



# **CRIOCONSERVAZIONE DI CELLULE STAMINALI**

**Dott. Gianluca Ubezio**

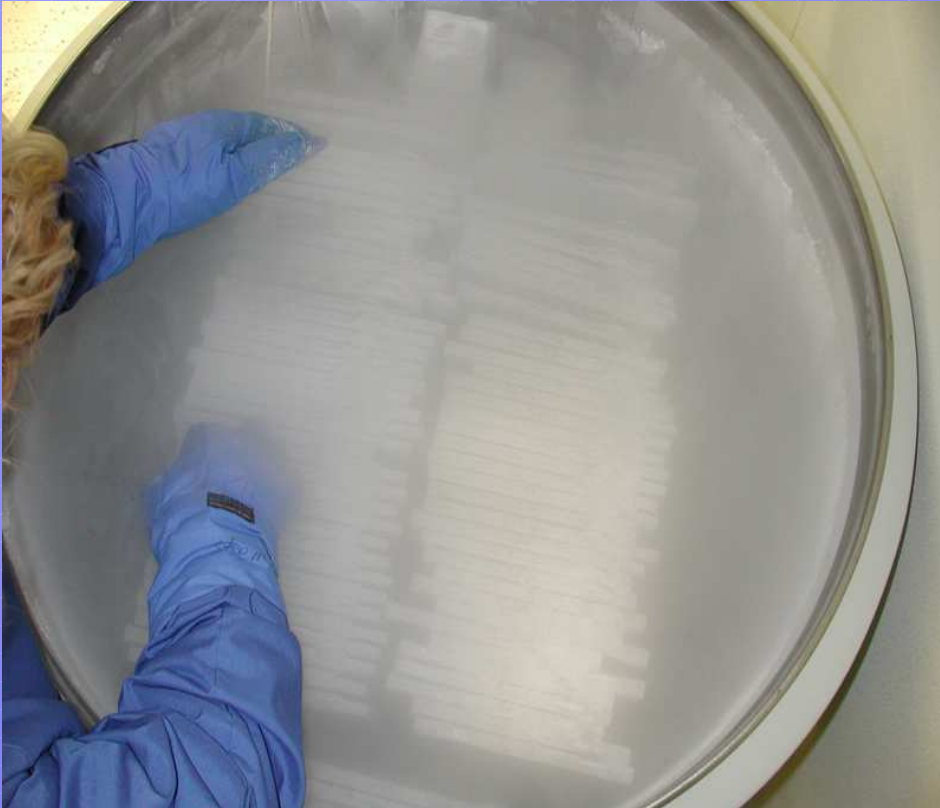
gianlucaubezio@libero.it

**Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale  
A.O.U. San Martino di Genova**

---

**Il trapianto di midollo osseo: la raccolta delle staminali periferiche e cordonali,  
la crioconservazione**  
14 Novembre 2007

# LA QUALITA' IN CRIOPRESERVAZIONE



1. Raccolta;
2. trasporto;
3. manipolazione;
4. criopreservazione;
5. mantenimento;
6. data recording;
7. assegnazione;
8. trasporto al centro trapianti;
9. scongelamento;
10. (lavaggio);
11. raccolta e gestione dei dati di follow up

<b>Code: CBB12 CORD</b>					
HLA Typing:					
Techniques:					
Ethnicity:		Date of Birth:		ABO Rh group:	
Gender:		CPD at collection: 28 ml		Hemoglobin screening:	
Data pre-storage (TOTAL VOLUME CRYOPRESERVATION)					
Total nucleated cells ( $\times 10^6$ ):			Total lymphocytes ( $\times 10^6$ ):		
Nucleated red blood cells:			Total CD34 + cells per bag:		
Total CFU-GM ( $\times 10^3$ ):			Total CFU ( $\times 10^3$ ):		
Viability:					
Bacterial Culture		Aerobic Bacteria		Anaerobic Bacteria	
<i>Maternal Viral Serology</i>		<i>At delivery</i>		<i>Maternal Viral Serology</i>	
				<i>At delivery</i> <i>After 6 months</i>	
HbsAg (ELISA)				Anti-HTLV-I/II (ELISA)	
Anti-HCV (ELISA)				ALT (U/L) ref.val. 2-40	
Anti-HIV 1/2 (ELISA)				Anti-HBc (total)	
Anti-TPHA/VDRL				HCV/HIV1-2 RNA	
Anti-CMV (IgG)					
Anti-CMV (IgM)					
Anti-Toxoplasma (IgG)					
Anti-Toxoplasma (IgM)					
Collection date:		Freezing date :		Number of bags:	
Volume Cryopreserved:					
Cryopreservation solution: 10% DMSO					
Storage temperature < -150°C				Expiration date: none	



# CRIOBIOLOGIA

Branca della biologia che studia l'effetto delle basse temperature su organismi viventi.

L'obiettivo è quello di preservare la vitalità degli elementi cellulari nel passaggio di stato dell'H<sub>2</sub>O, da liquido a solido.

