

Biocompatibilità dei Dispositivi Medici: ricerca di procedure sperimentali per migliorare rilevanza e sensibilità dei protocolli disponibili

L. Turco, G. De Angelis, C. Gesumundo, F. Vanni, M. De Felice, M.R. Milana, E. Testai

**Istituto Superiore di Sanità
Dipartimento Ambiente e Salute
*laura.turco@iss.it***



La biocompatibilità dei Dispositivi Medici è regolamentata dalle Norme ISO 10993 «Valutazione biologica dei dispositivi medici» :

- Parte 5: **Prove per la citotossicità in vitro.**
- Parte 6: Prove relative agli effetti locali dopo l'impianto

Protocolli sperimentali proposti nella ISO 10993-5

- Contatto tra dispositivo e soluzioni simulanti («sample extract»)
- 24 ore di trattamento delle cellule con gli estratti (opportunamente diluiti)
- Valutazione quantitativa della vitalità cellulare

Table C.1 — MTT cytotoxicity test work flow

Time h	Procedure
00:00	Seed 96-well plates: 1×10^4 cells/100 μ l MEM culture medium/well Incubate (37 °C/5 % CO ₂ /22 h to 26 h) ↓
24:00	Remove culture medium ↓
24:00	Treat with ≥ 4 concentrations of test <u>sample extract</u> in treatment medium (100 μ l) (untreated blank = treatment medium) Incubate (37 °C/5 % CO ₂ /24 h) ↓
48:00	Microscopic evaluation of morphological alterations Remove culture medium Add 50 μ l MTT solution Incubate (37 °C/5 % CO ₂ /2 h) ↓
51:00	Remove MTT solution Add 100 μ l isopropanol to each well Sway plate ↓
51:30	Detect absorption at 570 nm (reference 650 nm)

Individuazione dei punti deboli dei protocolli in uso:

Scelta della linea cellulare

5 Cell lines

Established cell lines are preferred and where used shall be obtained from recognised repositories³⁾.

Where specific sensitivity is required, primary cell cultures, cell lines and organotypic cultures obtained directly from living tissues shall only be used if reproducibility and accuracy of the response can be demonstrated.

3) For example, cell lines American Type Culture Collection CCL 1 (NCTC clone 929), CCL 163 (Balb/3T3 clone A31), CCL 171 (MRC-5) and CCL 75 (WI-38), CCL 81 (Vero) and CCL 10 [BHK-21 (C-13)] and V-79 379A are endorsed by ISO experts to be suitable.

This information is given for the convenience of the user of this part of ISO 10993 and does not constitute an endorsement by ISO of the products named. Other cell lines may be used if they can be shown to lead to the same or more relevant results.

- CCL 1 clone 929 → fibroblasti (mouse)
- Balb/3T3 clone A31 → fibroblasti (mouse)
- CCL 171 (MRC-5) → fibroblasti polmone (uomo)
- CCL 75 (WI-38) → fibroblasti polmone (uomo)
- CCL 81 (Vero) → epiteliali rene (scimmia)
- CCL 10 BHK-21 (C-13) → fibroblasti rene (hamster)
- V-79 379A → fibroblasti polmone (hamster)

