

7[^]

Conferenza Nazionale dei Servizi Trasfusionali

Vicenza | 24-26 maggio 2023



Studio di validazione per la produzione ad uso clinico di emocomponenti da sangue di cordone ombelicale: frazionamento, caratterizzazione, analisi delle proprietà reologiche

Dr.ssa Larysa Mykhailova

*SC Medicina Trasfusionale – Fondazione IRCCS Ca' Granda Policlinico di
Milano*

La sottoscritta, in qualità di Presentatrice
dichiara che

nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, NON È in alcun modo portatrice di interessi commerciali propri o di terzi; e che gli eventuali rapporti avuti negli ultimi due anni con soggetti portatori di interessi commerciali non sono tali da permettere a tali soggetti di influenzare le sue funzioni al fine di trarne vantaggio.

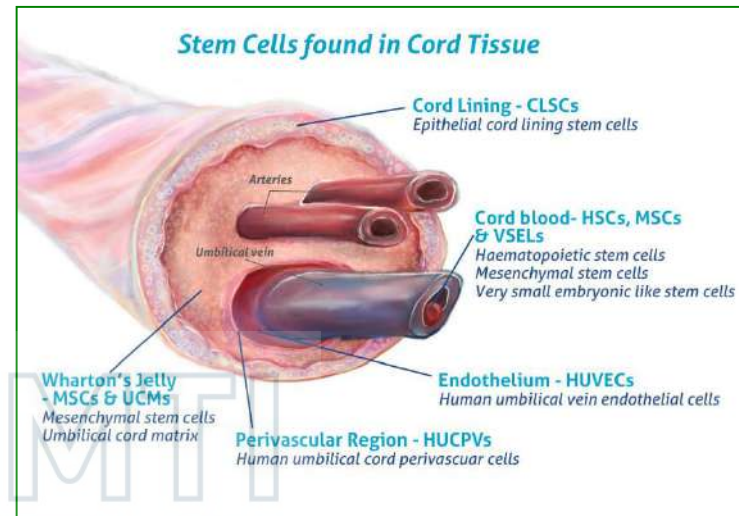
IL SANGUE CORDONALE

➤ Cos'è il sangue cordonale (CB)?

Sangue del neonato che rimane nella placenta e nel cordone al momento del parto. Esso rappresenta una sorgente di cellule staminali emopoietiche (CSE).

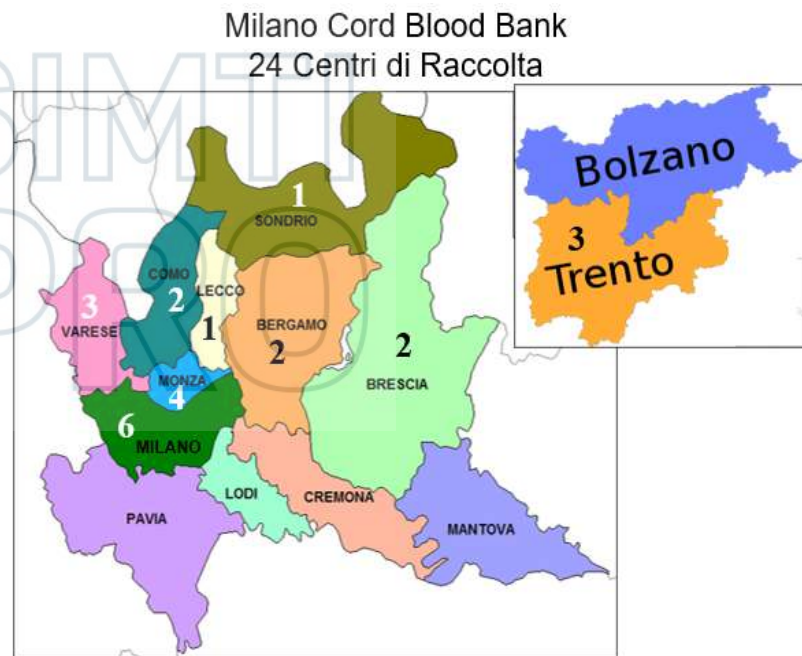
➤ CSE ottenute dal sangue cordonale sono particolarmente interessanti per:

- La disponibilità 'illimitata';
- L'assenza di rischi per il donatore;
- Il fenotipo immunologico naive (più facile compatibilità);
- L'elevata potenzialità replicativa (successo del trapianto a lungo termine);
- Bassa probabilità di contaminazione con virus e microorganismi.



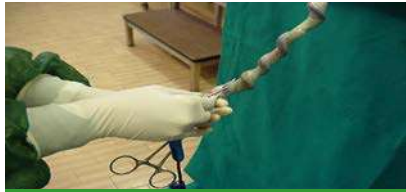
IL SANGUE CORDONALE

- **Milano Cord Blood Bank (MICB):** Banca del Sangue da Cordone Ombelicale della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore, Policlinico di Milano (Regione Lombardia).
- Febbraio 1993: prima raccolta non dedicata (unrelated)
- Settembre 1993: prima raccolta dedicata
- 31 dicembre 2022:
 - ✓ raccolte 43,565 unità di sangue cordonale unrelated + 702 dedicate
 - ✓ 10,766 unità di sangue cordonale unrelated + 672 dedicate criopreservate e disponibili per uso clinico
 - ✓ 591 unità consegnate per trapianto in tutto il mondo



Milano Cord Blood Bank 2022

IL SANGUE CORDONALE



RACCOLTA DEL SANGUE
PLACENTARE



UNITA' DI SANGUE
PLACENTARE



PROCESSAZIONE



AREA CRIOBIOLOGICA

Criteri di accettazione

- Assenza di criteri di esclusione
- Consenso informato firmato
- Questionario anamnestico
- Raccolta entro le 48 ore
- Volume > 60 mL
- TNC > $1,500 \times 10^6$
- Meno del 10% delle unità donate vengono bancate ed utilizzate a scopo di trapianto emopoietico.

SCOPO 1/2

➤ **Standardizzazione del frazionamento di unità di CB intero al fine di ottenere:**

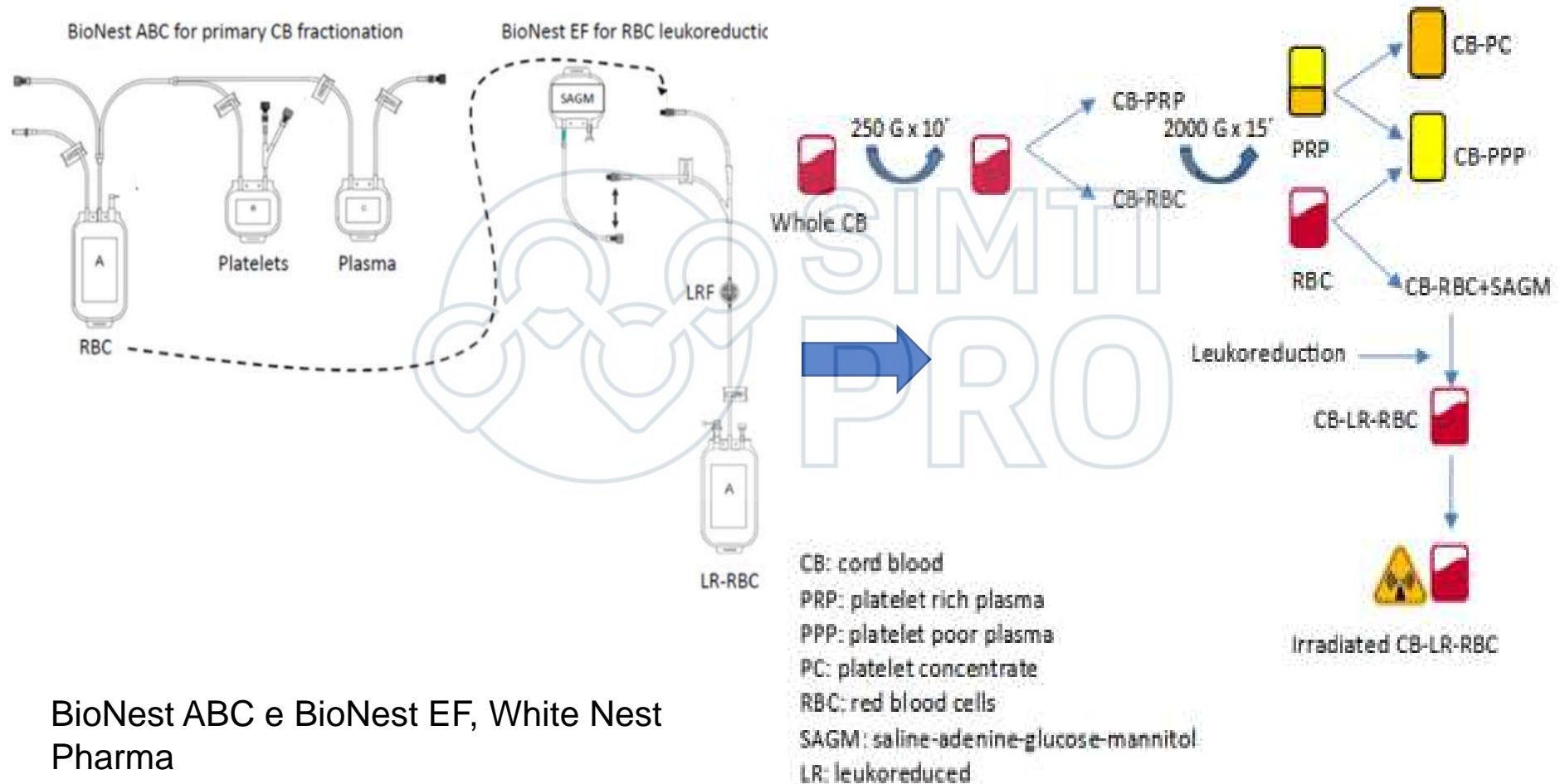
- Concentrato piastrinico (CB-PC);
- Plasma povero di piastrine (CB-PPP);
- Globuli rossi leucoridotti (CB-LR-RBC).

Tre componenti del CB con grandi prospettive di applicazione terapeutica.



FRAZIONAMENTO

SCOPO 1/2



BioNest ABC e BioNest EF, White Nest Pharma

TEST DI CONTROLLO QUALITÀ

SCOPO 1/2

- Sono state valutate un numero totale di 10 unità
- Il **concentrato piastrinico** (CB-PC) è stato valutato al giorno 0 di conservazione (volume e concentrato piastrinico).
- Il **plasma povero di piastrine** (CB-PPP) è stato utilizzato per eseguire i test di sterilità.
- I **globuli rossi leucoridotti** (CB-LR-RBC) sono stati valutati ai giorni 0, 7, 14 e 15, con irradiazione al giorno 14.

QC	PARAMETRI	SPECIFICHE
CB-PC	Volume Piastrine	>5 mL $1 \times 10^6 /L \pm 20\%$
CB-PPP	Sterilità	Negativo
CB-LR-RBC	Volume Ematocrito Leucociti residui Emolisi pH K ⁺	>20 mL 55-65 % < $0.1 \times 10^6/mL$ <0.8% 6-8 /

SCOPO 2/2

➤ Caratterizzazione del CB intero dal punto di vista:

- REOLOGICO: mediante analisi ectacitometrica
- METABOLICO: mediante dosaggio dell'ATP
- MORFOLOGICO: mediante visualizzazione al microscopio ottico

In collaborazione con il laboratorio di S.C. Ematologia - S.S. Fisiopatologia delle anemie presso la Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.