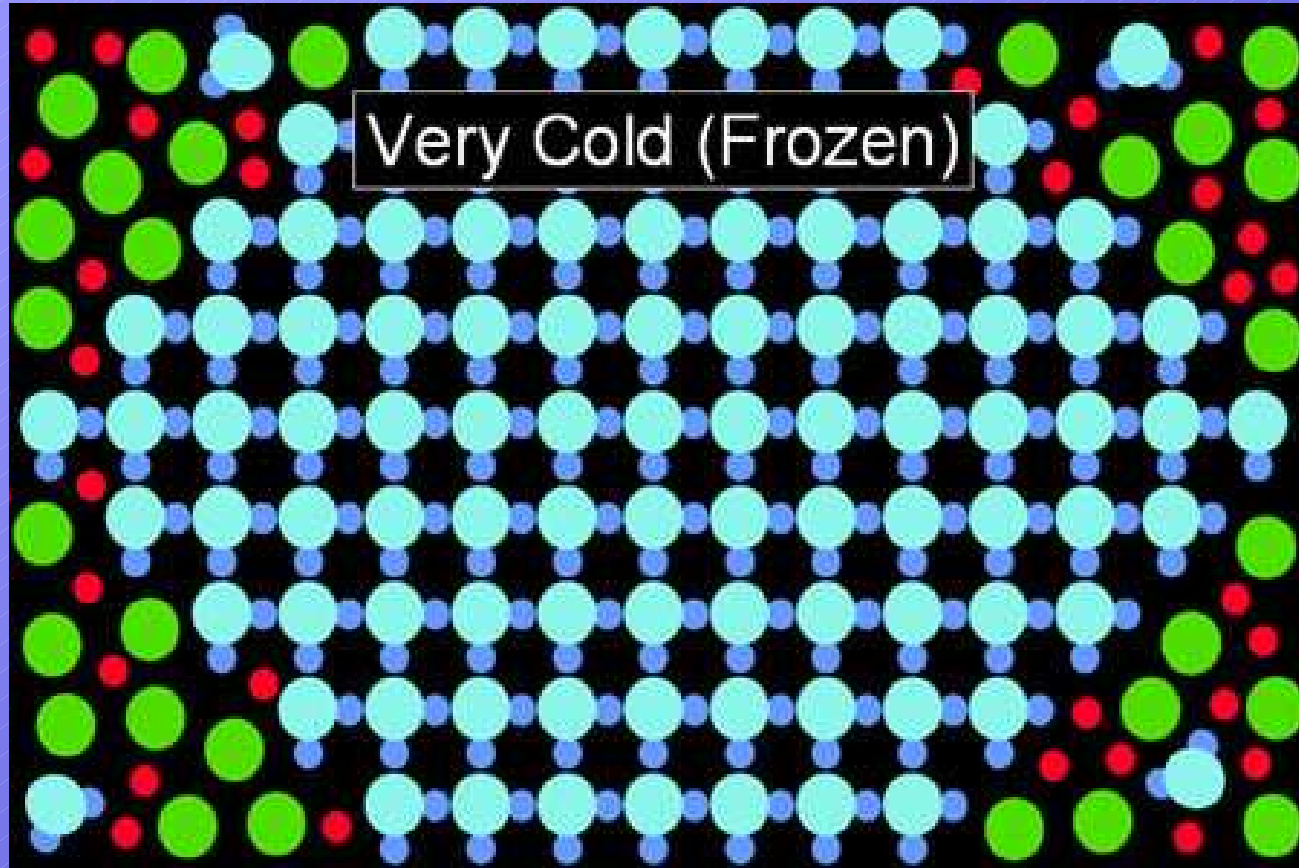
Il processo di criopreservazione può sia CONSERVARE, che DISTRUGGERE le cellule.

**1683** | *New Experiments and Observations Touching Cold*  
Sir Robert Boyle

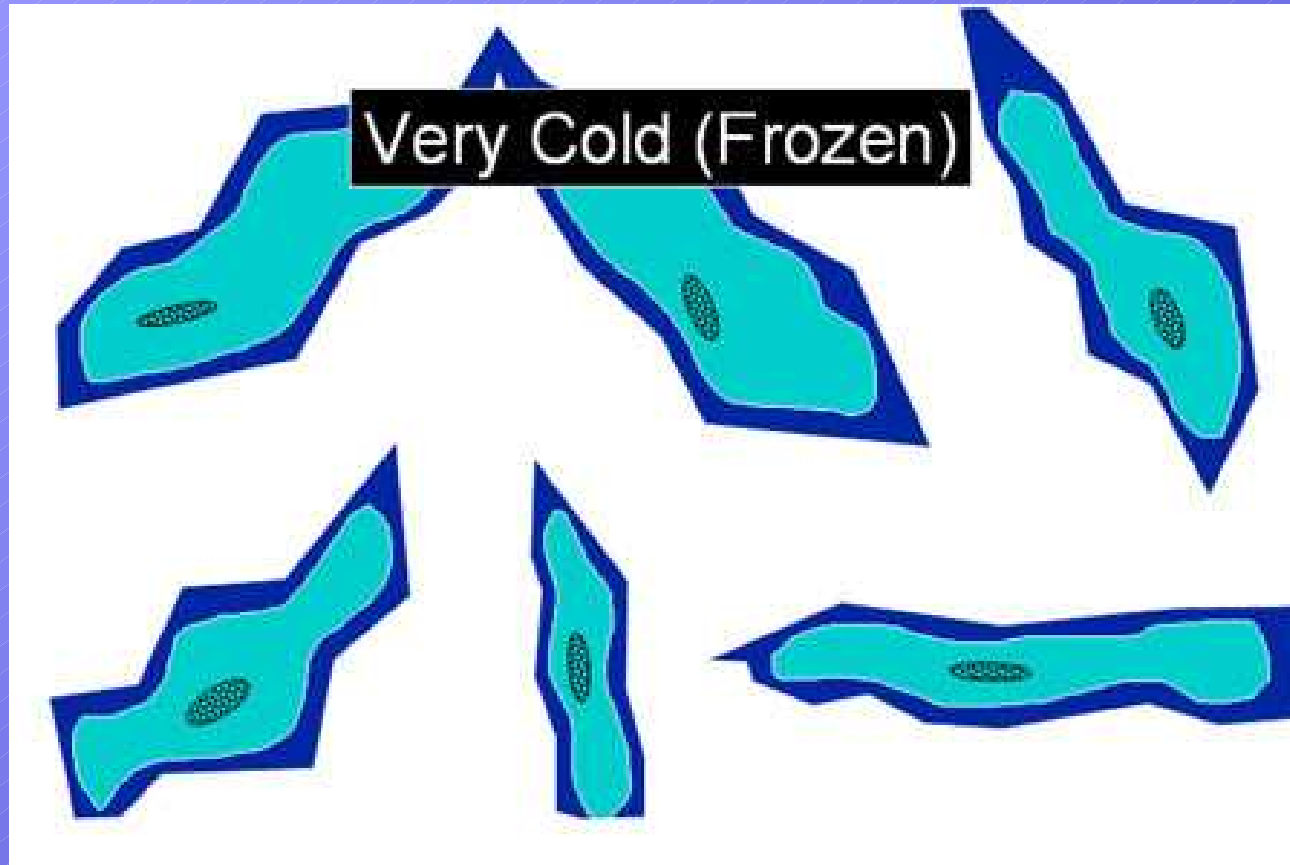
**1940s** | Effetto crioprotettore del glicerolo (Chris Polge – University of Cambridge)