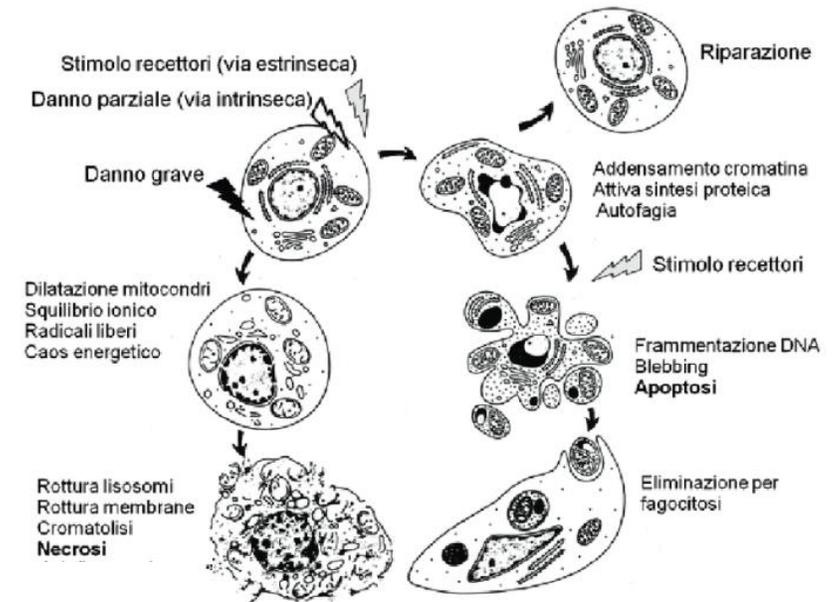


Altre linee cellulari possono essere usate se di pari o maggiore rilevanza

Individuazione dei punti deboli dei protocolli in uso: Endpoint di citotossicità misurato

La morte cellulare può essere l'evento terminale di una serie di reazioni/effetti subletali.

Se lo stimolo esterno persiste o aumenta le risposte adattative da parte della cellula vengono meno.



Obiettivo dello studio:

migliorare rilevanza e sensibilità delle prove di biocompatibilità dei DM

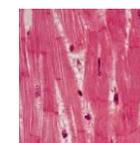
1. Scelta di una linea cellulare più rilevante



Specie: uomo



Tessuto: muscolare



È stata utilizzata la linea cellulare umana di Rbdomioblastoma «RD – ATCC CCL-136»

2. Individuare un endpoint subletale di citotossicità per migliorare la sensibilità delle prove di biocompatibilità



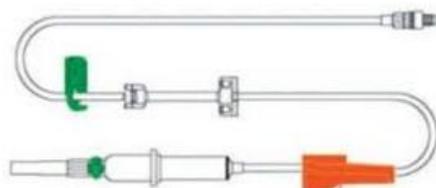
Rilascio di citochine infiammatorie
(quantificazione mediante test ELISA)



Preparazione del campione

La produzione di estratti liquidi dai DM deve *simulare o «esagerare»* le condizioni di utilizzo degli stessi. Componenti chimiche dei materiali di fabbricazione dei DM possono migrare nelle soluzioni previste per il loro utilizzo ed entrare in contatto con i tessuti del paziente.

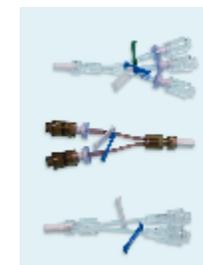
Categoria di DM utilizzati nello studio



Deflussore semplice



Deflussore per infusione intravenosa a gravità con ago epicranico



Set multi-infusione per chemioterapia

Questi dispositivi medici sono utilizzati per infusione e nutrizione artificiale.

Come soluzioni di estrazione sono state utilizzate etanolo 50% v/v e acido acetico 3% v/v.

Disegno sperimentale

1. Estrazione con simulanti



2. Diluizione degli estratti nel terreno di coltura

1:400 estratti in acido acetico 3%
1:50 estratti in etanolo 50%



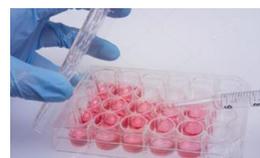
Analisi degli estratti in GC/MS
per la quantificazione di ftalati

