

**BANCA DELLE CORNEE DELLA REGIONE EMILIA ROMAGNA
SEDE DI IMOLA**

**DIRETTORE: DOTT. PAOLO BONCI
RESPONSABILE MEDICO: DOTT.SSA PAOLA BONCI**

**Effetto di differenti processi di
conservazione sul contenuto di
proteine totali e fattori di crescita in
un prodotto biologico sviluppato da
membrana amniotica umana**

Alessandra Russo
SIBO - XV Congresso Nazionale S.I.TRA.C.
Bologna, 24 Febbraio 2011

Editorial Manager® - Windows Internet Explorer provided by Ausl di Imola

File Modifica Visualizza Preferiti Strumenti ?

Indirizzo <http://www.editorialmanager.com/catb/default.asp>

Cell and Tissue Banking Editorial Manager®

HOME • LOG OUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author Username: alessandrarusso79

Submissions Needing Revision for Author Alessandra Russo, Ph. D.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Date Revision Due	Status Date	Current Status	View Decision
Action Links	CATB213R1	THE EFFECTS OF DIFFERENT PRESERVATION PROCESSES ON THE TOTAL PROTEIN AND GROWTH FACTOR CONTENT IN A NEW BIOLOGICAL PRODUCT DEVELOPED FROM HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE	20 Jul 2010	04 Apr 2011	29 Jan 2011	Revise	Minor revisions

A. Russo, Pa Bonci, Po Bonci.

Eye Bank, Department of Ophthalmology, S. Maria della Scaletta Hospital, Via Montericco 4, Imola (Bologna, Italy).



INTRODUZIONE

1995: *Kim e Tseng* riportano per la prima volta l'impianto di Membrana Amniotica umana (hAM) crioconservata per la ricostruzione di superfici corneali in modelli animali

Dal 2000 ad oggi: analisi degli effetti del processo di conservazione sulle proprietà *in vivo* della hAM

- crioconservazione
- congelamento
- omogeneizzazione
- liofilizzazione
- sterilizzazione



INTRODUZIONE

2000: *Koizumi et al.* Presenza di EGF, TGF- α , KGF, HGF, bFGF, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, KGFR, HGFR tramite RT-PCR ed Elisa test su hAM preservata a -80°C 30 gg

2004: *Nakamura et al.* analizza *in vitro* e *in vivo* caratteristiche fisiche, immunoistochimiche e morfologiche di hAM liofilizzata

2005: *Bonci et al.* analizza l'efficacia *in vivo* di una sospensione derivata da hAM omogeneizzata

2008: *Rodriguez-Ares et al.* valuta *in vitro* e *in vivo* gli effetti della liofilizzazione e della crioconservazione su hAM in termini di caratteristiche istologiche e fattori di crescita