**1963** | Inizio dello studio sistematico di protocolli di criopreservazione cellulare  
(Peter Mazur – University of Minnesota)

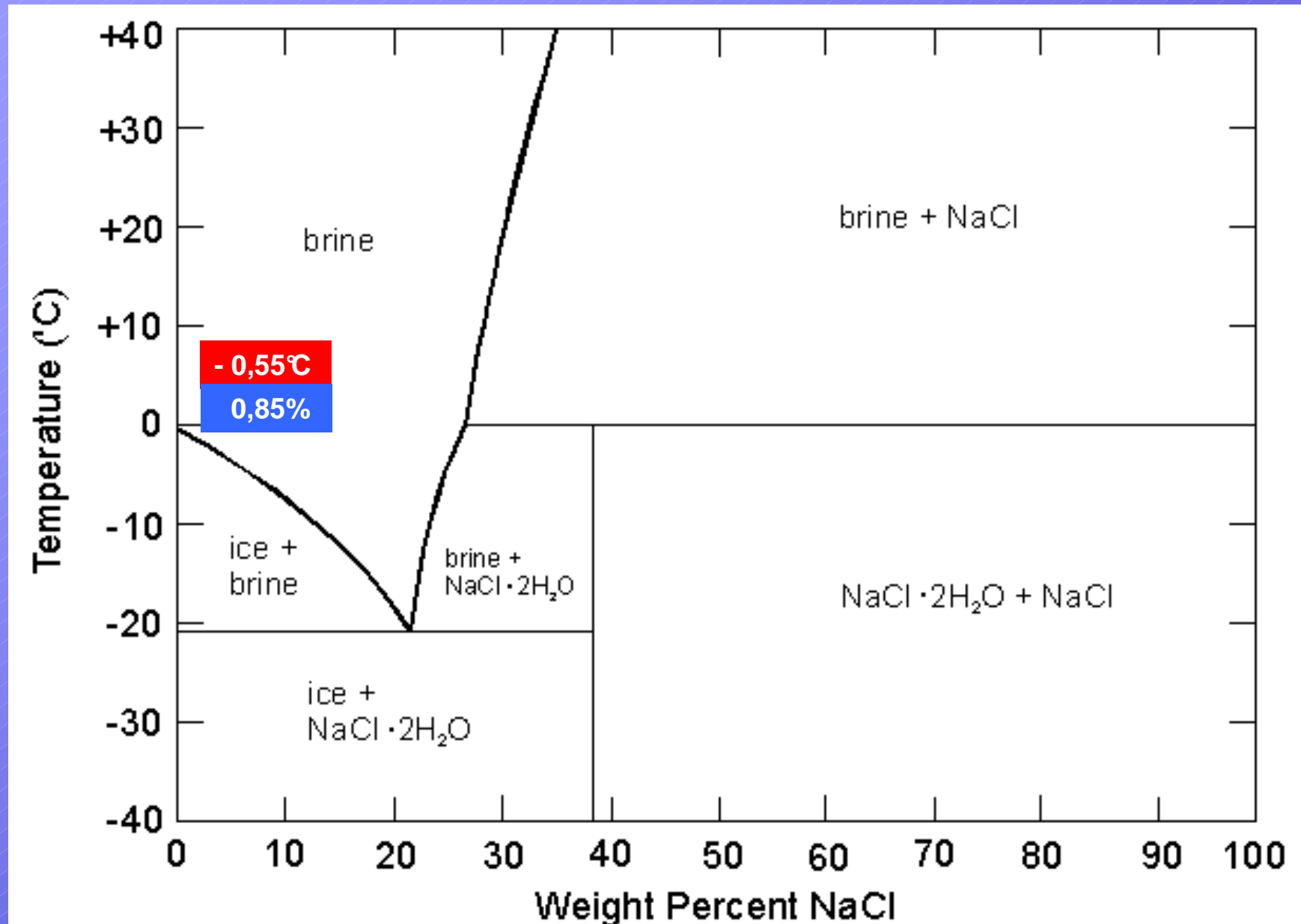
What's happen?



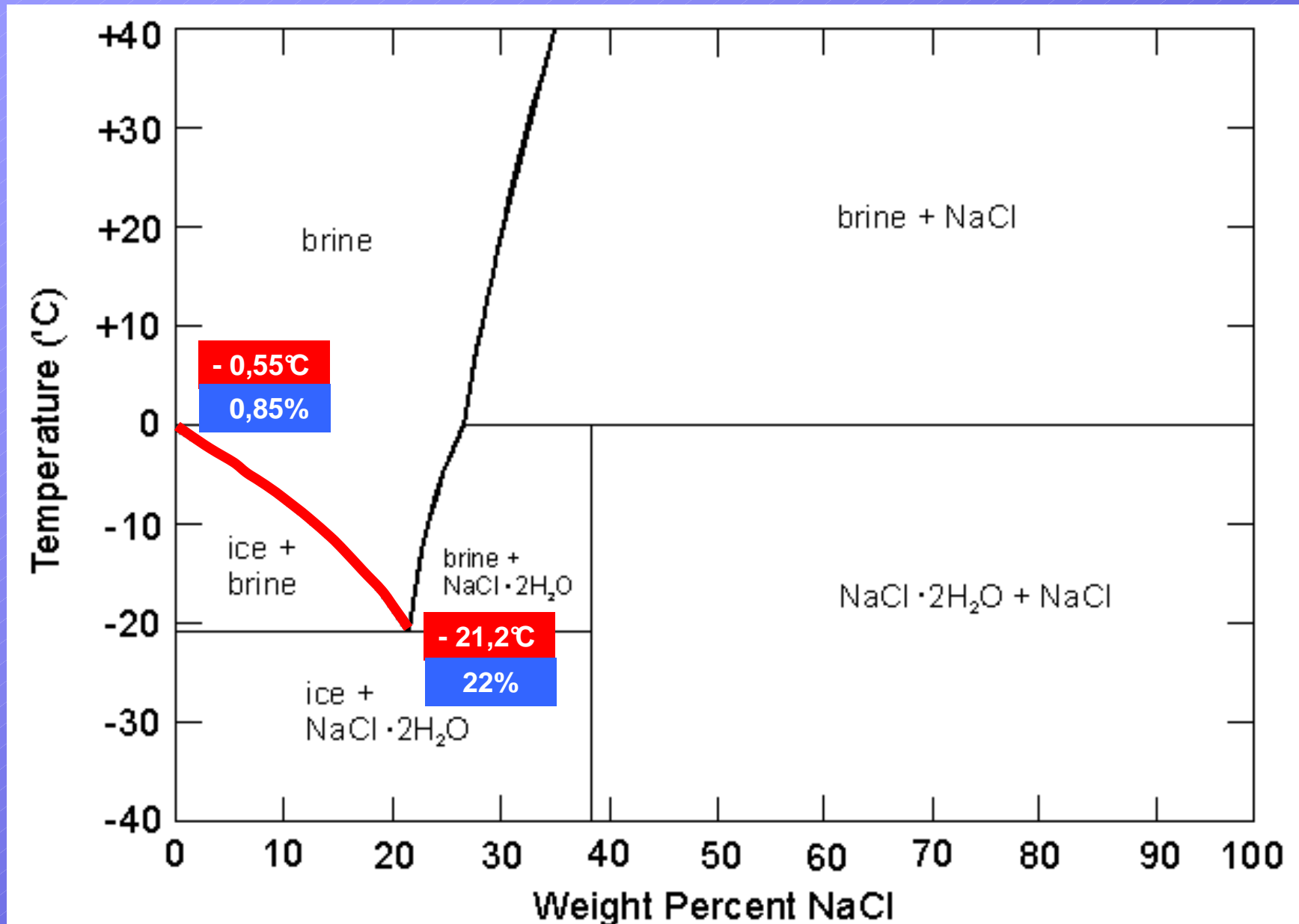
What's happen?