3. Trattamento delle cellule (24 e 48 ore)

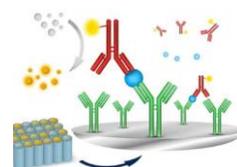


Trattamento in parallelo con
soluzioni standard di ftalati

4. Prelievo dei terreni



5. Test ELISA (13 citochine infiammatorie)

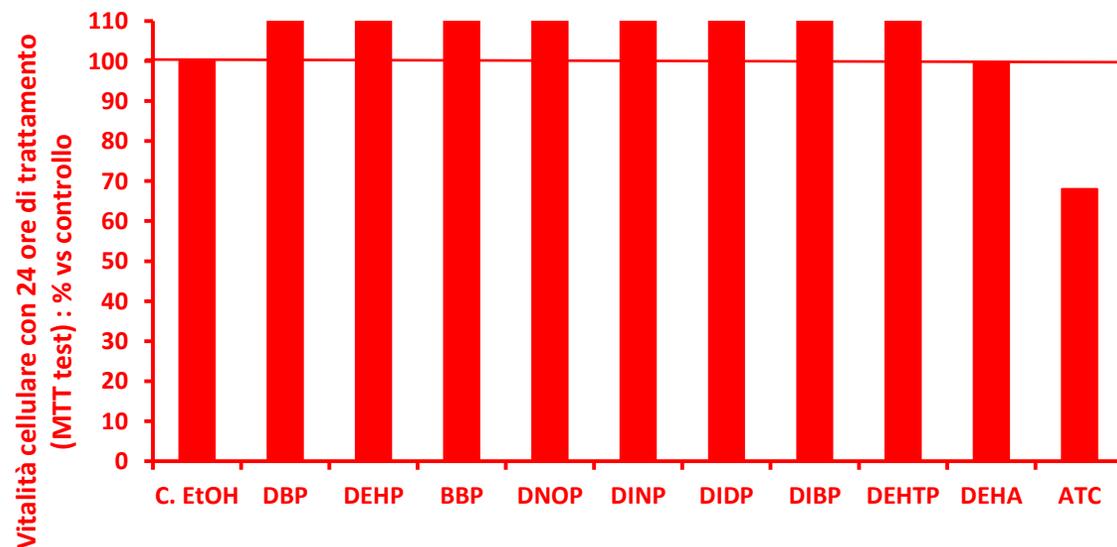


Calibrazione del metodo

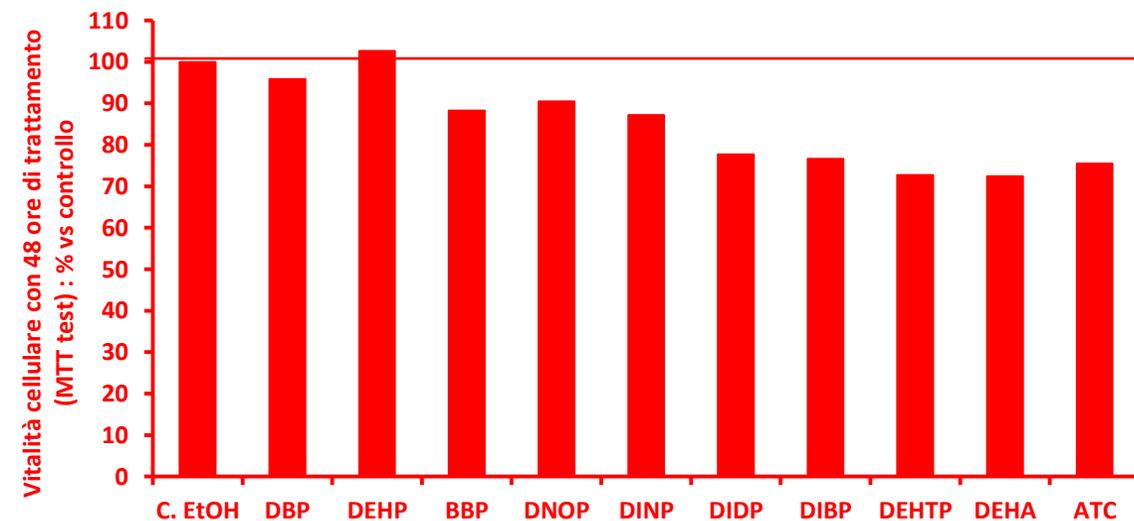
Individuazione della finestra temporale e di concentrazioni per probabili effetti subletali
Vitalità cellulare misurata dopo trattamento con ftalati a concentrazione nota per 24 e 48 ore

- di-butil-ftalato (**DBP**) 1548 ppm,
- di-etil-esil-ftalato (**DEHP**) 1244 ppm,
- di-butil-benzil-ftalato (**BBP**) 1680 ppm,
- di-normal-ottil-ftalato (**DNOP**) 1360 ppm,
- di-iso-nonil-ftalato (**DINP**) 1264 ppm,

- di-iso-decil-ftalato (**DIDP**) 1440 ppm,
- di-iso butil-ftalato (**DIBP**) 1408 ppm,
- di-etil-esil-tereftalato (**DEHTP**) 1292 ppm,
- di-etil-esil-adipato (**DEHA**) 1360 ppm
- acetil-tributil-citrato (**ATC**) 1644 ppm