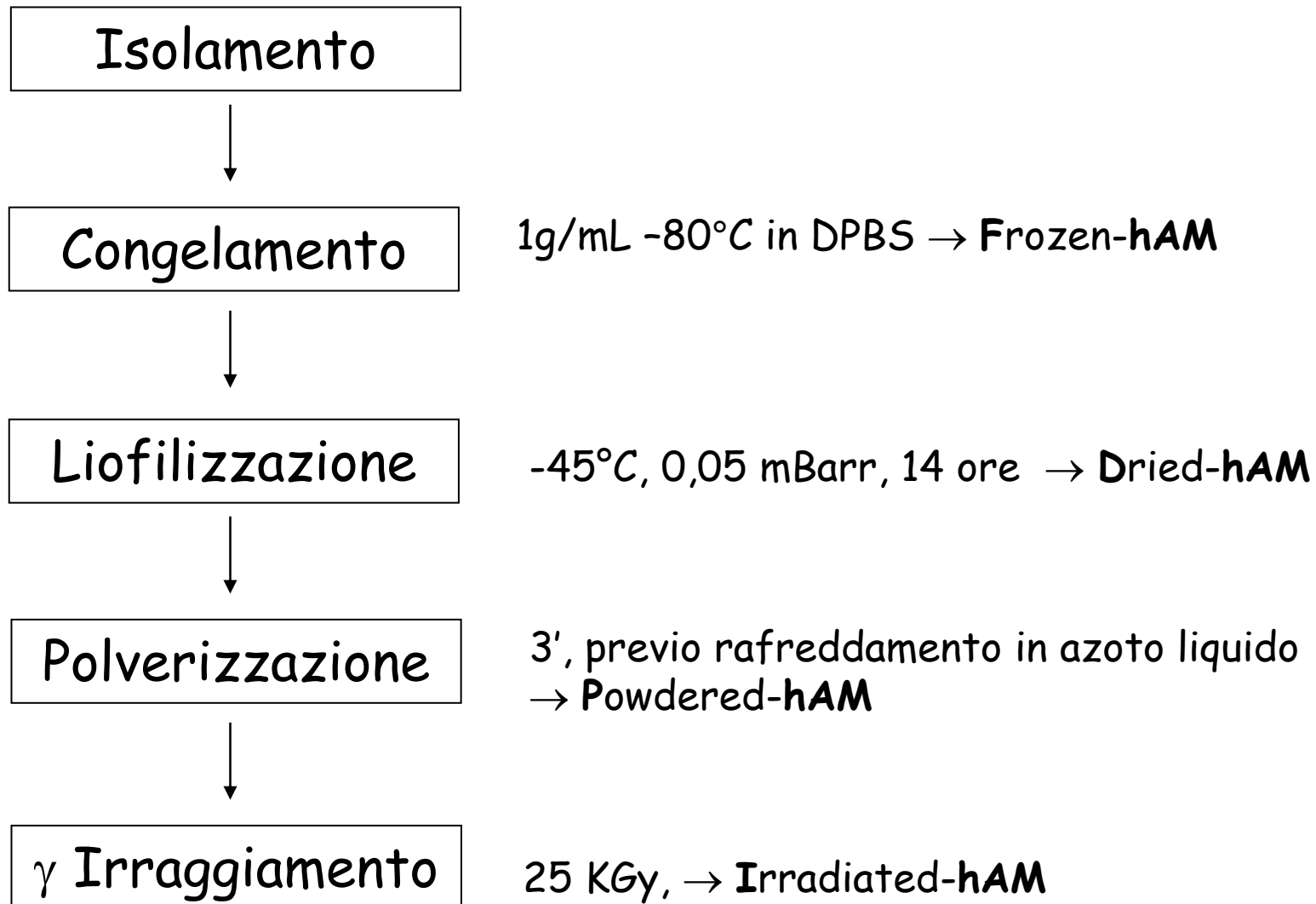
2010: *Lim et al.* confronta proprietà biologiche ed ultrastrutturali di un prodotto, commercialmente disponibile, di hAM decellularizzata e deidratata con quelle di hAM criopreservata



SCOPO DELLA RICERCA

Caratterizzare *in vitro* una sospensione di tessuto derivata da hAM congelata, liofilizzata, polverizzata e sterilizzata (in termini di proteine totali e fattori di crescita)

MATERIALI E METODI





MATERIALI E METODI

Congelamento

Liofilizzazione

Polverizzazione

γ Irraggiamento

Risospensione in DPBS \rightarrow 10000 g 15' 4°C \rightarrow supernatante

Bradford Protein Assay:

quantificazione delle proteine totali

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

EGF

HGF

KGF

bFGF

TGF- β 1

PROTEINE TOTALI

Campione	mg proteine totali / g tessuto fresco	% proteine totali
		F/D-hAM e F/P-hAM
F-hAM	1.95 ± 0.21	-
D-hAM	1.19 ± 0.06	61.03%
P-hAM	1.48 ± 0.21	75.90%

F-hAM: congelato (Frozen hAM)