# SISTEMA BINARIO: H<sub>2</sub>O + NaCl



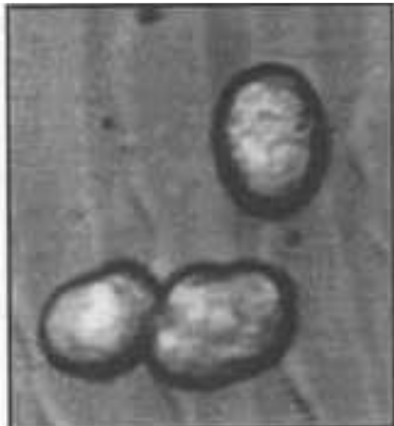
# SISTEMA BINARIO: H<sub>2</sub>O + NaCl



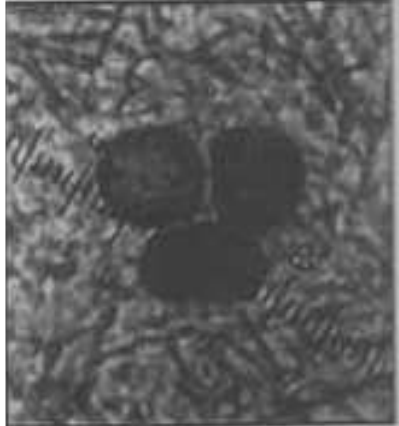


**Freezing slope: 10°C/min.**

Extracellular ice in injury (“Solution injury”)  
Cellular shrinking as a marker of cryoinjury



**Freezing slope: 100°C/min.**



**Freezing slope: 400°C/min.**

Intracellular ice injury \_\_\_ light scattering

**-1°C**

**-40°C**

## La velocità di raffreddamento è troppo bassa

1. La cellula è esposta a [ ] crescenti di soluti cellulari dovute alla formazione di ghiaccio nel mezzo di soluzione (SOLUTION INJURY)

ALTA [ ] SOLUTI  
EXTRACELLULARE

VARIAZIONI DI pH

DISIDRATAZIONE  
CITOPLASMATICA

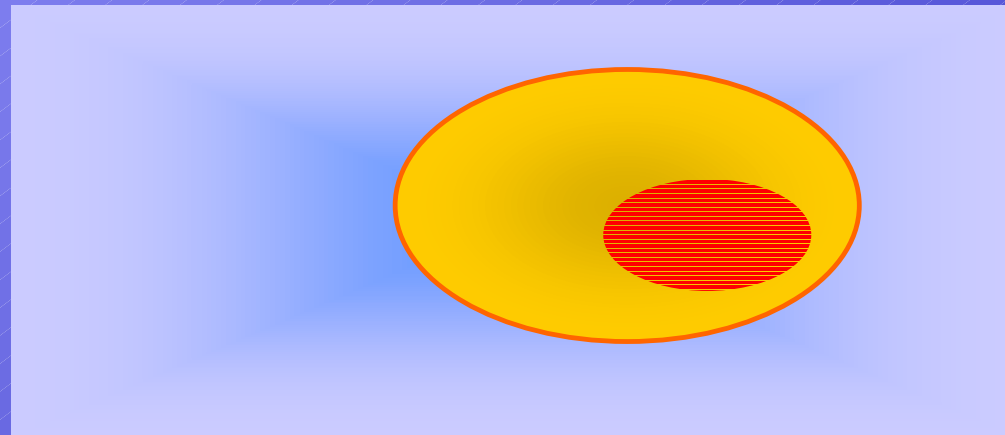
ALTERAZIONE IRREVERSIBILE  
DELLE MOLECOLE IDRATE  
INTRACELLULARI

La velocità di raffreddamento è troppo bassa

2. GAP TERMICO INTRA - EXTRACELLULARE



FORMAZIONE DI GHIACCIO  
EXTRACELLULARE



## La velocità di raffreddamento è troppo alta

Si ha la formazione di nuclei di cristallizzazione soprattutto all'interno della cellula (NUCLEAZIONE DELL'ACQUA)



