



G.L. POLVANI, A. GUARINO, G. POMPILIO,
A. PAROLARI, G. PICCOLO, A. SALA,
P. BIGLIOLI

Banca Italiana Omoinnesti
Centro Cardiologico Fondazione "I. Monzino"
Cattedra di Cardiocirurgia dell'Università degli Studi di
Milano

Si definisce *Banking* di tessuti l'insieme delle procedure che prevedano il reperimento la preparazione, la conservazione e la distribuzione dell'omoinnesto. In particolare si possono distinguere sette fasi.

- 1) Selezione del donatore e prelievo.
- 2) Preparazione chirurgica e valutazione anatomica.
- 3) Screening virale e batteriologico.
- 4) Sterilizzazione.
- 5) Criopreservazione.
- 6) Stoccaggio.
- 7) Distribuzione.

Gli *omoinnesti vascolari* vengono classificati in freschi e crioconservati.

Gli omoinnesti vascolari *freschi* sono prelevati da donatore multiorgano o cadavere e sottoposti a sterilizzazione con soluzione antibiotata a bassa concentrazione e nella stessa conservati per un periodo di tempo non superiore alle 72 ore a + 4°C (conservazione in ipotermia); quelli *criopreservati* sono prelevati da donatore multiorgano o cadavere e sottoposti a sterilizzazione con soluzione antibiotata a bassa concentrazione per un periodo variabile dalle 48 alle 96 ore quindi criopreservati a -180°C in vapori di azoto liquido.

Si identificano differenti tempi che vanno dal prelievo alla crioconservazione.

Il tempo di *ischemia calda* è il tempo che intercorre tra l'asistolia del donatore ed il termine della fase di prelievo con il successivo posizionamento dell'omoinnesto nella soluzione di trasporto a + 4°C; mentre il tempo di *ischemia fredda* è il tempo che intercorre tra il posizionamento del tessuto nella soluzione di trasporto a + 4°C e l'inizio della fase di sterilizzazione; infine il tempo di *conservazione o di stoccaggio* è tutto il periodo che l'omoinnesto - una volta criopreservato - rimane nei

Riassunto

Si definisce *Banking* di tessuti l'insieme delle procedure che prevedano il reperimento, la preparazione, la conservazione e la distribuzione dell'omoinnesto.

Dopo la fase di prelievo gli omoinnesti vascolari vengono posti in soluzione di trasporto a + 4°C e mantenuti a tale temperatura fino all'arrivo presso la Banca. Il passo successivo è rappresentato dalla dissezione dell'omoinnesto che dovrà essere effettuata nel minor tempo possibile, al massimo 24 ore dal prelievo, in condizioni di massima sterilità. Presso la Banca Italiana Omoinnesti del Centro Cardiologico gli omoinnesti vascolari, sono mantenuti a + 4°C per 96 ore in medium con antibiotici. Dopo una fase di sterilizzazione a +4°C, il tessuto viene congelato secondo una discesa termica omogenea e controllata e stoccato a -150°C/ -180°C in vapori d'azoto liquido fino al momento dell'impiego, permettendo così una conservazione a lungo termine.

La finalità di tutti i processi di criopreservazione è il mantenimento dell'integrità strutturale e funzionale delle cellule o dei tessuti

La discesa termica tissutale deve avvenire in modo tale da evitare non solo danni alla vitalità e funzionalità delle componenti cellulari ma, soprattutto, alla struttura del tessuto in toto.

Al fine di limitare questi eventi vengono utilizzati degli agenti crioprotettori che agiscono riducendo la concentrazione relativa dei soluti, la disidratazione cellulare, la formazione di micro-macrocrystalli.

Altra tappa nella determinazione d'idoneità dell'omoinnesto è rappresentata dalle indagini sugli aspetti virali e batteriologici. Gli screening virali vengono effettuati sul siero del donatore e i test batteriologici sono condotti sul tessuto e sui liquidi.

Per ogni fase del banking vengono registrate ed archiviate, in forma cartacea e su database, una serie d'informazioni sul donatore e sui tessuti atte a garantire una sempre corretta gestione del materiale.

Parole chiave: Omoinnesti, conservazione.

Abstract

BANKING OF VASCULAR HOMOGRAFT

We define as *Banking* of the tissues all the procedures that include the finding, preparation, conservation and distribution of the homograft.

The vascular homografts are taken and put into a solution of transportation at + 4°C and kept at this temperature till

their arrival at the Bank. The following step is the dissection of the homograft which will have to be performed as quickly as possible at most 24 hours after the taking in conditions of maximum sterility.

At the Italian Homograft Bank at Centro Cardiologico, the vascular homografts are kept at + 4°C for 96 hours on average with antibiotics. After a phase of sterilization at + 4°C the tissue is frozen according to a homogeneous and controlled thermic decrease and stored at -150°C/-180°C in fumes of liquid nitrogen till the moment of their employment allowing a long term conservation.

The aim of all these procedures of cryopreservation is to keep the structural and functional integrity of cells and tissues.

The thermic decrease of the tissues must occur so that to avoid all the damages of the cellular vitality and functionality and especially of the tissue structure in toto.

In order to limitate these events some cryoprotector agents are employed because they reduce the concentration of the solutes, the cellular dehydration, the formation of micro-macro crystals.

Another step to establish if the homograft is proper is the study of bacteriological and viral aspects. The viral screenings are performed on the donor's blood and the bacteriological tests are performed on the tissue and on the liquids.

For each phase of the banking a series of information about the donor and about the tissues are recorded and filed both on paper and database so that to grant always a right conduct of the material.

Key words: Homograft, conservation.

vapori di azoto liquido, ad una temperatura compresa tra i - 150°C e i - 180 °C, fino al momento dello scongelamento.

Dopo la fase di prelievo gli omoinnesti vascolari vanno messi in soluzione di trasporto (ad es. soluzione Eurocollins) a + 4°C e mantenuti a tale temperatura fino all'arrivo presso la Banca che si occupa della preparazione, congelamento e stoccaggio.

Il passo successivo è rappresentato dalla dissezione dell'omoinnesto che dovrà essere effettuata nel minor tempo possibile, al massimo 24 ore dal prelievo (tempo di ischemia fredda), in condizioni di massima sterilità (possibilmente sotto cappa sterile).

Una prima valutazione degli omoinnesti viene data in fase di preparazione, classificando i vasi secondo una scala anatomica suddivisa in 3 classi:

Classe I: Non Idoneo

Segmento arterioso: aneurismatico o con due o più blister, calcificazioni transmurali diffuse (> 50%), aree di ulcerazione più o meno ampia intimale.

Segmento venoso: francamente varicoso, zone di fibrosi parietale infiltranti o periavventiziali (post-flebitiche).

Classe II: Idoneo con riserva

Segmento arterioso: Megaarterie, aree di ispessimento fibro-calcifico, ateromi calcifici segmentari aggettanti nel lume senza lesioni ulcerative.

Segmento venoso: ispessito, non dilatato, qualche ectasia circoscritta.

Classe III: Idoneo

Segmento arterioso: normale, piccole raccolte di materiale fibrolipidico.

Segmento venoso: senza apparenti lesioni.

Metodiche di sterilizzazione e conservazione

Nei primi anni di impiego clinico dei tessuti di origine umana, le tecniche per la conservazione fino al momento dell'impiego sono state le più svariate: irradiazione con raggi γ , preservazione con agenti chimici (glutaraldeide, formolo), conservazione a + 4°C in soluzione antibiotata. Con il progredire delle conoscenze è apparso poi sempre più evidente che il miglior risultato clinico a lungo termine era legato al mantenimento della vitalità cellulare del tessuto (1). Negli anni successivi pertanto l'attenzione si è andata via via concentrando solo su quei metodi in grado di garantire, il più possibile, il mantenimento della morfologia tissutale e della vitalità cellulare. A tale scopo il più comune metodo di conservazione dei tessuti è quello che ne prevede il mantenimento in condizioni ipotermiche, sia con temperature di poco superiori allo zero - solitamente + 4°C -, sia con il congelamento e successiva preservazione a - 70°C o - 196°C. Entrambe i metodi presentano vantaggi e svantaggi.

Sterilizzazione e Stoccaggio a + 4°C

Questo metodo prevede il mantenimento del tessuto in particolari soluzione nutrienti a + 4°C fino al momento dell'impiego, ma per un periodo di tempo non superiore alle 4 settimane. È un sistema naturalmente più economico e di più facile realizzazione rispetto alle moderne tecniche di criobiologia. Permette inoltre di evitare tutti gli eventuali danni tipici del processo di congelamento. Presenta tuttavia un grosso inconveniente: il periodo di conservazione risulta limitato nel tempo a causa dei processi di degenerazione strutturale e metabolica cui inevitabilmente il tessuto va incontro(2). Prima della conservazione vera e propria è prevista una fase di decontaminazione variabile per durata e composizione della soluzione antibatterica.

Attualmente vengono impiegate per la sterilizzazione vascolare due soluzioni base: Roosvell Park Memorial Institute (RPMI 1640), oppure la soluzione dell'Università del Wisconsin (Belzer, U.W.).

La prima è quella utilizzata dal gruppo francesce del Prof. Kieffer, pioniere nell'uso di alloprotesi vascolari; si tratta di un medium utilizzato per le colture cellulari e contenente sali inorganici, aminoacidi, vitamine, zuccheri, tamponi.

La seconda è una soluzione usualmente impiegata - così come la soluzione Eurocollins - per il trasporto e conservazione degli organi fino a molte ore dal loro prelievo. Si tratta di un preparato cristalloide composto essen-

zialmente da elettroliti con l'aggiunta di componenti che dovrebbero – almeno in via teorica – maggiormente proteggere il tessuto dai danni dell'ischemia e dell'ipotermia. Questi additivi – tra i quali ricordiamo il lattobionato di potassio, l'adenosina, il raffinosaio, l'allopurinolo, l'amido idrossietilico – aiutano a prevenire l'edema cellulare, contribuiscono ad accelerare la ripresa dei processi metabolici (pompa Na/K), ostacolano la formazione dei radicali liberi. In effetti sono stati condotti degli studi mirati a valutare il mantenimento delle caratteristiche morfologiche e funzionali dell'endotelio in arterie conservate con l'una e l'altra soluzione. In entrambe i casi a 24 ore si è già raggiunta la disendotelizzazione della protesi a meno di perfondere *in situ* i vasi con U.W. fredda. In questo caso l'endotelio, oltre ad essere ancora quasi totalmente presente su larghe zone della protesi, continua a manifestare una buona funzionalità fino a 48 ore. È stato possibile verificare ciò studiando la capacità di vasoregolazione delle arterie – contrazione e rilasciamento a seguito di stimoli esterni – funzioni che, essendo endotelio mediate, danno conseguentemente indicazioni sullo stato funzionale dello stesso (2).

Sia all'uno che all'altro medium vengono poi aggiunti: albumina umana, eparina ed una serie di antibatterici ed antimicotici adatti all'eliminazione di eventuali contaminanti.

Il trattamento avviene a + 4°C e può durare da 24 fino a 96 ore; se al termine di questa procedura non c'è necessità di impiego del tessuto, lo stesso verrà mantenuto a + 4°C nel medium base privo di antibiotici per un periodo non superiore ai 30-40 giorni.

Sterilizzazione e Criopreservazione

Con la criopreservazione il tessuto, dopo una fase di sterilizzazione a + 4°C, viene congelato secondo una discesa termica omogenea e controllata e stoccato a - 70°C (congelatore) o - 150°C/ - 180°C (vapori di azoto liquido) fino al momento dell'impiego permettendo, quindi, una conservazione a lungo termine, da mesi fino ad anni (3).

Anche in questo caso il processo di conservazione è preceduto dalla sterilizzazione, effettuata secondo i tempi e le modalità già analizzate.

Presso la Banca Italiana Omoinnesti del Centro Cardiologico gli *omoinnesti vascolari*, sono mantenuti a + 4°C per 96 ore in medium base Eurocollins al quale si aggiungono eparina sodica, netilmicina, ceftriaxone, amfotericina B. Come già accennato la soluzione Eurocollins, insieme alla U.W., è quella più usata per la perfusione e preservazione degli organi da trapiantare e a tal scopo viene impiegata anche per i tessuti. Si tratta di un preparato composto essenzialmente da elettroliti e caratterizzato da una elevata concentrazione di potassio e bassa di sodio. Tutto ciò al fine di compensare la ridotta attività della pompa Na/K durante la fase

di ischemia, contrastando quindi l'instaurarsi dell'edema intracellulare causato dal gradiente osmotico.

La finalità di tutti i processi di criopreservazione è il mantenimento dell'integrità strutturale e funzionale delle cellule o dei tessuti (1). I primi studi di criobiologia risalgono a Smith e Parker; da allora sono stati compiuti notevoli progressi grazie alle nuove tecniche che permettono una regolazione sempre più accurata della discesa termica di un sistema biologico. La velocità di raffreddamento può seguire una curva termica di congelamento rapido o lento. Per congelamento rapido si intende una discesa della temperatura che determina la formazione di cristalli intra ed extracellulari con una ridotta disidratazione della cellula (1). Si ritiene che la formazione di cristalli sia un fenomeno dannoso per il mantenimento della vitalità cellulare in particolare durante la fase di scongelamento.

Viene definito congelamento lento una caduta della temperatura che determina una significativa disidratazione della cellula in assenza della formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari. La discesa termica tissutale deve avvenire in modo tale da evitare non solo danni alla vitalità e funzionalità delle componenti cellulari ma, soprattutto, alla struttura del tessuto *in toto* - es. micro e macrofratture determinate da cristallizzazioni troppo rapide delle componenti acquose (1). A tal scopo la curva di congelamento ottimale si colloca in un range di curve intermedie tra quelle sopracitate (congelamento lento, congelamento rapido): l'abbassamento termico ideale è intorno ad 1°C al minuto; deviazioni da questa curva sono poco tollerate per temperature comprese tra 0°C e - 20°C (fase in cui avviene la formazione di micro/macro-cristalli), mentre per temperature inferiori a - 20°C esiste una tolleranza sempre maggiore. Come già accennato, uno dei rischi più dannosi che si possono verificare durante il congelamento è la formazione di micro-macro cristalli intra ed extra cellulari (1). Questo fenomeno è fortemente influenzato dalla distribuzione della componente idrofila dei tessuti – acqua, ioni, molecole idrosolubili – che determina alterazione della pressione osmotica. Al fine di limitare questi eventi vengono utilizzati degli agenti crioprotettori come il dimetilsolfossido (DMSO) o il glicerolo, sostanze idrosolubili che durante la discesa termica agiscono riducendo la concentrazione relativa dei soluti, la disidratazione cellulare, la formazione di micro-macro cristalli.

Occorre ricordare, però, che anche queste sostanze non sono prive di controindicazioni: il DMSO a temperatura ambiente è citotossico e per quanto possibile deve essere rimosso prima dell'innesto dell'allograft.

Oltre ai problemi legati al tempo di ischemia e all'uso dell'una o dell'altra soluzione di conservazione già analizzati in precedenza, alla criopreservazione si aggiungono una serie di variabili e parametri ininfluenti sulla conservazione a + 4°C, ma fortemente condizionanti in questo caso, a cominciare dalle caratteristiche di massa e geometria del tessuto stesso.

In un tessuto con dei grossi spessori parietali, per esempio, si creeranno facilmente dei gradienti termici tra la superficie e l'interno, pertanto non risulterà omogeneo il raffreddamento (o lo scongelamento) e sarà difficile il controllo termico. Un'altra difficoltà è rappresentata dal fatto che molti tessuti sono composti da più linee cellulari che dimostrano differenti gradi di sensibilità al danno da freezing. Pertanto la scelta di una particolare preservazione può risultare ottimale per un tipo di cellule, ma deleterio per le altre componenti dello stesso tessuto. Anche la densità cellulare influisce sul congelamento. Alte densità riducono la penetrazione del crioprotettore, interferiscono sugli scambi acquosi attraverso le membrane cellulari e portano alla formazione di cristalli di ghiaccio (1).

La stessa struttura architettonica del tessuto crea delle difficoltà, infatti, essendo composta da strati di differenti linee cellulari, disomogenea e con naturali piani di frattura, lungo questi ultimi possono verificarsi con il congelamento degli slittamenti.

Altrettanto importante è lo scongelamento, procedimento che prevede il passaggio del tessuto da una temperatura di -150°C a $+37^{\circ}\text{C}$ con possibili conseguenze analoghe a quelle viste per la fase di congelamento (formazione di crack strutturali). È parimenti un passaggio che necessita protocolli ben definiti in base alle metodiche di congelamento utilizzate dalle diverse Banche (es. a secco, in medium...).

Come si può immaginare il processo di criopreservazione/scongelamento è il più delicato tra tutte le fasi di banking. Per ciò che riguarda la nostra esperienza il protocollo prevede:

- il "paking" dell'allograft in mezzo liquido -RPMI 1640 con l'aggiunta del 10% di DMSO;
- il congelamento effettuato mediante ultracongelatore programmabile e controllato da un sistema computerizzato; durante questa fase il tessuto viene portato da una temperatura di $+4^{\circ}\text{C}$ a -80°C secondo la discesa termica di $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$;
- lo stoccaggio in vapori di azoto liquido ($T^{\circ} = -150^{\circ}\text{C}/-180^{\circ}\text{C}$);
- lo scongelamento con il solo medium base secondo una metodica che prevede la diluizione a scalare dell'agente crioprotettore.

Controllo di sicurezza e qualità

Altra tappa nella determinazione di idoneità dell'omoinnesto è rappresentata dalle indagini sugli aspetti virali e batteriologici. Gli screening virali vengono effettuati direttamente sul siero del donatore andando a ricercare HIV, HCV, HBsAg, CMV, VDRL;

i test batteriologici sono condotti sul tessuto e sui liquidi con i quali si trova a contatto in diverse fasi della preparazione.

Per ogni fase del banking vengono registrate ed archiviate una serie di informazioni atte a garantire la gestione del materiale.

Di ogni donatore si registrano due codici (NITp e Banca), le iniziali nome/cognome (privacy), età, sesso, gruppo ABO, data e causa del decesso, data/luogo ed equipe di prelievo, tipo di donatore ed eventuali organi prelevati oltre ai tessuti, note caratteristiche, risultati dello screening virale e batteriologico.

Gli esami sul siero del donatore vengono effettuati direttamente dal Centro Trasfusionale e di Immunologia dei Trapianti del Policlinico di Milano – laboratorio che ha ottenuto il Certificato ISO 9002 e accreditato dall'European Foundation for Immunogenetics. Gli esami microbiologici vengono effettuati presso la Banca stessa seguendo un protocollo di indagine approvato nel corso del Congresso su "Impiego dei tessuti omologhi crioconservati in cardiocirurgia: aspetti tecnici, medico-legali, organizzativi. Treviso 1995".

Per ogni omoinnesto si provvede alla compilazione di un modulo che riporta gli stessi due codici già usati per il donatore, la data del prelievo, tipo di soluzione sterilizzante, tipo di crioprotettore, nome di chi provvede alla dissezione/preparazione, misurazione e valutazione anatomica (chirurgo), data e nome di chi criopreserva (tecnico), numero di archiviazione nel dewar di stoccaggio, misure dell'omoinnesto, note del chirurgo preparatore, dati sierologici del donatore e batteriologici del tessuto, data ed Istituto che richiede il tessuto; viene inoltre allegata copia della curva di congelamento.

Tutte le sacche contenenti gli omoinnesti vengono siglate con i due codici NITp e BIO, con il tipo di omoinnesto contenuto e con la data di congelamento.

Tutti i dati raccolti dalla Banca sono archiviati sia in forma cartacea che su database.

Bibliografia

- 1) Crescenzo D.G., Hilbert S.L., Messier R.H., Domkowsky P.W., Barrick M.K., Lange P.L. et al.: *Human cryopreserved homografts: electron microscopic analysis of cellular injury*. Ann Thorac Surg, 55:25-31, 1993.
- 2) Pompilio G., Polvani G.L., Antona C., Rossoni G., Guarino A., Porqueddu M. et al.: *Retention of endothelium-dependent properties in human mammary artery following cryopreservation*. Ann Thorac Surg, 61:667-73, 1996.
- 3) Yankah A.C., Meskhishvili V.A., Weng Y., Schorn K., Lange P.E., Hertzler R.: *Accelerated degeneration of allografts in the first two years of life*. Ann Thorac Surg, 60:S71-7, 1995.