C



Materiali e metodi

Il lavoro è stato effettuato con modalità retrospettiva su 66 unità di cordone ombelicale. Sono state scongelate unità di cordone con diversi anni di storage, e sono stati valutati i recuperi cellulari delle TNC (cellule nucleate totali), MNC (Cellule mononucleate), cellule CD34+, Colonie CFU-GM, CFU-C, e le vitalità cellulari delle TNC, MNC e CD34+ ed i criteri / limiti di accettabilità sono descritti nella tabella 1.

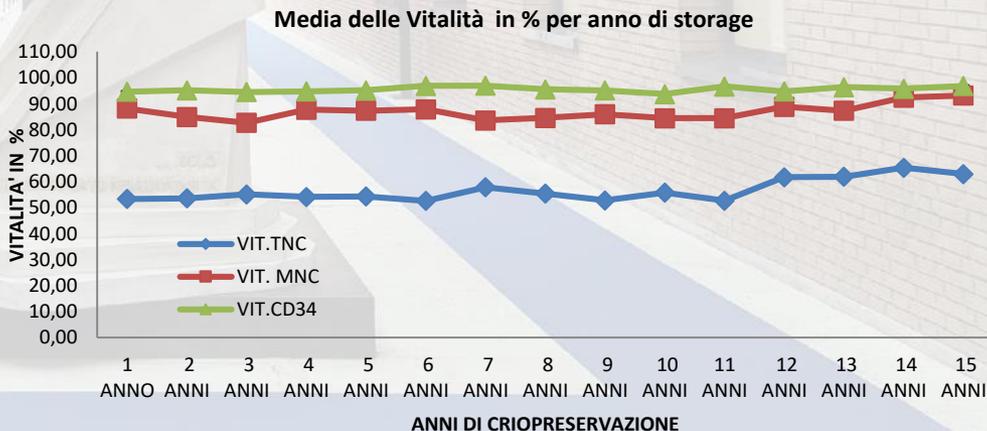
Le unità SCO, raccolte in sala parto dalla vena ombelicale in condizioni di sterilità, sono trasportate entro 36h dalla raccolta presso la PECBB. Se le TNC iniziali sono $\geq 15 \times 10^8$ l'unità viene avviata alla lavorazione per abbattere il volume e recuperare le CSE. Se le TNC post lavorazione risultano $\geq 12 \times 10^8$ le unità vengono criopreservate. Il protocollo di congelamento prevede l'impiego di soluzione criopreservante albuminata al 5%, destrano 40 al 4% e Dimetilsolfossido (DMSO) al 20%. La soluzione mantenuta a 4°C viene introdotta lentamente in rapporto 1:1 con il volume delle CSE. Dopo il congelamento a discesa controllata della temperatura, ottenuta mediante una camera di congelamento (ICECUBE), le unità sono conservate in contenitori di azoto a -196°C per il long term storage.

Prima della criopreservazione e post scongelamento sono stati eseguiti sulle unità i seguenti esami: test emocitometrico per conta TNC, test citofluorimetrico per conta CD45+; MNC; CD34+; 7AAD- (per vitalità cellulare), test clonogenico per calcolo delle CFU-GM, e test microbiologico per il controllo della sterilità delle unità.