DANNO MECCANICO



CRISTALLI  
INTRACELLULARI

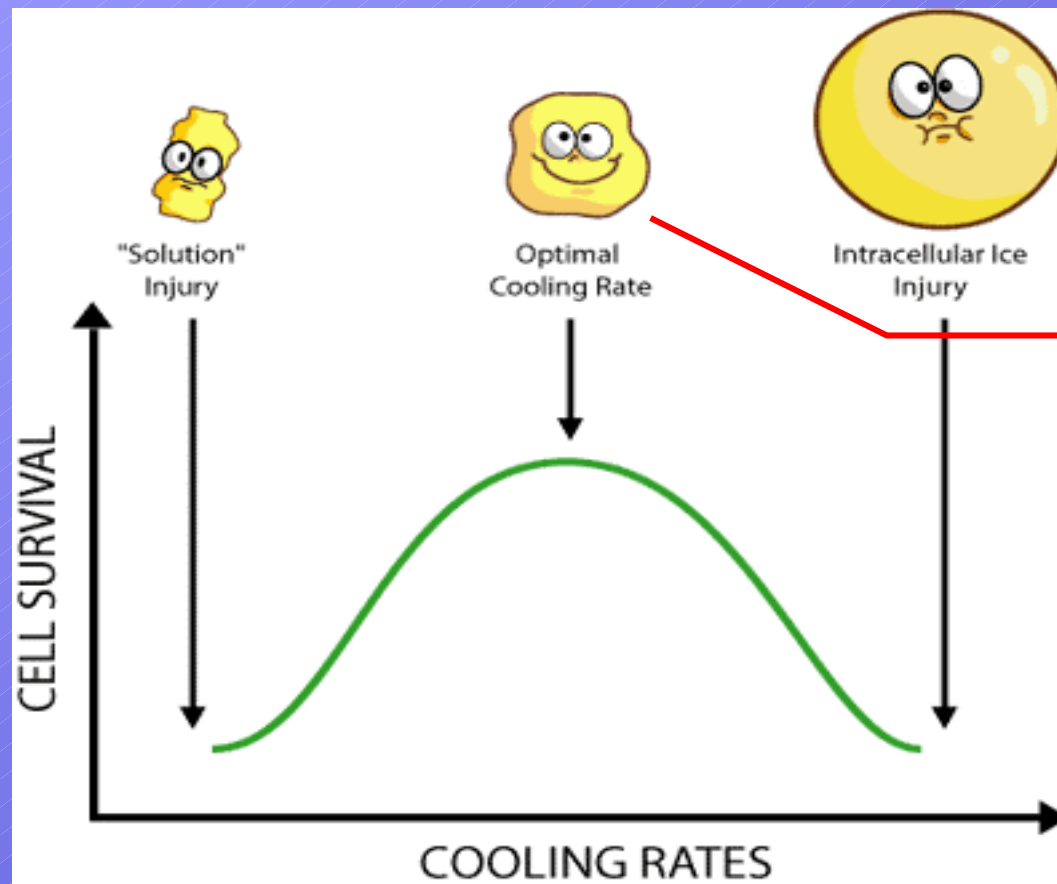
CRISTALLI  
EXTRACELLULARI



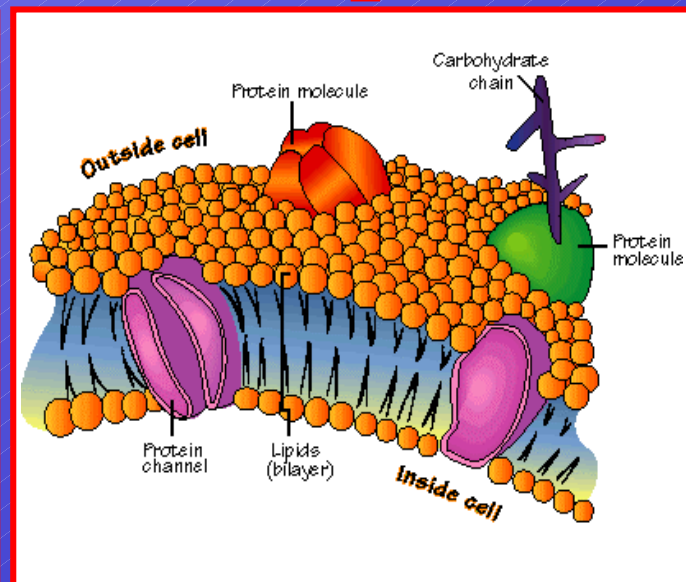
DISTRUZIONE DELLA MEMBRANA CELLULARE

## ESISTE LA VELOCITA' IDEALE?

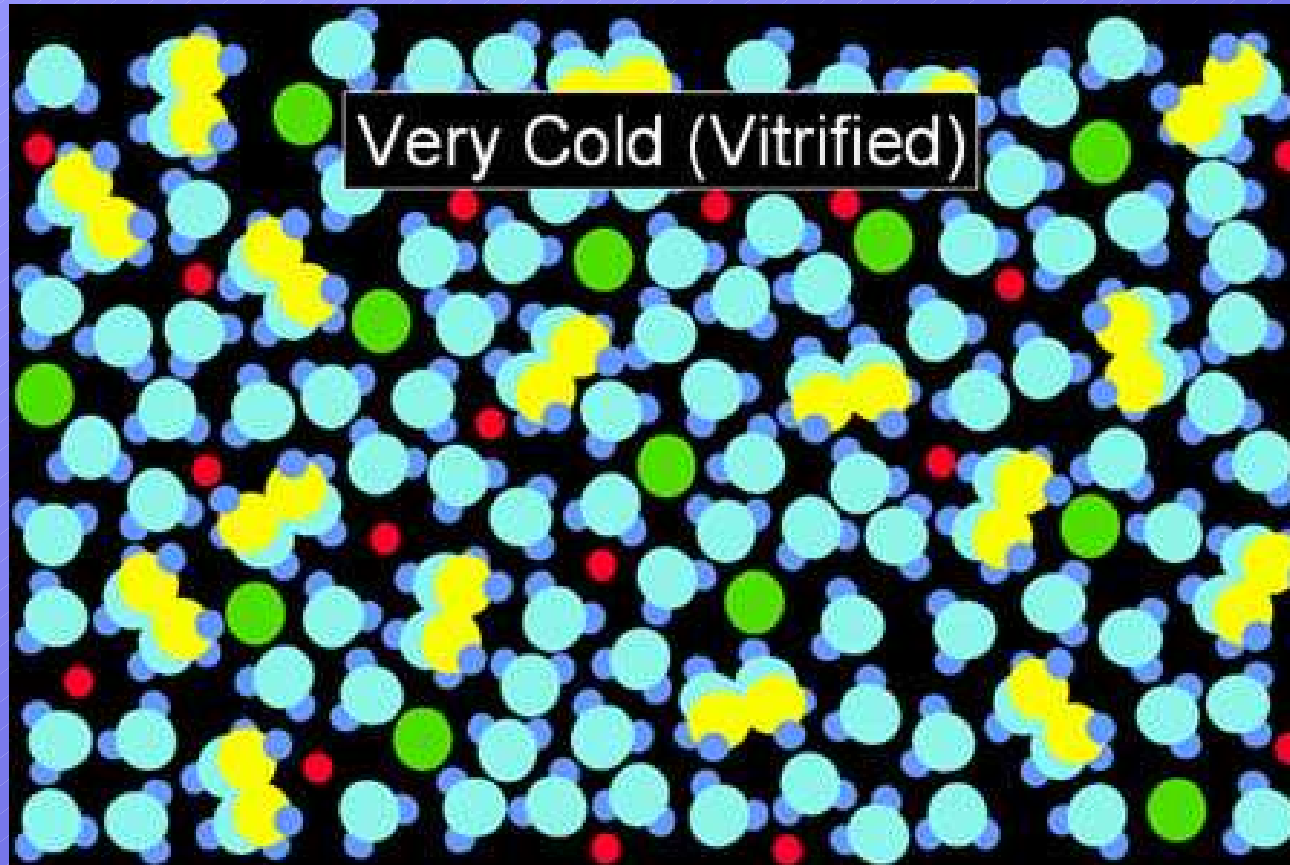
- Il raffreddamento deve essere **lento** in modo tale da evitare la formazione di ghiaccio!
- Il raffreddamento deve essere nello stesso tempo **rapido** in modo tale da non danneggiare la cellula per disidratazione: l'aumento della viscosità ostacola la diffusione extracellulare di acqua.