Cellule RD trattate con soluzioni standard di ftalati



Cellule RD trattate con soluzioni standard di ftalati

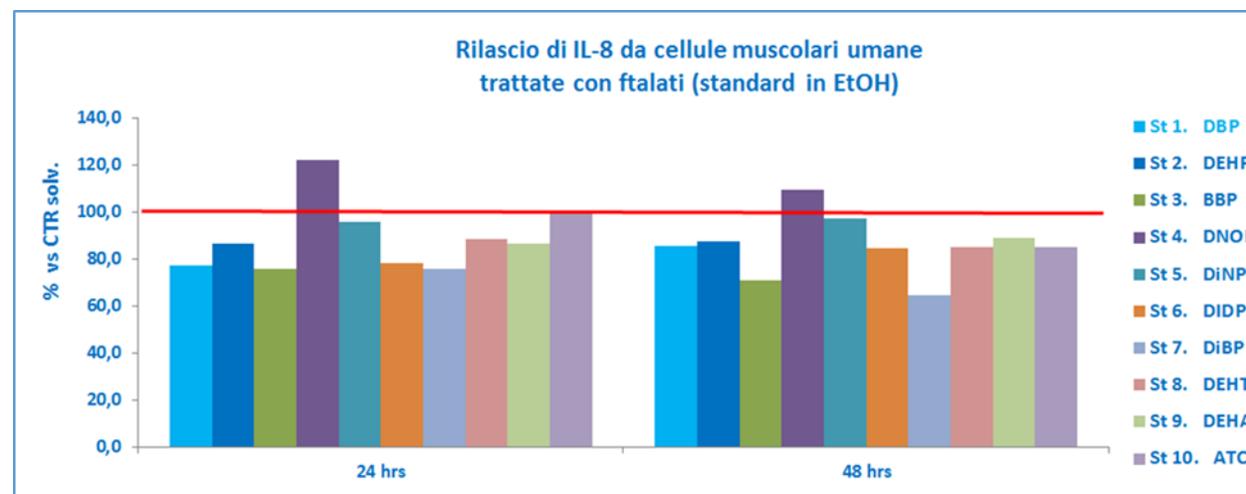
Rilascio di citochine infiammatorie

Quantificazione di citochine infiammatorie eventualmente rilasciate nel terreno con test ELISA

Citochine considerate nello studio

- IL-10
- IL-6
- **IL-8**
- **IL-4**
- IL-13
- IL-18
- **TNF- α**
- **TGF- β 1**
- IL-2
- IL17A
- INF- γ
- sTNF-R
- IL-12p70

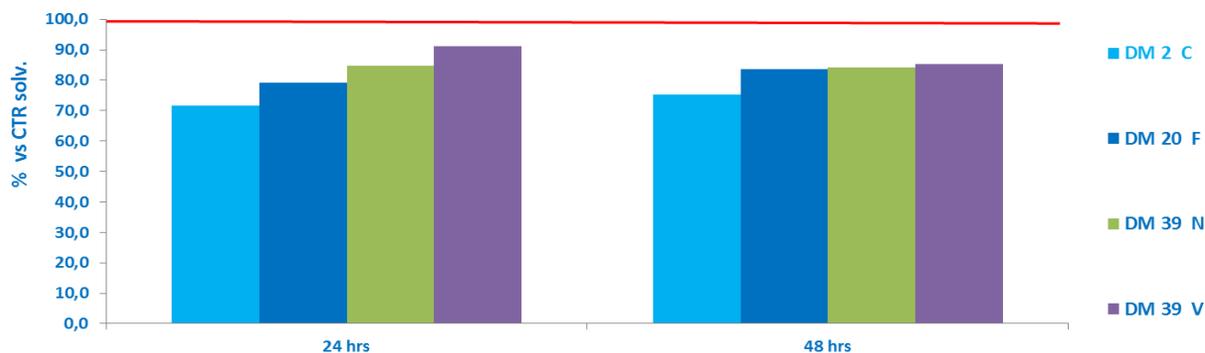
La linea cellulare RD esprime in modo costitutivo 4 delle citochine studiate. Gli effetti osservati indotti dagli ftalati sono riconducibili ad una azione inibitoria. Per IL-4, TNF- α e TGF- β 1 i valori sono troppo bassi e le differenze rispetto al controllo non risultano significative. IL-8 è la citochina più rilevante per gli obiettivi perseguiti.