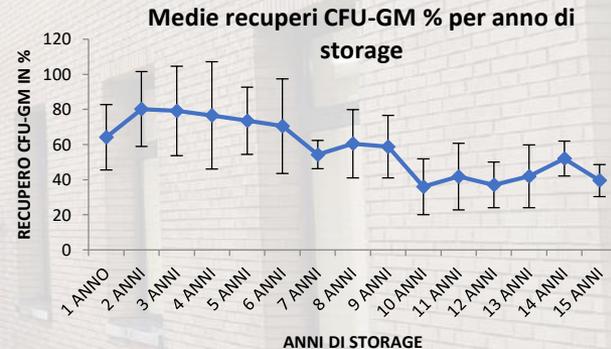
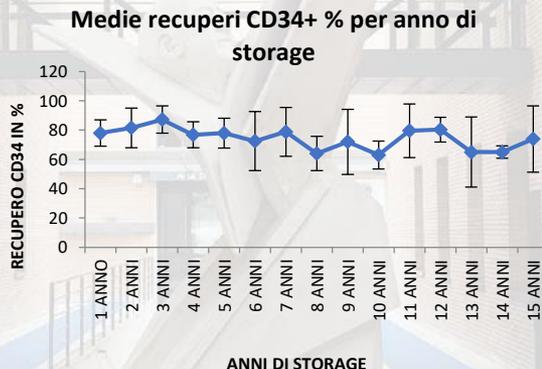
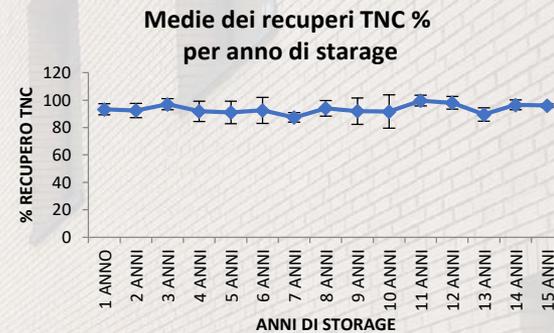
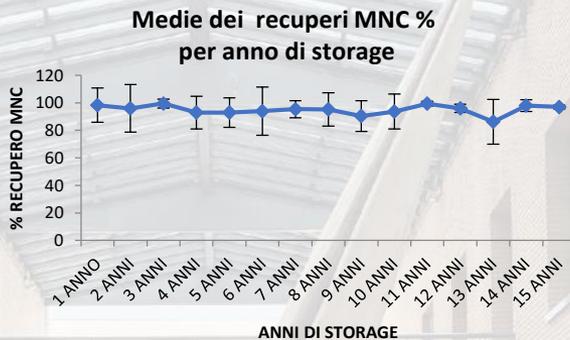
Risultati

Sono state calcolate media con deviazione standard e mediane con minimo e massimo della vitalità e dei recuperi dei campioni scongelati. Il recupero tra il valore post e pre criopreservazione è espresso come %. In tutti i casi i test di sterilità sono risultati negativi. Inoltre i risultati sono stati confrontati con i criteri di accettabilità ed i limiti presenti in Tabella 1.

TAB.2	VITALITA' TNC %	VITALITA' MNC %	VITALITA' CD34+ %
N° campioni	65	65	65
Mediana	55,90	86,40	95,60
Min	31,30	64,17	86,70
Max	77,70	97,50	100,00
Media	55,67	86,234	95,45
Dev.st	10,58	7,72	2,95
Cv	19,01	8,89	3,09
% casi che rientrano nei criteri	60/65 (91%)	63/65 (97%)	65/65 (100%)



TAB.3	REC TNC	REC. MNC	REC. CD34	REC. CFU-GM
N° Campioni	65	65	65	45
Mediana	94,00	97,00	77,00	67,00
Min	79,00	62,00	43,00	35,00
Max	106,00	118,00	107,0	119,00
Media	93,29	95,11	75,73	69,13
Dev.st	6,52	10,59	14,82	21,65
Cv	6,99	11,13	19,57	31,31
% dei casi che rientrano nei criteri	65/65 (100%)	65/65 (100%)	64/65 (98%)	39/45 (87%)



Conclusioni

A distanza di 15 anni dalla crioconservazione, i prodotti conservano ancora una vitalità e un recupero cellulare nei limiti di accettabilità stabiliti. Il protocollo di crioconservazione adottato

- minimizza i danni subiti dalle CSE nella fase di crioconservazione e decongelamento
- mantiene vitalità e potency delle CSE nel tempo, criteri indispensabili per l'impiego trapiantologico