La velocità di congelamento ideale non è universale, ma dipende dal tipo cellulare

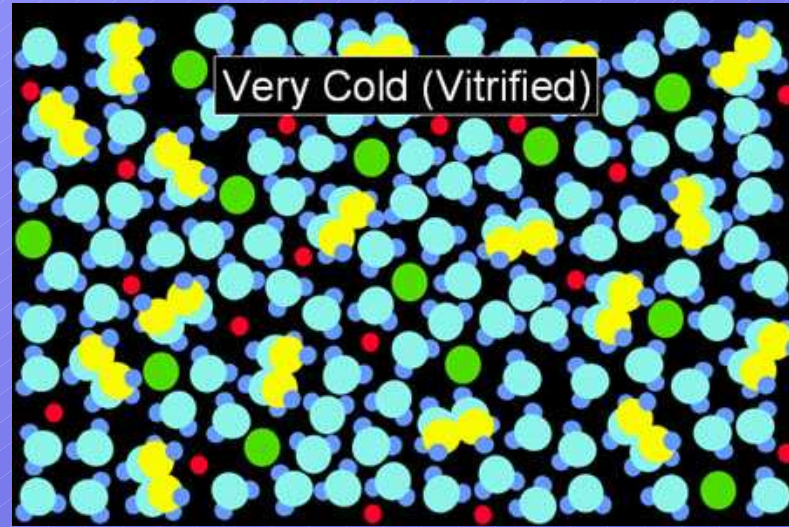
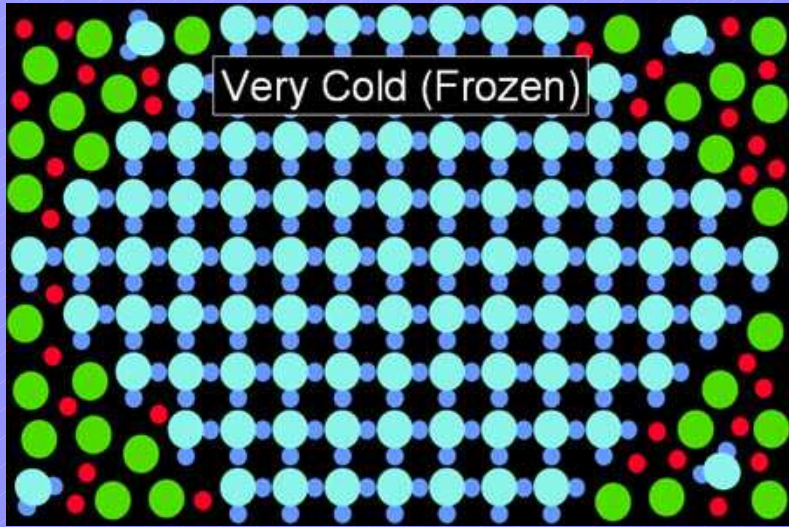


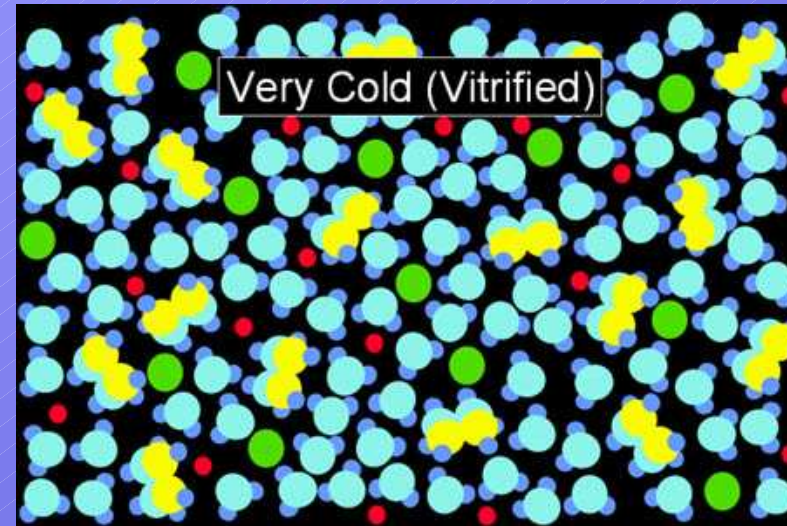
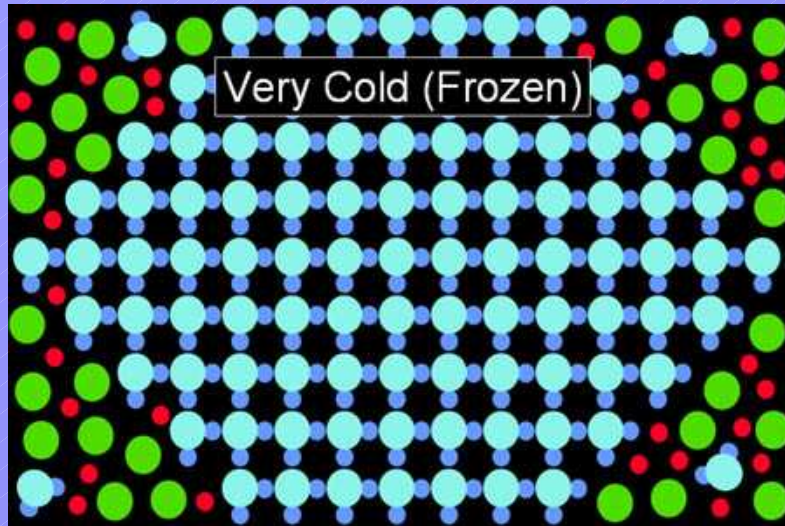
# Crioprotettori