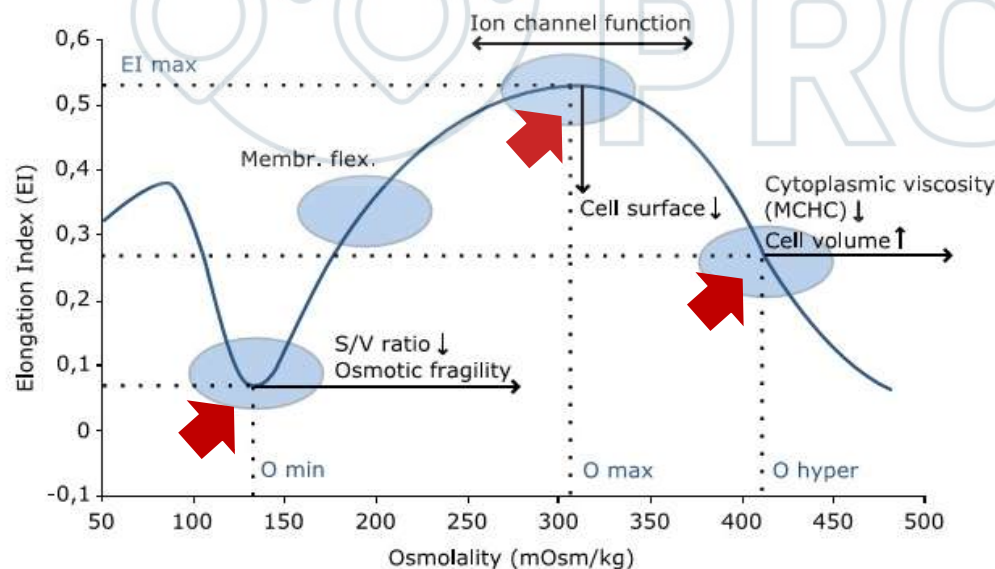


ANALISI REOLOGICA DEL CB INTERO

SCOPO 2/2

➤ ECTACITOMETRO

Viscosimetro a diffrazione laser, che misura la deformabilità dei globuli rossi sottoposti ad uno shear stress ed analizzati in una soluzione viscosa ad osmolarità crescente.

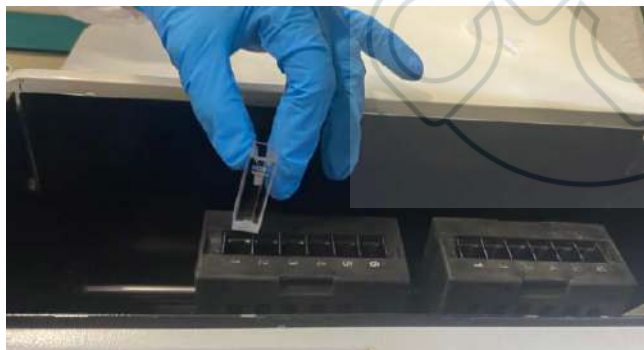


ANALISI METABOLICA E MORFOLOGICA DEL CB INTERO

SCOPO 2/2

➤ DOSAGGIO ATP

Da un estratto di sangue intero di CB si esegue un test di fluorescenza spettrofotometrico.



➤ ANALISI MORFOLOGICA

Preparazione di strisci di CB su vetrino e visualizzazione al microscopio ottico.



→ Tutte le analisi sono state eseguite al giorno zero e al giorno 10 di conservazione, prima e dopo irraggiamento (3000 RAD).

RISULTATI 1/2

SPECIFICHE E % DI COMPLIANCE DEI COMPONENTI DI SANGUE CORDONALE POST FRAZIONAMENTO

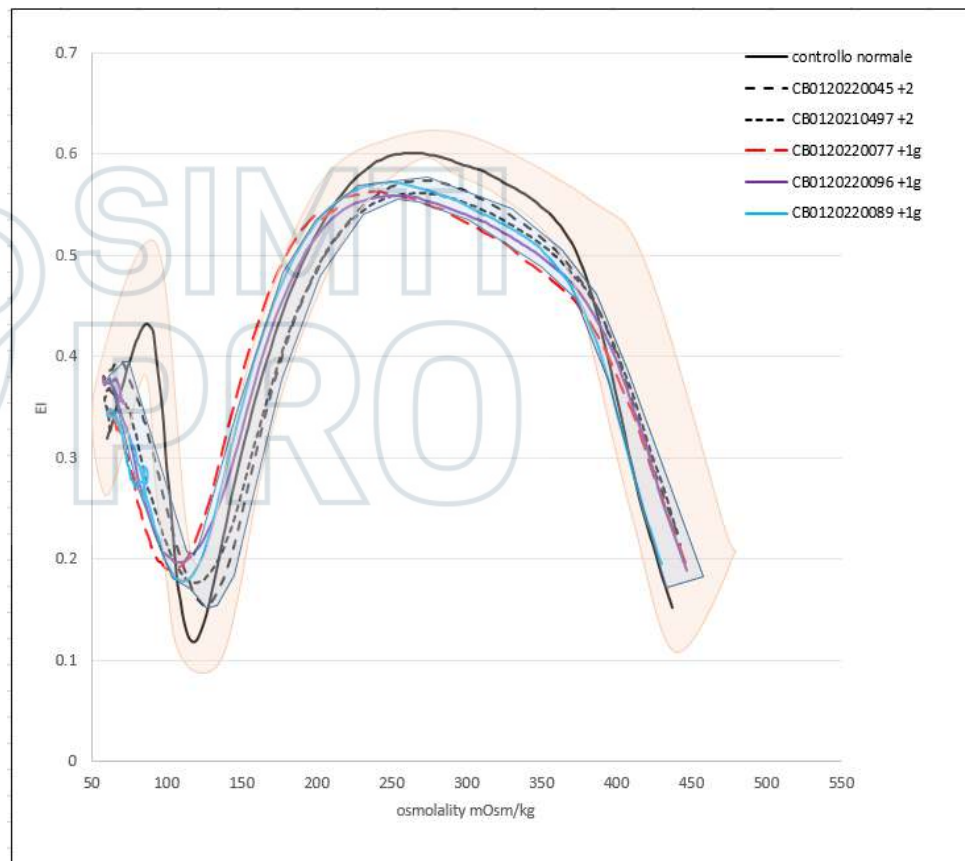
- Conteggio piastrinico **CB-PC**: $925 \pm 224 \times 10^9/L$ (Media \pm SD).
- Volume **CB-LR-RBC**: >20 mL.
- Le unità di **CB-LR-RBC** conformi alla soglia standard di emolisi ($<0,8\%$) diminuiscono progressivamente dal 100% al giorno 0 al 40% al giorno 15.
- Il rilascio di K^+ nei **CB-LR-RBC**, aumenta in media da 2,69 a 28,24 mmol/L dal giorno 0 al giorno 15.

COMPONENTE CB	PARAMETRI	N	MEDIA \pm SD	SPECIFICHE	% COMPLIANCE
CB-PC	Volume (mL)	10	8.37 ± 4.1	> 5	80
	Piastrine ($\times 10^6 /L$)	10	925 ± 224	$1 \pm 20\%$	70
CB-PPP	Volume (mL)	10	39.91 ± 8.9	/	/
CB-LR-RBC	Volume (mL)	10	45.18 ± 8	> 20	100
	Ematocrito (%)	10	52.94 ± 5.9	55-65	50
	Emolisi giorno 0	10	0 ± 0	<0.8	100
	Emolisi giorno 14 (%)	10	0.69 ± 0.34	<0.8	50
	Emolisi giorno 14 IRR (%)	10	0.88 ± 0.52	<0.8	40
	Emolisi giorno 15 (%)	10	1.10 ± 0.63	<0.8	40
	K + giorno 0 (mmol/L)	10	2.7 ± 0.65	/	/
	K + giorno 14 (mmol/L)	10	22.7 ± 6.0	/	/
	K + giorno 14 IRR (mmol/L)	10	22.3 ± 5.5	/	/
	K + giorno 15 (mmol/L)	10	28.2 ± 10.4	/	/

RISULTATI 2/2

VALUTAZIONI INIZIALI DEL CB INTERO MEDIANTE ECTACITOMETRO

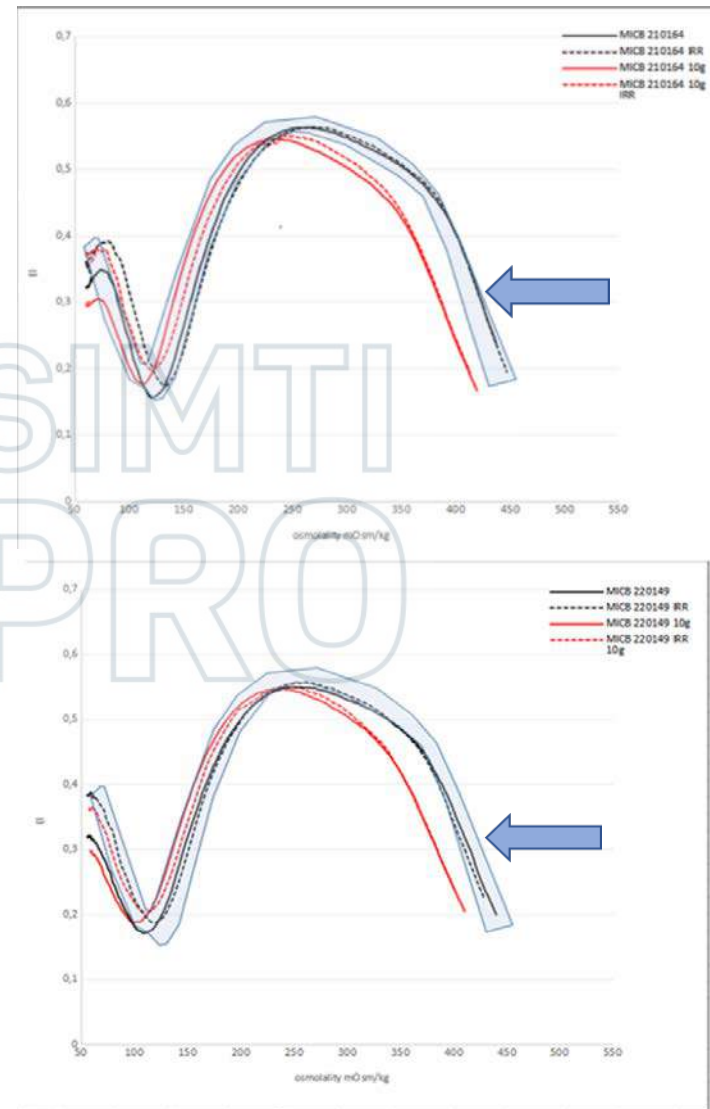
- Iniziale analisi per confrontare campioni di sangue intero da adulto in CPD e in EDTA.
- Creazione area di controllo come target per CB (Area azzurra figura).



RISULTATI 2/2

ANALISI REOLOGICA DEL SANGUE CORDONALE INTERO

- Il 90% dei campioni al giorno zero, pre e post irraggiamento, seguono un andamento comparabile all'area di controllo.
- Al giorno 10 tutti i campioni presentano una riduzione del valore di Ohyper, che rispecchia lo stato idratazione cellulare.
- Non sono state osservate differenze significative nella deformabilità post irraggiamento né al tempo 0 né al tempo 10.



RISULTATI 2/2

VALUTAZIONE DEL METABOLISMO ERITROCITARIO MEDIANTE DOSAGGIO DI ATP

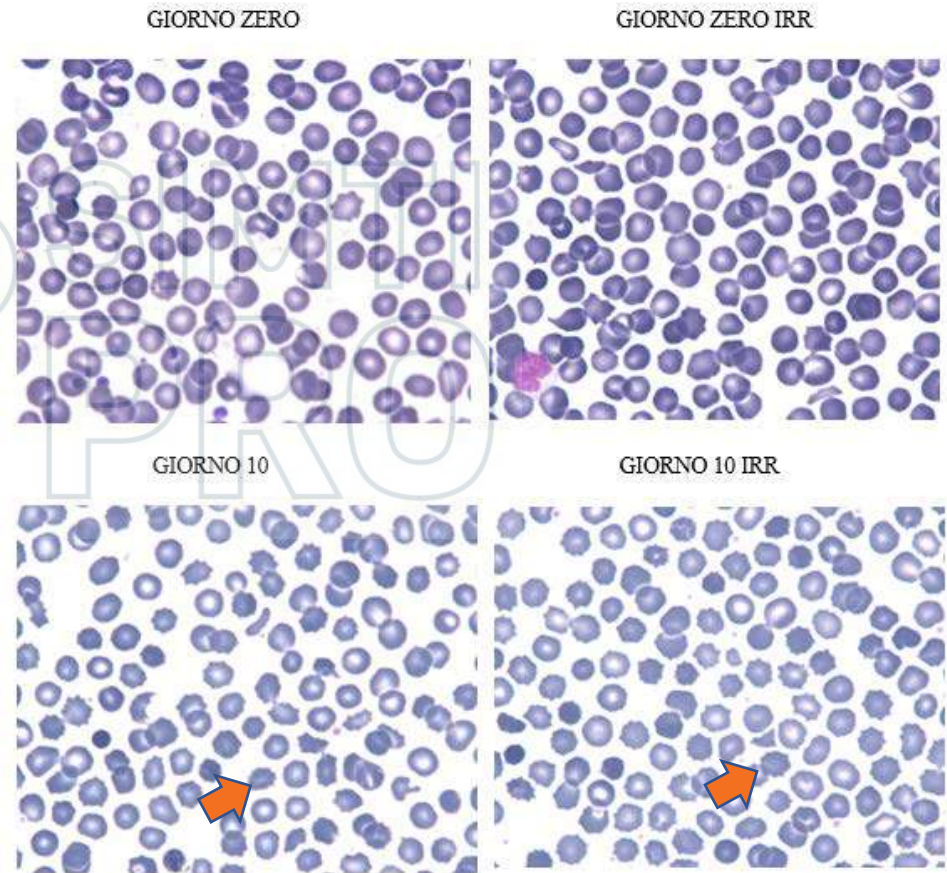
N	CAMPIONE	A	B	C	D
		$T_{0IRR}-T_0$	$T_{10}-T_0$	$T_{10IRR}-T_{0IRR}$	$T_{10IRR}-T_{10}$
		% ATP RESIDUO			
1	MICB-0120210573	93	81	61	70
2	MICB-0120210370	78	75	81	85,7
3	MICB-0120220063	131	92	83	118
4	MICB-0120220149	143	87	52	86
5	MICB-0120210164	69	61	91	103
6	MICB-0120220162	97,5	65	56	84,6
7	MICB-0120220189	72	61	94	110
8	MICB-0120220127	97	71	60	82
9	MICB-0120210063	109	129	138	117
MEDIA		99	80	80	98
MIN		69	61	55	70
MAX		143	129	151	118

- La conservazione a 10 giorni non determina una perdita consistente del contenuto di ATP
- L'irraggiamento non interferisce con il contenuto energetico cellulare.

RISULTATI 2/2

ANALISI DELLA MORFOLOGIA ERITROCITARIA

- Si evidenziano rari stomatociti, sferociti e schistociti in tutte le condizioni analizzate
- Notevole aumento di echinociti dopo dieci giorni di conservazione, evento attribuibile all'invecchiamento cellulare (R. Reverberi et al., 2007).



CONCLUSIONI 1/2

- Lo studio rappresenta un primo passo per la standardizzazione della procedura di frazionamento del CB per ottenere il Concentrato piastrinico (CB-PC); Plasma povero di piastrine (CB-PPP) e Globuli rossi leucoridotti (CB-LR-RBC).
 - **Conta piastrinica CB-PC:** pari a $1 \times 10^6 /L \pm 20\%$, come da D.M. 2.11.2015.
 - **Volume minimo target CB-LR-RBC:** >20 mL, considerato sufficiente per una trasfusione di piccolo volume in neonati prematuri con peso corporeo medio di 1 kg (E. G. González et al., 2021).
 - **Emolisi CB-LR-RBC:** <0,8% come da D.M. 2.11.2015.
 - **Potassio:** 3 mmol/L → 25 mmol/L, valore considerato sicuro per trasfusioni neonatali di piccolo volume somministrate in 2-4 ore (R.G. Strauss et al., 2021).

CONCLUSIONI 2/2

- Questi dati, seppur preliminari, inerenti alla caratterizzazione del CB intero, sembrano dimostrare che la conservazione e l'irraggiamento non portino ad una modificazione reologica cellulare, e che l'utilizzo di CB-RBC può pertanto rappresentare una valida alternativa per le trasfusioni, in particolar modo nei neonati.
 - **Deformabilità:** Non si riscontrano notevoli variazioni dopo irradiazione e conservazione come osservato in campioni da adulto (R. Reverberi 2007)
 - **Dosaggio ATP:** Si riscontra una perdita poco consistente rispetto alla perdita osservata in unità da adulto (P. Carpari et al., 2013)
 - **Morfologia:** Si osserva un cambiamento nella morfologia eritrocitaria, evento paragonabile alla condizione in unità da adulto (R. Reverberi et al., 2013)
 - **Irradiazione:** Deformabilità post irradiazione poco significative rispetto al controllo, come verificato in diversi studi in unità da adulto (R. Reverberi et al. 2007).



GRAZIE PER L'ATTENZIONE!



SC Medicina Trasfusionale (Direttore Dr. D. Prati):

- Stefania Villa
- Paolo Rebullà
- Tiziana Montemurro

S.C. Ematologia - S.S. Fisiopatologia delle anemie (Direttrice Dr.ssa W. Barcellini):

- Paola Bianchi
- Anna Zaninoni
- Cristina Vercellati
- Anna Marcello
- Elisa Fermo