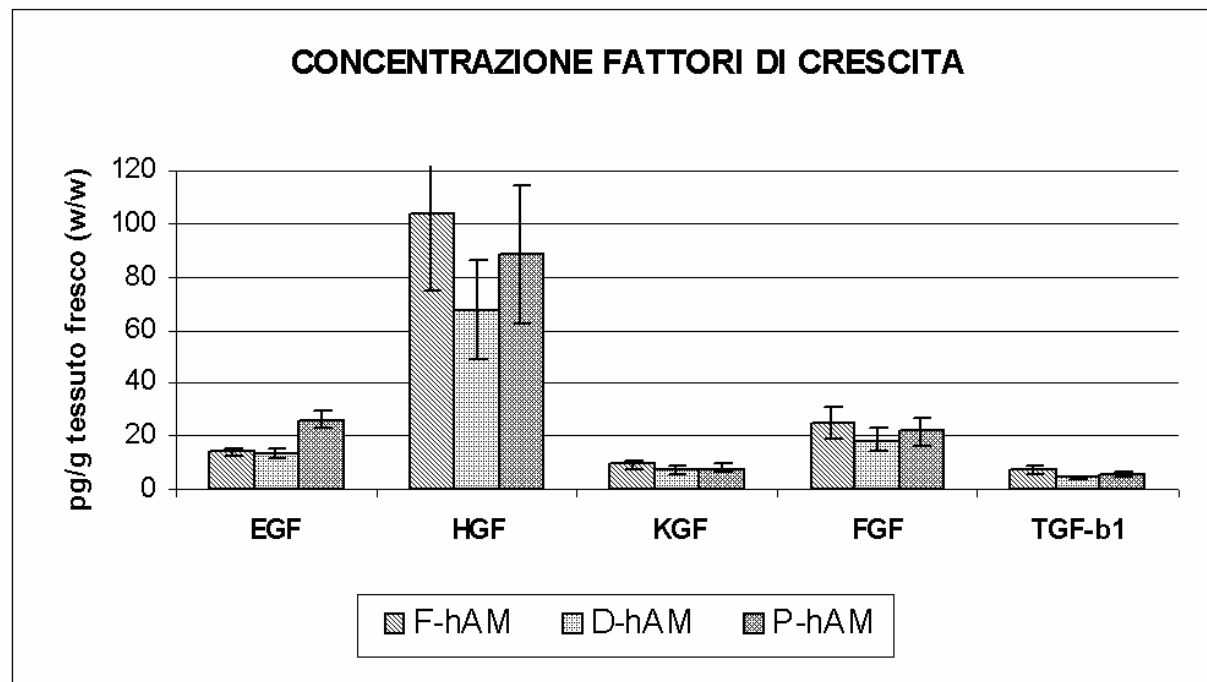
D-hAM: liofilizzato (Freeze Dried-hAM)

P-hAM: polverizzato (Powdered-hAM)

- Il campione congelato (F-hAM) mostra un rilascio di proteine totali nella sospensione di tessuto maggiore rispetto al campione liofilizzato (D-hAM) e polverizzato (P-hAM).
- La polverizzazione favorisce il rilascio di proteine totali rispetto alla sola liofilizzazione.

FATTORI DI CRESCITA: METODI A CONFRONTO

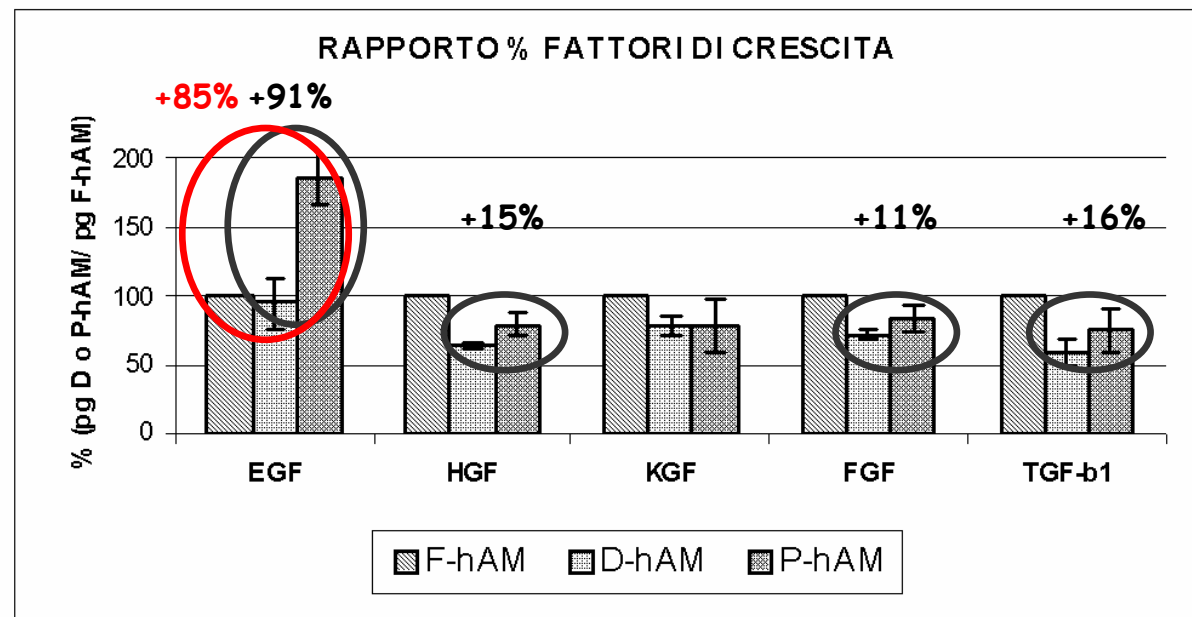
Fattori di crescita	F-hAM	D-hAM	P-hAM
	(pg/g tessuto)		
EGF	14.06 ± 1.72	13.70 ± 2.04	26.07 ± 3.38
HGF	103.93 ± 28.80	67.47 ± 18.89	88.53 ± 25.77
KGF	9.18 ± 1.67	7.28 ± 1.33	7.86 ± 1.57
FGF	24.85 ± 5.50	18.36 ± 4.37	21.72 ± 5.33
TGF-β1	7.42 ± 1.37	4.35 ± 0.84	5.37 ± 0.93