# Crioprotettori







## Crioprotettori

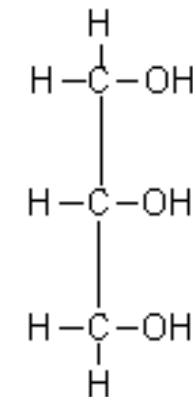
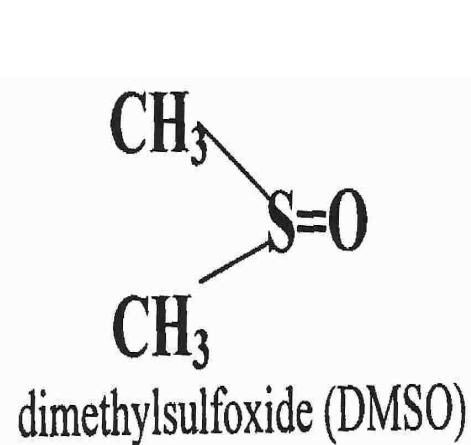
**Obiettivo generale:** ridurre i danni indotti da disidratazione e cristallizzazione dell'acqua.

### C. penetranti

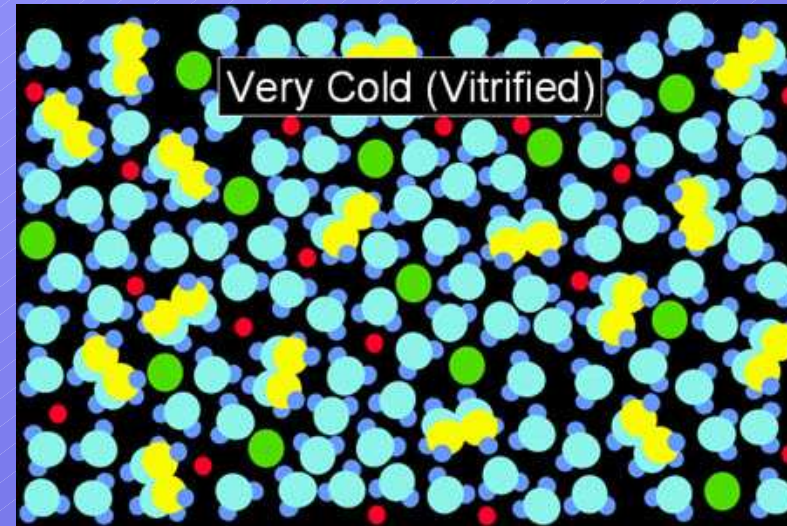
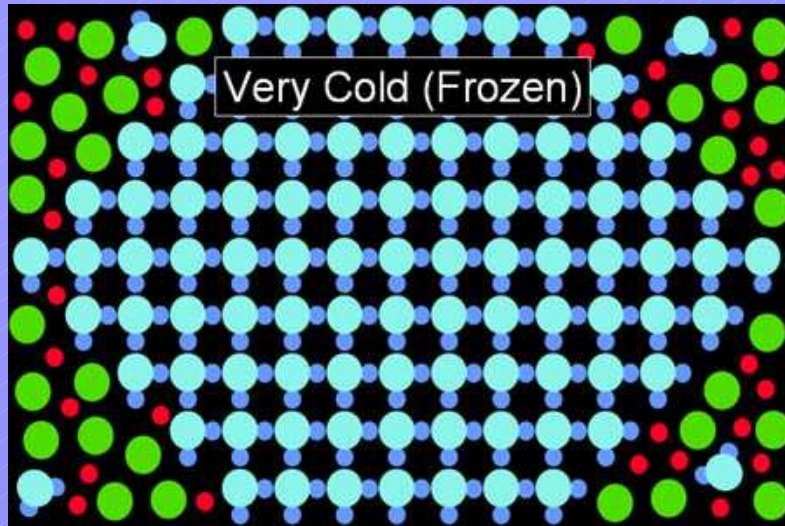
azione colligativa. Agiscono sia all'interno che all'esterno della cellula, ad alte concentrazioni.

Ritardano il passaggio di stato liquido-solido per un punto di congelamento molto più basso rispetto all'acqua.

Diluendo i soluti, riducono la solution injury.



Glycerol



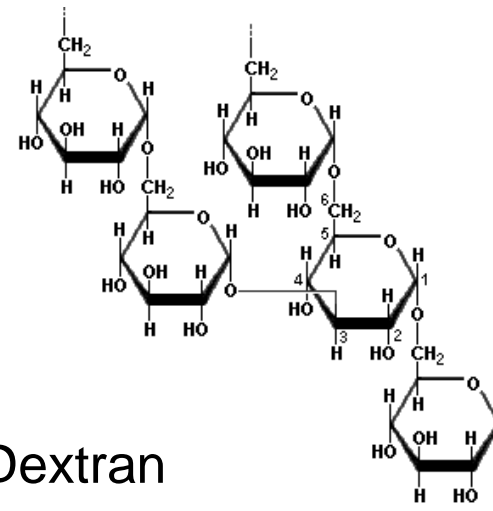
## Crioprotettori

**Obiettivo generale:** ridurre i danni indotti da disidratazione e cristallizzazione dell'acqua.

### C. non penetranti

agiscono all'esterno della cellula o comunque non hanno azione colligativa.