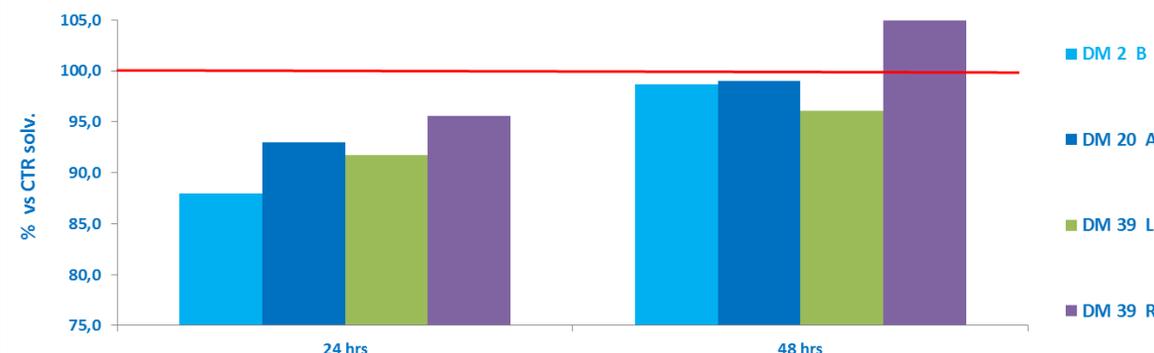
	DBP	DEHP	BBP	DNOP	DINP	DIDP	DIBP	DEHTP	DEHA	ATC
concentrazione nel terreno (ppm)	15.48	12.44	16.80	13.60	12.64	14.40	14.08	12.92	13.60	8.22
% di IL-8 rilasciata. Trattato 24 ore vs CTR	77.2	86.7	75.8	100.0	95.8	78.2	75.8	88.5	86.6	99.1
% di IL-8 rilasciata. Trattato 48 ore vs CTR	85.3	87.3	70.9	100.0	97.0	84.5	64.6	85.2	89.0	85.0

Effetti sul rilascio di IL-8 indotti dagli estratti dei DM

Rilascio di IL-8 da cellule muscolari umane trattate con eluati in EtOH 50%



Rilascio di IL-8 da cellule muscolari umane trattate con eluati in Acido acetico 3%



	DBP *	DEHP *	BBP *	DNOP *	DINP *	DIDP *	DIBP *	DEHP *	DEHA *	ATC *
DM 2 C		63.60								<3.06
DM 20 F	<2.80	<3.19					<2.40	<5.81		
DM 39 N		69.88								
DM 39 V	<2.80	<3.19					<2.40	<2.21		1295.27

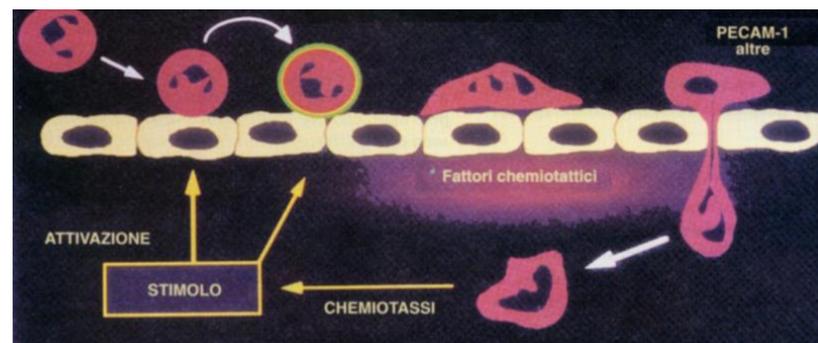
	DBP *	DEHP *	BBP *	DNOP *	DINP *	DIDP *	DIBP *	DEHP *	DEHA *	ATC *
DM 2 B	<2.80	<3.19						<2.40		
DM 20 A	<2.80	<3.19						<2.40		
DM 39 L	<2.80	<3.19						<2.40		
DM 39 R	<2.80							<2.40		64.18

* Concentrazioni espresse in ppm

- **DM 2:** deflussore per infusione intravenosa a gravità con ago epicranico
- **DM 20:** set multi-infusione per chemioterapia
- **DM 39 (N/L):** deflussore semplice
- **DM 39 (V/R):** deflussore semplice con assenza di DEHP dichiarata in etichetta

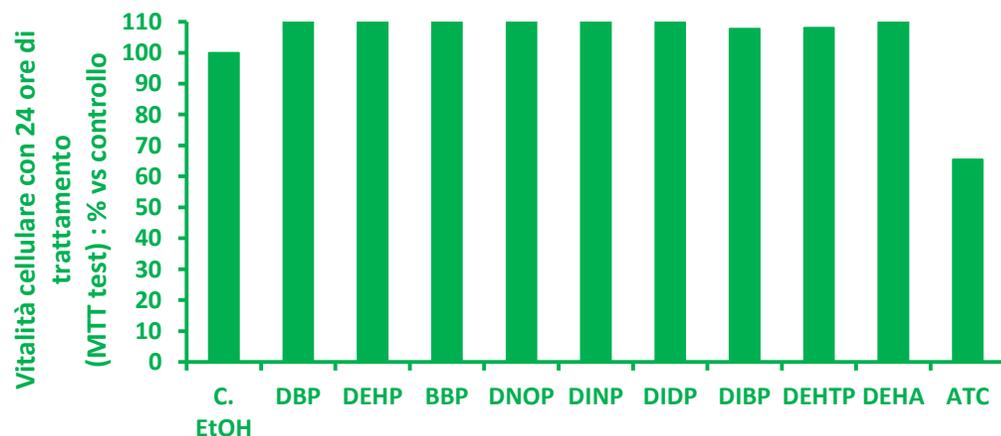
Ruolo di IL-8 nei processi infiammatori

- Importante mediatore della risposta immunitaria innata
- Interviene nel reclutamento dei leucociti nei processi infiammatori
- Induce chemotassi (*fattore chemiotattico per i neutrofili*)
- Recettori presenti in granulociti neutrofili, monociti e cellule endoteliali
- Recettori associati a proteine G la cui attivazione provoca aumento di concentrazione di calcio intracellulare
- Sintesi aumentata da ROS (parametro chiave nell'infiammazione localizzata)



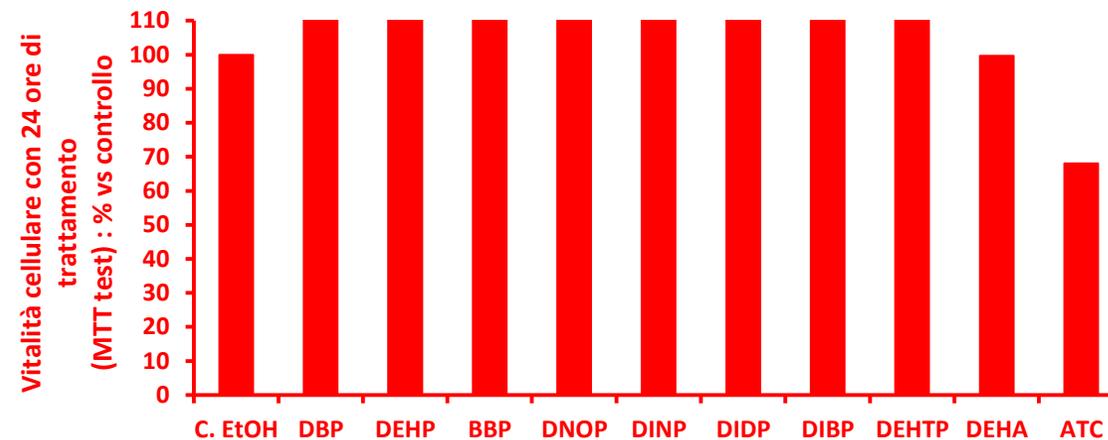
Confronto con i protocolli indicati nella Linea Guida ISO per le prove di biocompatibilità

Vitalità cellulare in fibroblasti murini



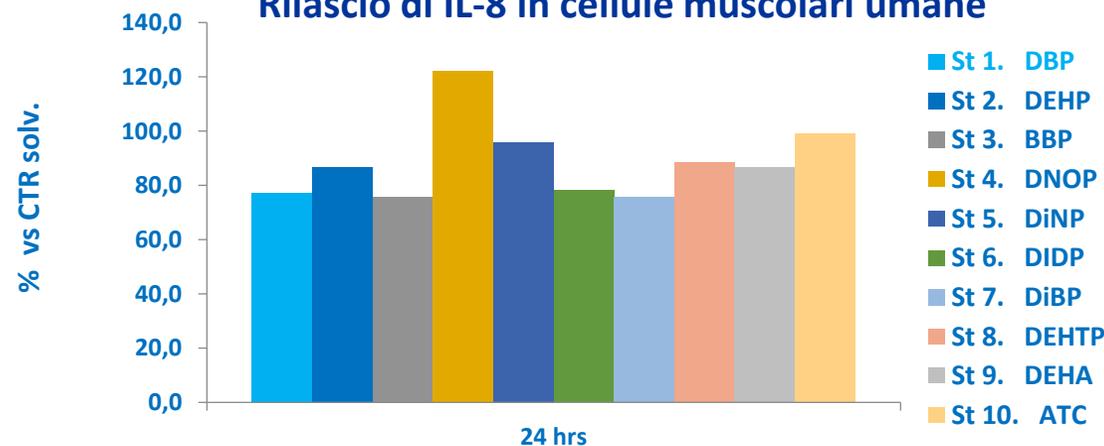
Cellule L929 trattate con soluzioni standard di ftalati

Vitalità cellulare in cellule muscolari umane

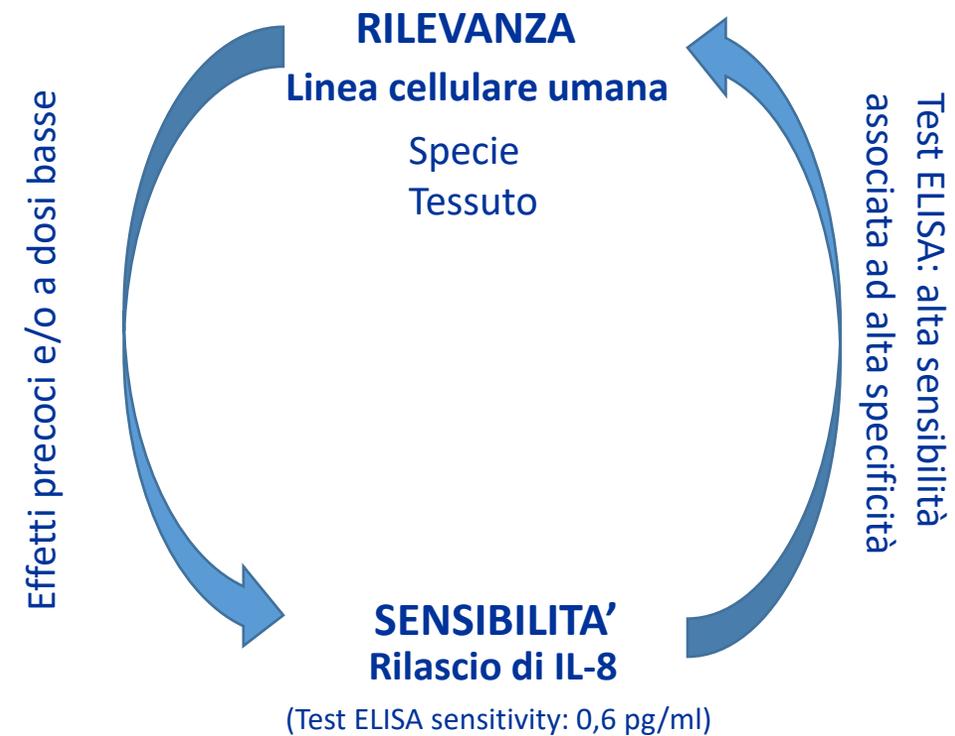
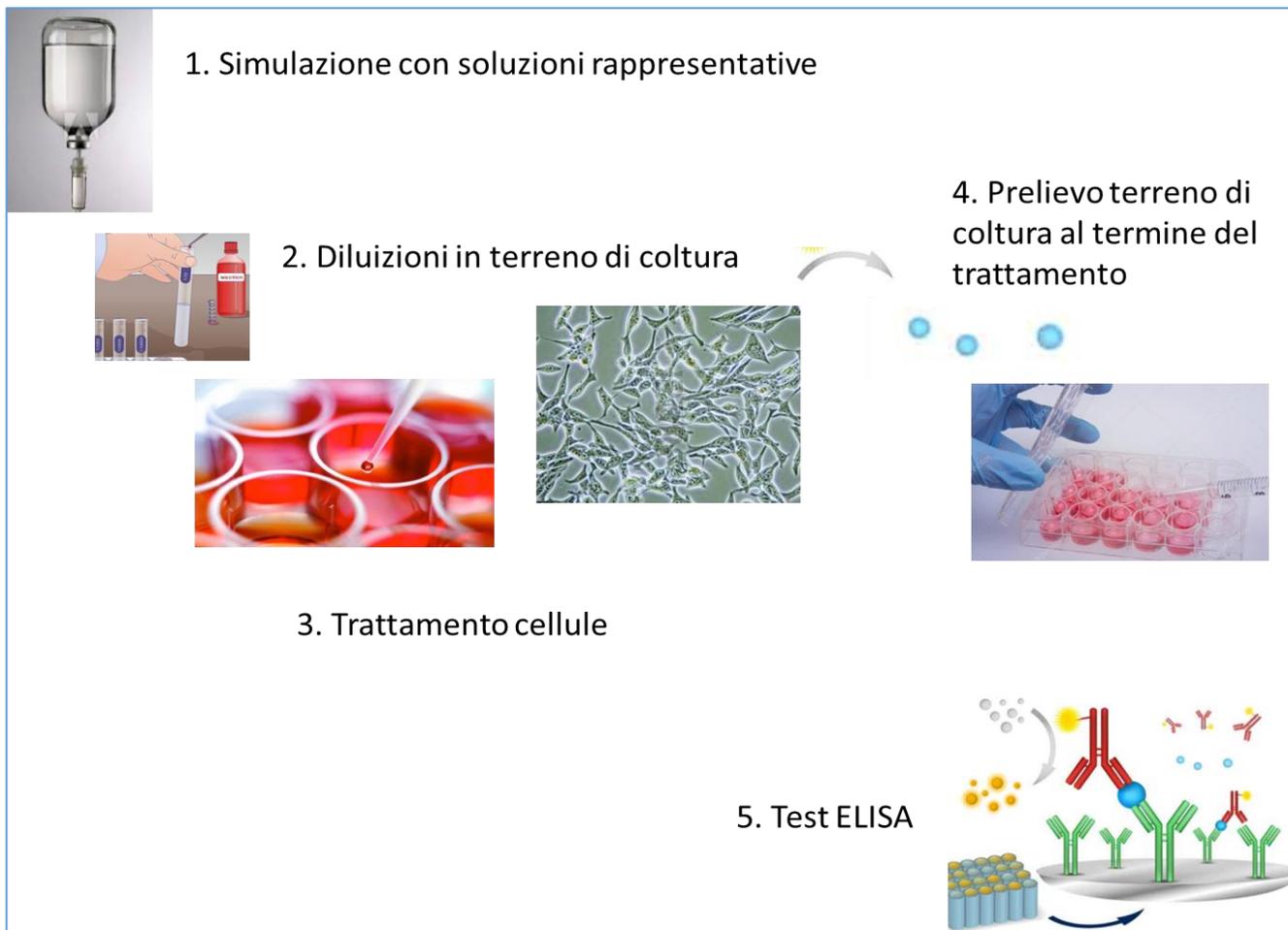


Cellule RD trattate con soluzioni standard di ftalati

Rilascio di IL-8 in cellule muscolari umane



Protocollo sperimentale proposto al fine di migliorare la qualità dei dati di biocompatibilità





19^o Congresso
Nazionale
Società Italiana di Tossicologia

Paracelso nel XXI secolo:
«Dosis sola facit, ut venenum non fit»

BOLOGNA
11-12 Febbraio 2020
Savoia Regency Hotel

GRAZIE!