F-hAM: congelato (Frozen hAM)
D-hAM: liofilizzato (Freeze Dried-hAM)
P-hAM: polverizzato (Powdered-hAM)

% ABBATTIMENTO FATTORI DI CRESCITA

Fattori di Crescita	D-hAM/F-hAM	P-hAM/F-hAM
	(% pg/pg)	
EGF	94.43 ± 17.66	185.34 ± 19.29
HGF	63.78 ± 2.53	79.42 ± 8.13
KGF	78.55 ± 7.96	78.71 ± 19.99
FGF	71.64 ± 3.23	82.86 ± 9.48
TGF-β1	58.77 ± 10.13	74.86 ± 14.74



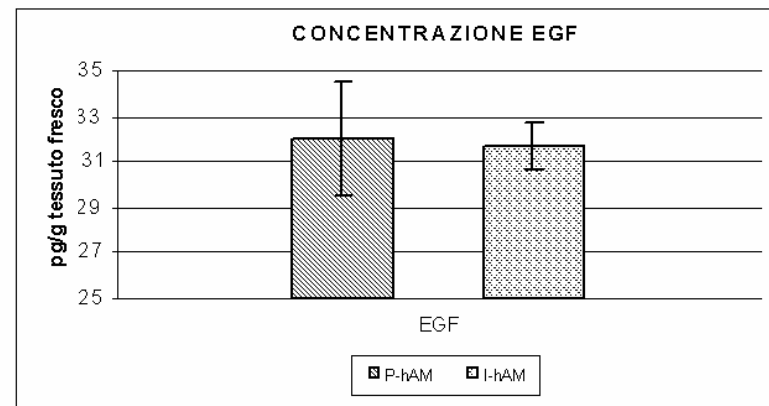
F-hAM: congelato (Frozen hAM)
D-hAM: liofilizzato (Freeze Dried-hAM)
P-hAM: polverizzato (Powdered-hAM)

EFFETTO DELL'IRRAGGIAMENTO

Fattori di Crescita	P-hAM	I-hAM
	(pg/g tessuto fresco)	
EGF	32.04 ± 2.50	31.68 ± 2.50

P-hAM: polverizzato (Powdered-hAM)

I-hAM: irradiato (Irradiated-hAM)



- L'irraggiamento non ha effetti sulla degradazione di EGF e, conseguentemente, sul contenuto della proteina.



DISCUSSIONE

- La liofilizzazione e la polverizzazione hanno un effetto negativo sul rilascio nella sospensione di tessuto di proteine totali e dei fattori di crescita
- La polverizzazione favorisce il rilascio di proteine totali e dei fattori di crescita rispetto alla sola liofilizzazione
- La polverizzazione favorisce il rilascio di EGF rispetto al congelamento



DISCUSSIONE

- Le differenze osservate sono intrinsecamente dipendenti dal metodo di preparazione della hAM: il processo di polverizzazione può essere un modo per incrementare fortemente il rilascio delle proteine nella sospensione
- La caratterizzazione prodotta non è un indice di predittività dell'efficacia della sospensione, ma rappresenta un punto di partenza in termini di composizione del prodotto biologico



GRAZIE A TUTTI PER L'ATTENZIONE!



RUOLO DEI FATTORI DI CRESCITA NELLA RI-EPITELIZZAZIONE CORNEALE

EGF

FGFb

TGF- β 1

ruolo nelle interazioni (di cellule
epiteliali e mesenchimali) coinvolte
nella guarigione

HGF

KGF

prodotti dalle cellule mesenchimali
accelerano la riepitelizzazione per azione
paracrina



RUOLO DEI FATTORI DI CRESCITA NELLA RI-EPITELIZZAZIONE CORNEALE

EGF mitogeno

TGF- β 1 Stimola la sintesi di proteine della matrice extracellulare
Incrementa la sintesi degli inibitori delle proteasi
Up regola le molecole di adesione cellulare
Sopprime la sintesi delle proteasi di degradazione della matrice
Controlla l'attività dei fibroblasti

FGFb

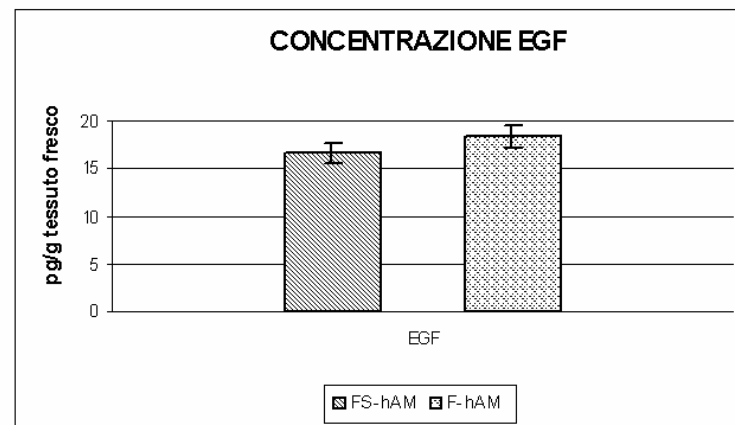
HGF

KGF

CONGELAMENTO: EFFETTO DEL CRIOPROTETTORE

Fattori di Crescita	FS-hAM	F-hAM
	(pg/g tessuto fresco)	
EGF	16.63 ± 1.10	18.33 ± 1.25

FS-hAM: congelato per uso chirurgico (1g/mL in 80% DMEM, 10% albumina umana, 10% DMSO)
Frozen for Surgical use- hAM
F-hAM: congelato (1g/mL in DPBS) Frozen hAM



- Il crioprotettore (DMSO) nella fase di congelamento non ha effetti sul contenuto di EGF.

Campione	mg proteine totali / g tessuto fresco	% proteine totali
		F/D-hAM e F/P-hAM
F-hAM	1.95 ± 0.21	-
D-hAM	1.19 ± 0.06 **	61.03%
P-hAM	1.48 ± 0.21 *	75.90%

* P < 0,01 tra F-hAM e P-hAM

** P < 0,05 tra F-hAM e D-hAM

Fattori di crescita	F-hAM	D-hAM	P-hAM
	(pg/g tessuto)		
EGF †§	14.06 ± 1.72	13.70 ± 2.04	26.07 ± 3.38
HGF *†‡	103.93 ± 28.80	67.47 ± 18.89	88.53 ± 25.77
KGF *†	9.18 ± 1.67	7.28 ± 1.33	7.86 ± 1.57
FGF *†§	24.85 ± 5.50	18.36 ± 4.37	21.72 ± 5.33
TGF-β1 *†§	7.42 ± 1.37	4.35 ± 0.84	5.37 ± 0.93

* P < 0.01 tra F-hAM e D-hAM

† P < 0.01 tra F-hAM e P-hAM

‡ P < 0.05 tra F-hAM e P-hAM

§ P < 0.01 tra D-hAM e P-hAM

‡‡ P < 0.05 tra D-hAM e P-hAM