Sono più efficaci nelle discese rapide di temperatura, perché richiamano acqua dal citosol all'extracellula e ne favoriscono la fuoriuscita, modificando la permeabilità membranaria.



**transplant**

washing

thawing



cryopreservation

processing

harvesting



# COMITATO NAZIONALE PER LA BIOSICUREZZA E LE BIOTECNOLOGIE

## **MANIPOLAZIONE MINIMA**

... tutte quelle manipolazioni che non portano ad una attivazione delle cellule e/o ad una stimolazione della proliferazione cellulare. In particolare sono considerate “manipolazione minima”: il taglio, la modificazione della forma, la criopreservazione, la sterilizzazione mediante radiazioni gamma, la centrifugazione ed il trattamento con antibiotici di un tessuto. Analogamente sono considerate “manipolazioni minime” la estrazione o la separazione di cellule da un tessuto, quando questo non alteri le caratteristiche principali delle cellule e del tessuto rimanente dal quale le cellule sono state estratte o separate.

## **MANIPOLAZIONE ESTENSIVA**

... tutte quelle manipolazioni che possono portare ad una attivazione delle cellule e/o ad una stimolazione della proliferazione cellulare.

Vengono considerate “estensivamente manipolate” anche le cellule che, pur non essendo state specificamente attivate o stimolate a proliferare, risultano associate con biomateriali, sia che si tratti di biomateriali sintetici, sia che si tratti di biomateriali di origine estrattiva. Vengono considerate “estensivamente manipolate” tutte le cellule che hanno subito una manipolazione del loro patrimonio genetico.

*Gruppo di lavoro per la sicurezza e la qualità della sperimentazione in terapia cellulare e per l'impiego dei  
“Prodotti dell'ingegneria dei tessuti” a scopo terapeutico ovvero a scopo di trapianto su pazienti*

Ubezio G, Genova 14<sup>th</sup> November 2007

## Standard di funzionamento IBMDR (Aprile 2007)

### 9. CARATTERISTICHE E NORME PER LE BANCHE DI SANGUE CORDONALE

- 9.1 Le BSC che possono fornire CSE da sangue placentare a scopo trapianto da donatore non consanguineo, operano in conformità all'Accordo tra il Ministro della salute, le regioni e le province autonome di Trento e Bolzano (Repertorio Atti della Presidenza del Consiglio dei Ministri n. 1770 del 10 luglio 2003), ai protocolli di cui all'art. 3, comma 4, della legge 219/2005 e alle **azioni di coordinamento e di controllo tecnico scientifico del Centro Nazionale Sangue** come previsto dall'art. 12, comma 4 della legge 219/05, fatte salve le necessarie integrazioni funzionali con il Centro Nazionale Trapianti.
- 9.2 Le BSC debbono operare in conformità agli standard **IBMDR, FACT/Netcord, WMDA.**

9.5 La BSC ha il compito e la responsabilità di:

...

9.5.4 essere in grado di organizzare la spedizione di un campione di **DNA** (ove disponibile) dall'unità selezionata, su specifica richiesta del Centro Trapianti richiedente;

9.5.5 essere in grado di organizzare la spedizione di un campione **siero materno** (ove disponibile) dall'unità selezionata, su specifica richiesta del Centro Trapianti richiedente;

9.5.6 organizzare e coordinare, insieme con il corriere identificato per il trasporto, la preparazione, il confezionamento e la spedizione dell'**unità** al Centro Trapianti richiedente.

# INTERNATIONAL STANDARDS

---

## Standards for Haematopoietic Progenitor Cell Collection, Processing & Transplantation

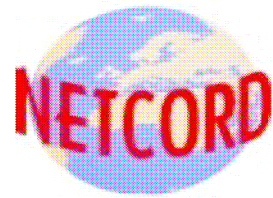
---

The Joint Accreditation Committee of ISCT-EBMT

---

## INTERNATIONAL STANDARDS FOR CORD BLOOD COLLECTION, PROCESSING, TESTING, BANKING, SELECTION AND RELEASE

---



## A14. Facilities & Safety

Devono essere garantiti sistemi che assicurino sicurezza ed adeguatezza ambientale:

1. adeguato spazio e dislocazione, al fine di garantire sicurezza delle procedure, prevenire contaminazioni e permettere una manipolazione ordinata.
2. temperatura, umidità, ventilazione, filtrazione dell'aria e classificazione ambientale devono essere DEFINITE, e, quando appropriato, monitorate.
3. devono essere definiti spazi separati per la processazione e lo storage dei prodotti, per evitare mix-up, contaminazioni e cross-contaminazioni.
4. limitazione d'accesso al solo personale autorizzato.
5. gli ambienti della CBB sono mantenuti puliti e ordinati, al fine di impedire l'introduzione, la trasmissione o la diffusione di malattie trasmissibili. Devono essere ambienti che facilitino le operazioni di pulizia.
6. vanno contemplate procedure specifiche per la sicurezza da chimici, biologici e radioattivi, comprese procedure per lavaggio delle mani, rischio incendio, allergia al lattice, gestione dell'azoto liquido, black-out elettrico



## Direttiva 2006/86/CE del 24 Ottobre 2006

2. Quando tali attività comprendono la lavorazione di tessuti e cellule a contatto con l'ambiente, essa deve svolgersi in un ambiente di specifica qualità e pulizia dell'aria al fine di minimizzare i rischi di contaminazione, compresa la contaminazione incrociata tra donazioni. L'efficacia di questi provvedimenti dev'essere convalidata e controllata.

3. Fatte salve diverse disposizioni di cui al punto 4, se i tessuti o le cellule vengono a contatto con l'ambiente durante la lavorazione senza essere poi sottoposti a un procedimento di inattivazione microbica, occorre una qualità dell'aria con numeri di particelle e numeri di colonie microbiche equivalenti a quelli di **grado A** di cui alla Guida europea alle buone pratiche di fabbricazione (Good Manufacturing Practice: GMP), allegato 1 e alla direttiva 2003/94/CE, con un ambiente di fondo adeguato alla lavorazione dei tessuti/cellule interessati, ma almeno equivalente a GMP di **grado D** in termini di numeri di particelle e di colonie microbiche.

ERROR: ioerror  
OFFENDING COMMAND: image  
STACK: