

# XI CORSO NAZIONALE

SOCIETA' ITALIANA BANCHE DEGLI OCCHI

Imola, 1 Aprile 2017

## UTILIZZO NON CHIRURGICO DELLA MEMBRANA AMNIOTICA

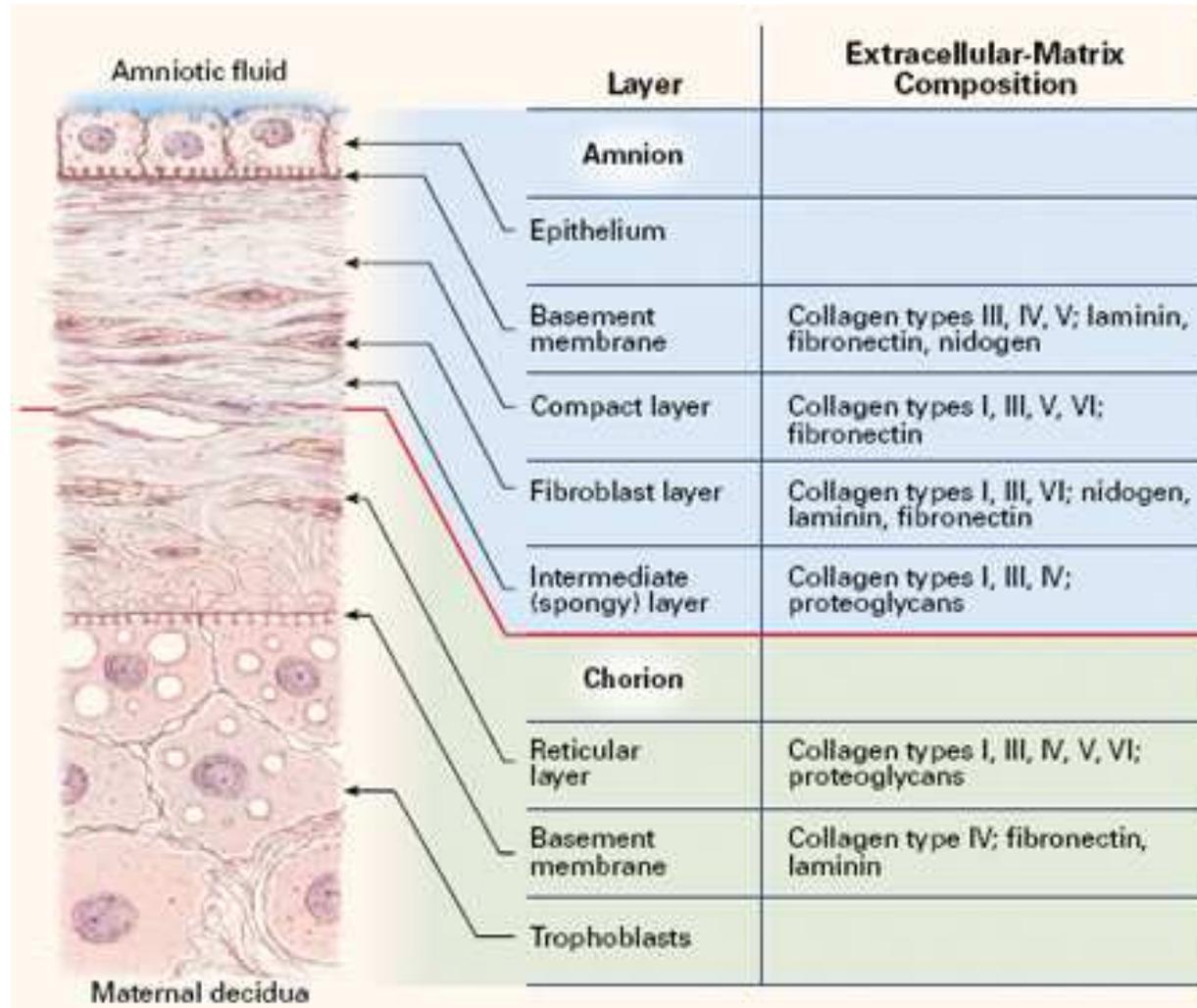
Paola Bonci

Vincenzo Della Valle

Banca delle Cornee di Imola  
UOC Oculistica UsI Imola



# LA MEMBRANA AMNIOTICA





# PROPRIETA' DELLA MEMBRANA AMNIOTICA

- **Anti-infiammatorie:** ↓ IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ; ↑ TIMPs
- **Anticicatrizziali:** ↑TIMPs
- **Antifibrotiche:** ↑TIMPs; ↓ TGF- $\beta$  e TGF- $\beta$  R
- **Antimicrobiche:** barriera meccanica, ↑  $\beta$  defensine
- **Bassa antigenicit :** ↓antigeni HLA A, B, C, DR o  $\beta$ 2 microglobuline
- **Antiangiogeniche:** ↑endostatine e PEDF
- **Pro rigenerative:**

-BM substrato crescita cell epiteliali e mantenimento della polarit  dell'epitelio

-Migrazione e differenziazione cell epiteliali

-Espressione di GF: EGF, KGF,  $\beta$ 1-FGF, HGF

1. Lee SB, Li DQ, Tan DT, Meller DC, Tseng SC. Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000; 20: 325-334
2. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of Interleukin 1 alpha and Interleukin 1 beta in the human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 444-449
3. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001; 20: 408-



## SCOPO

Ottenere ed utilizzare un prodotto derivato dalla membrana amniotica di origine umana, definito “estratto di membrana amniotica”, che conservi le proprietà biologiche della membrana stessa e che possa essere utilizzato ad uso topico in alternativa e/o in affiancamento all’ordinario utilizzo chirurgico della membrana amniotica nelle patologie della superficie corneale.



## 2005 - 1. MEMBRANA AMNIOTICA OMOGENEIZZATA

*Eur J Ophthalmol*. 2005 Jul-Aug;15(4):441-5.

### **Suspension made with amniotic membrane: clinical trial.**

Bonci P, Bonci P, Lia A.

Department of Ophthalmology, Eye Bank, S. Maria della Scaletta Hospital, Imola (BO) - Italy.

#### **Abstract**

**PURPOSE:** To investigate if a suspension made with amniotic membrane could have a beneficial effect on ocular surface diseases.

**METHODS:** In the Imola branch of the Eye Bank of Emilia Romagna, the authors prepared a suspension containing homogenized amniotic membrane previously conserved at -80 degrees Celsius. Subsequently, the authors gave this preparation to 21 patients: 8 had undergone lamellar keratoplasty, 4 had undergone penetrating keratoplasty, 2 had undergone photorefractive keratectomy with a delay of epithelialization, 3 had neurotrophic corneal ulcers, 2 had corneal burning, 1 had torpid corneal ulcer, and 1 had Sjogren syndrome. Each patient had been treated with conventional therapy for at least, 4 months without any clinical improvement. In this sample of eyes the authors evaluated the transparency and integrity of epithelium before and after the therapy by means of a fluorescein staining test, examining the area of epithelial defect as well as the phlogistic situation and the symptoms referred by patients. Nine eyes from this group of patients were studied by impression cytology before and after 3 months of use of suspension. The follow-up was 5 months of once-weekly visits.

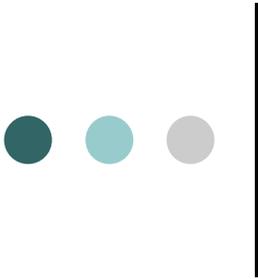
**RESULTS:** In all patients, after 15 to 30 days the corneas became negative to fluorescein staining test and the epithelium seemed more complete and regular. there was an evident decrease of phlogistic situation in the conjunctiva, and an improvement of symptoms was referred by patients. The situation was stable during the whole follow-up. No side effects were noted. The impression cytology repeated 3 months after the treatment showed a significant corneal recovery of the cytologic situation with an important decrease of CK19+ cells on the corneal surface.

**CONCLUSIONS:** This new therapy, which is less traumatic than an implant of amniotic membrane, is safe, and can be repeated for a long period, could help patients with corneal superficial defects.

**Tessuto omogeneizzato (poco manipolato)**

→ efficace

→ criticità: produzione e conservazione



## 2007-2011 - 2. MEMBRANA AMNIOTICA LIOFILIZZATA

Studio clinico “Utilizzo di un estratto di membrana amniotica nelle patologie della superficie oculare“

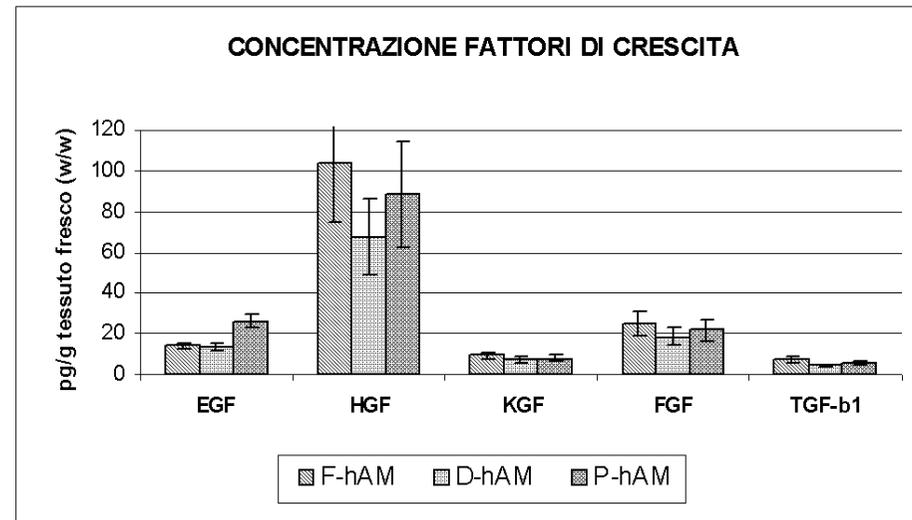
Codice EudraCT (European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials) 2007-002471-14. “Amnicoll 1”

approvato dal Comitato Etico di riferimento con il codice 040/2007/O/Sper in data 17/4/2007

Cfr. Osservatorio Nazionale sulla Sperimentazione Clinica

- Randomizzato
- In doppio cieco

## METODO 2: MEMBRANA AMNIOTICA LIOFILIZZATA



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

**Tessuto liofilizzato (molto manipolato)**

→ facile conservazione

→ criticità: efficacia in patologie di minor rilievo  
complessità nella produzione e distribuzione



## 2011 - 2. MEMBRANA AMNIOTICA LIOFILIZZATA

[Cell Tissue Bank](#). 2012 Jun;13(2):353-61. doi: 10.1007/s10561-011-9261-5. Epub 2011 Jun 18.

### **The effects of different preservation processes on the total protein and growth factor content in a new biological product developed from human amniotic membrane.**

[Russo A](#), [Bonci P](#), [Bonci P](#).

Eye Bank, Department of Ophthalmology, S. Maria della Scaletta Hospital, Via Montericco 4, Imola, Bologna, Italy. [banca.occhi@ausl.imola.bo.it](mailto:banca.occhi@ausl.imola.bo.it)

#### **Abstract**

The aim of this work is to quantify the total protein and growth factors content in a tissue-suspension obtained from processed human amniotic membrane (hAM). hAM was collected, frozen, freeze dried, powdered and sterilized by  $\gamma$ -irradiation. At each step of the process, samples were characterized for the total protein amounts by a Bradford protein assay and for the growth factor concentrations by ELISA test of the tissue suspensions. Frozen-hAM samples show higher release of total proteins and specific growth factors in the tissue suspension in comparison with freeze-dried hAM. We observed that even if the protein extraction is hindered once the tissue is dried, the powdering process allows a greater release in the tissue suspension of total proteins and growth factors after tissue re-solubilization in comparison with only the freeze-drying process ( $+91 \pm 13\%$  for EGF,  $+16 \pm 4\%$  for HGF,  $+11 \pm 5\%$  for FGF,  $+16 \pm 9\%$  for TGF- $\beta$ 1), and a greater release of EGF ( $85 \pm 10\%$ ) in comparison with only the freezing process, because proteins become much readily solubilized in the solution. According with these results, we describe a protocol to obtain a new sterile biological product from hAM tissue, with well-known effects of thermal, mechanical and physical processes on the total protein and grow factors contents.



## 2012 - 3. MEMBRANA AMNIOTICA MINIMAMENTE MANIPOLATA

L'estratto è ottenuto da membrana amniotica

- **MINIMAMENTE MANIPOLATA**

- in accordo con i principi della Good Clinical Practice(GCP) e della Good Manufacturing Practice (GMP).

- approvato dal Centro Nazionale Trapianti come tessuto a manipolazione minima nel 2014

DIRETTIVA 2004/23/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO

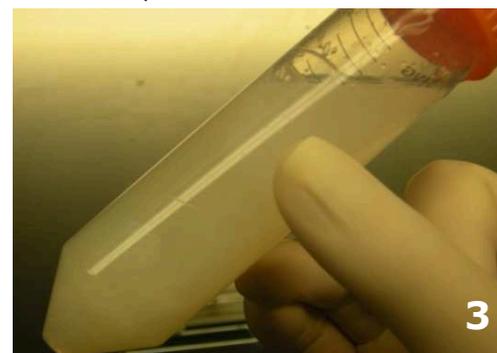
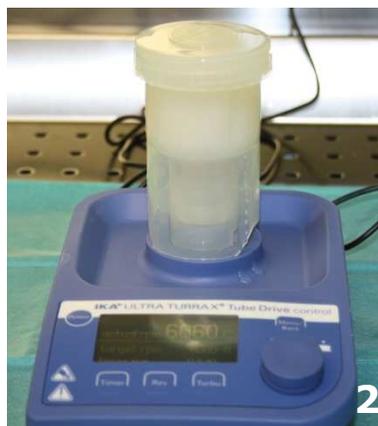
del 31 marzo 2004

sulla definizione di norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani

## METODO: 3. MEMBRANA AMNIOTICA OMOGENEIZZATA

Dopo l'isolamento (1), la membrana amniotica è sottoposta ad una omogeneizzazione tramite omogeneizzatore meccanico (2), in mezzo acquoso, in opportuni rapporti di peso del tessuto/volume.

Alla fine dei cicli di omogeneizzazione, si ottiene una sospensione (3) che viene aliquotata sterilmente in opportune frazioni (4) e congelata alla temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$ , in attesa di essere idoneizzata per l'utilizzo (idoneità del donatore e del tessuto).





**CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA:  
ESAME CITOLOGICO DELL'ESTRATTO DI  
MEMBRANA AMNIOTICA**

**Tecniche speciali adottate:**

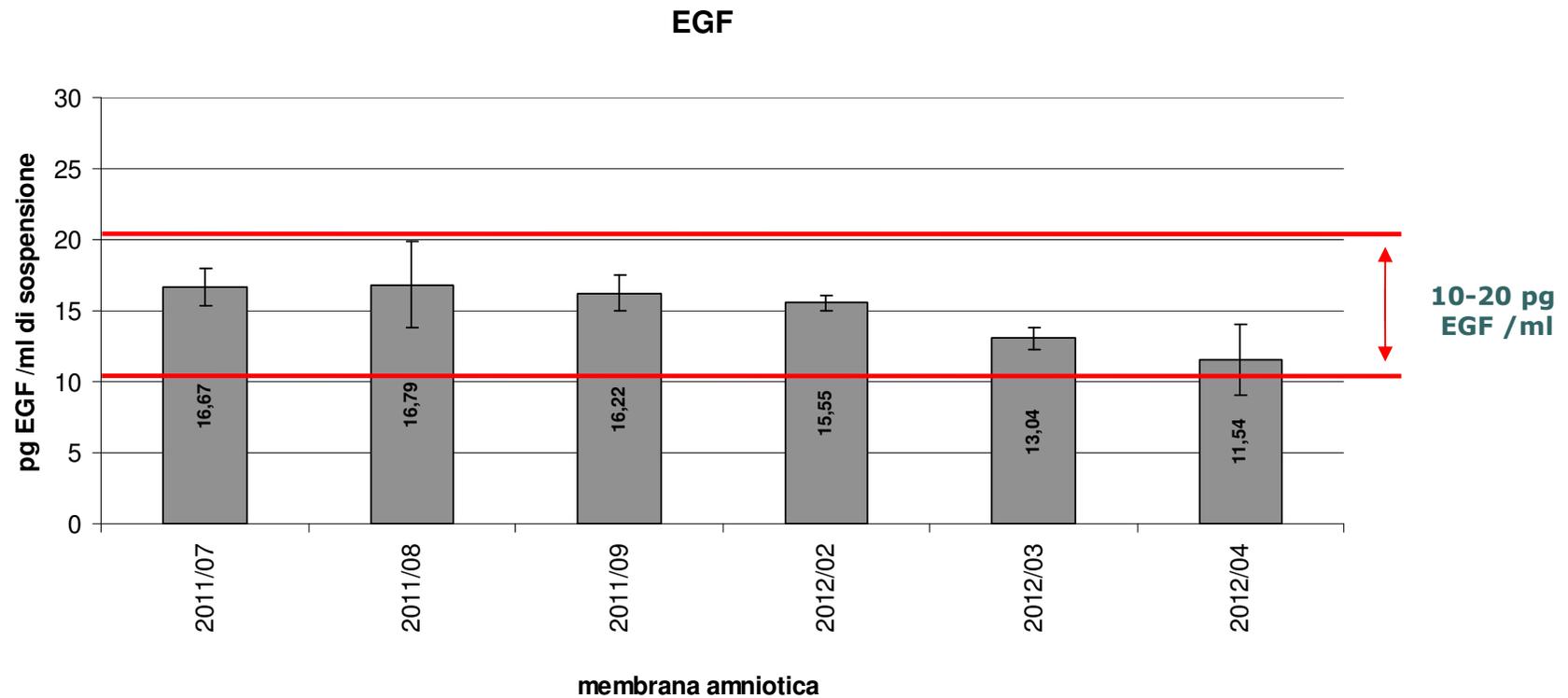
**strato sottile da fase liquida-ThinPrep**

**Referto:**

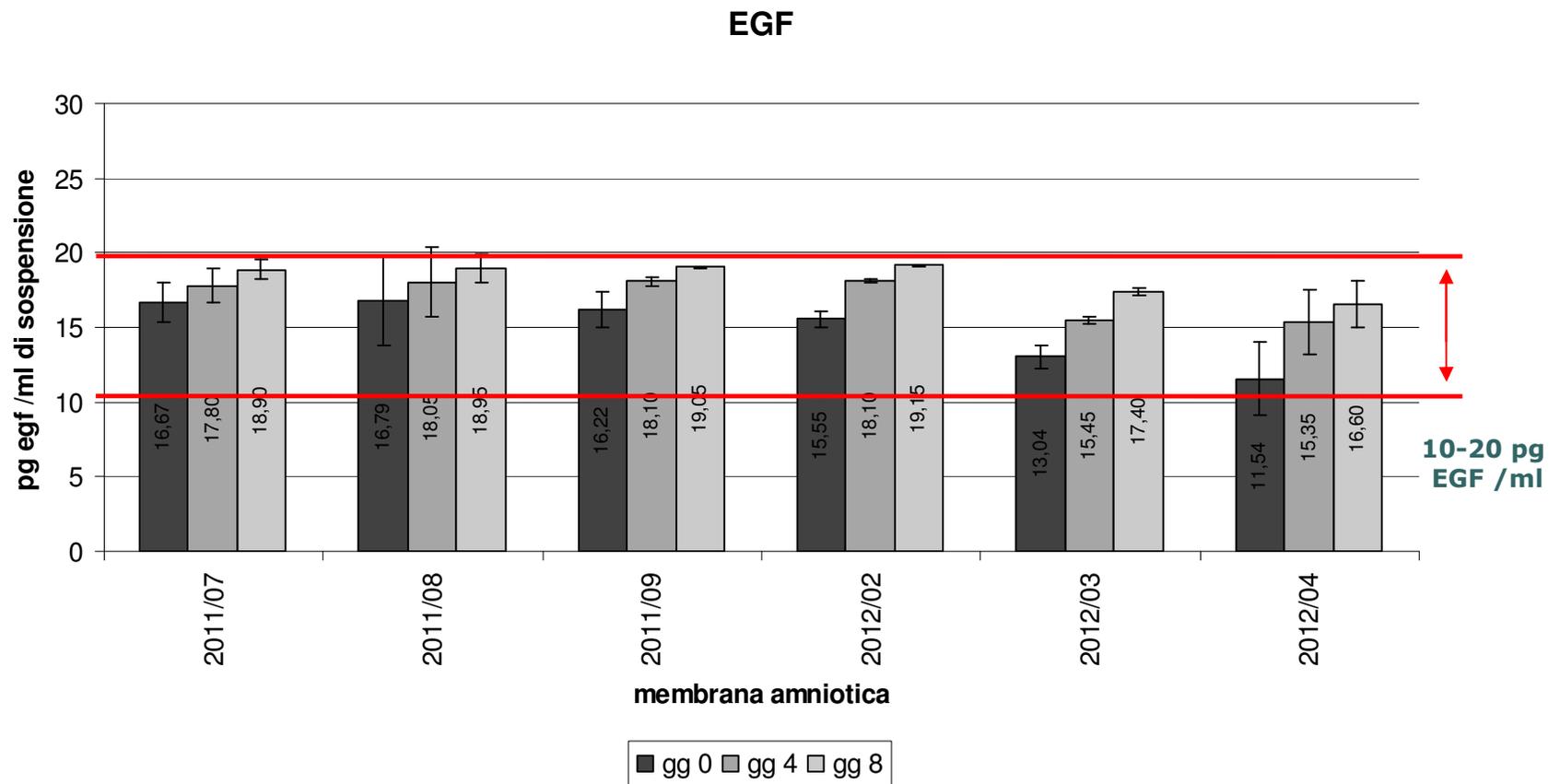
**nel campione citologico in esame si reperta abbondante lisato cellulare; permangono isolati elementi cellulari integri, privi di grossolane atipie.**

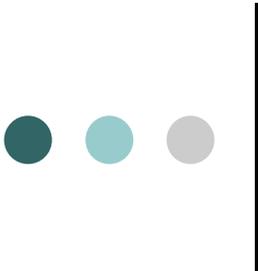


# CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA: QUANTIFICAZIONE EGF (ELISA) NELL'ESTRATTO DI MEMBRANA AMNIOTICA



VALUTAZIONE DELLA STABILITA' BIOLOGICA NEL TEMPO: QUANTIFICAZIONE EGF (ELISA) NELL'ESTRATTO DI MEMBRANA AMNIOTICA NEL TEMPO





## VALUTAZIONE DELLA STABILITA' MICROBIOLOGICA

SOSPENSIONE DI MEMBRANA AMNIOTICA	Colturale aerobi + anaerobi + miceti		
	t=0 gg	t=4 gg	t=8 gg
2011/09/MA20/3D	Neg	Neg	Neg
2011/09/MA20/3E	Neg	Neg	Neg
2011/09/MA20/3F	Neg	Neg	Neg
2011/09/MA20/3G	Neg	Neg	Neg
2012/03/MA16/B7	Neg	Neg	Neg
2012/03/MA16/B8	Neg	Neg	Neg

Data di scadenza del tessuto scongelato: 8 giorni



## ATTIVITA'

- ✓ la realizzazione dell'estratto di membrana amniotica
  - ✓ la sua caratterizzazione biologica
  - ✓ la valutazione della sua stabilità biologica e microbiologica
  
  - ✓ la valutazione clinica ed il monitoraggio
    - della tollerabilità
    - dell'efficacia
- dell'estratto di membrana amniotica somministrata per uso topico

CONSENSO INFORMATO



## TRATTAMENTI

Membrana amniotica omogeneizzata					
Anno	2012	2013	2014	2015	2016
Somministrazioni	97	178	193	336	445
Pazienti	24	24	31	62	71
Tempo medio di terapia per paziente (settimana)	4.0	7.4	6.2	5.4	6.3

**Tollerabilità: nessuna reazione avversa è stata registrata.**



## SCHEMA TERAPEUTICO

1 AMNIOCOLL: 3 mL di membrana amniotica omogeneizzata  
da somministrare 5 volte / giorno per occhio per 7 giorni

1 CICLO : 3 settimane di terapia con 1 boccettina di Amniocoll a settimana  
(totale 3 boccettine)

# 1. DISTOFIA EPITELIALE POST PK

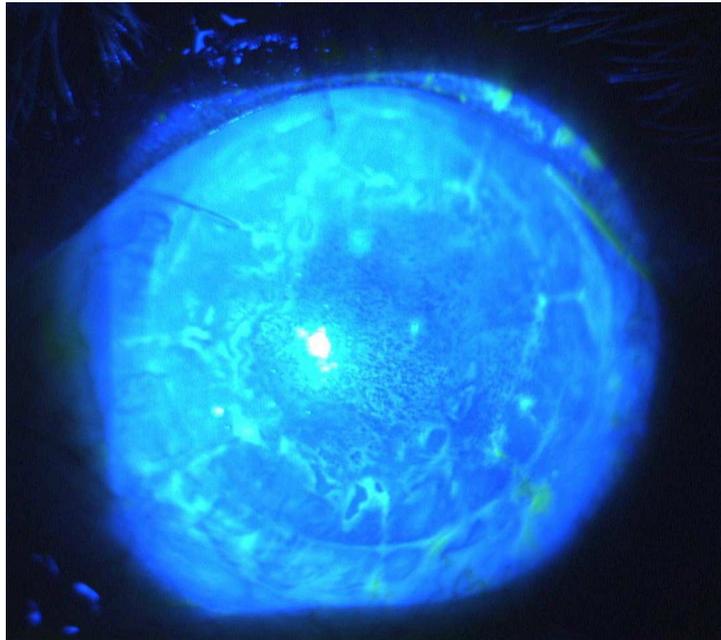
Pz: M, Età: 73 aa

Anamnesi: esiti di trauma perforante della cornea: PK + faco + IOL

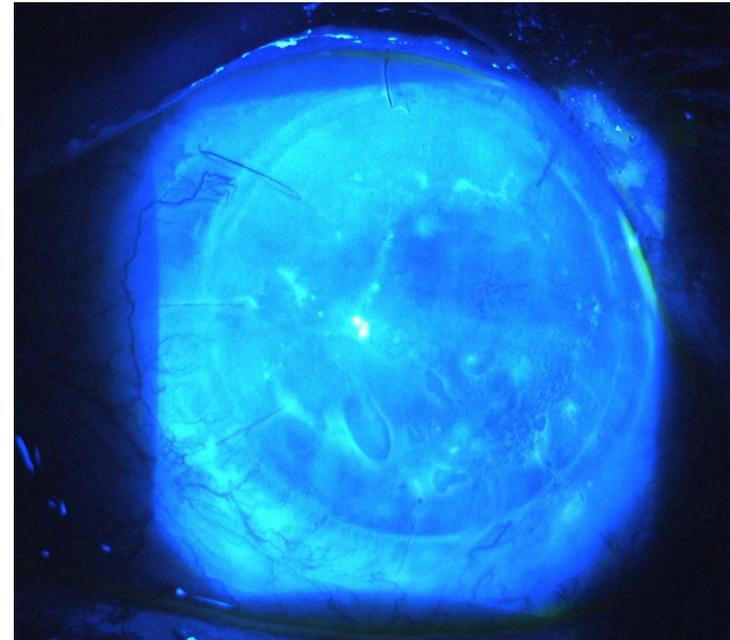
Patologia: distrofia epiteliale post PK

Cicli di AM: 2

Pretrattamento



Dopo 15 gg terapia



## 2. DISEPITELIZZAZIONE CORNEALE IN BOLLOSA

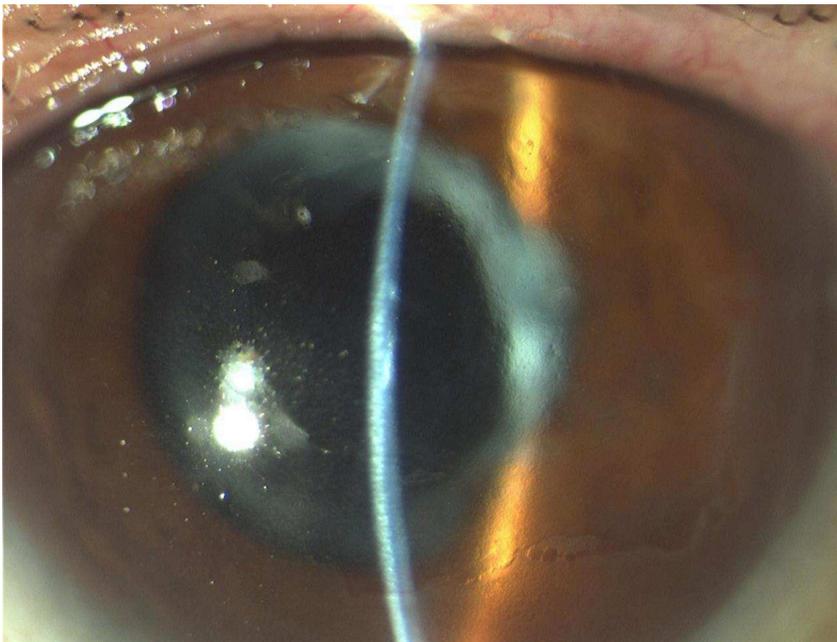
Pz: M, Età: 83 aa

Anamnesi: VPP per pucker maculare + faco + IOL

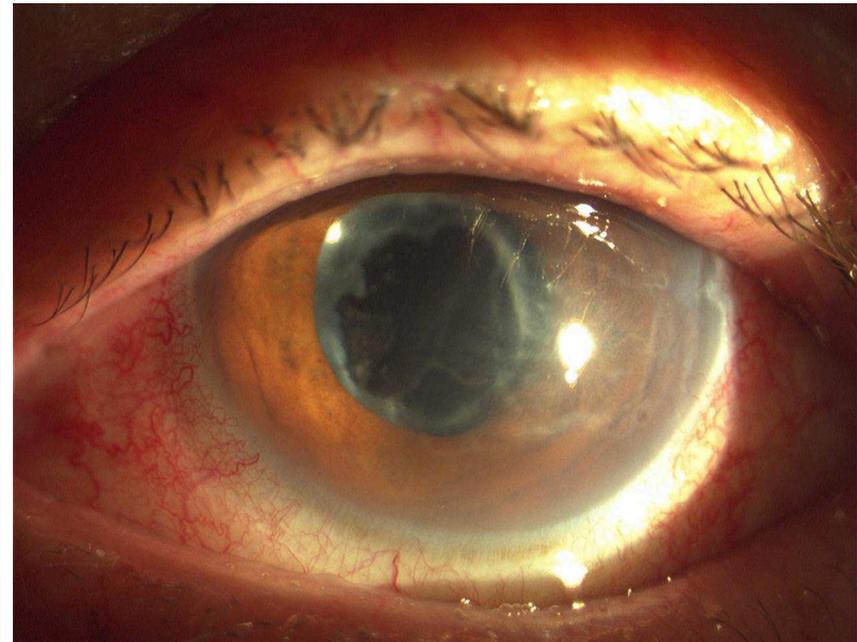
Patologia: cheratopatia bollosa

Cicli di AM: 2

Pretrattamento



Dopo 21 gg terapia



### 3. CHERATITE DA ACNE ROSACEA

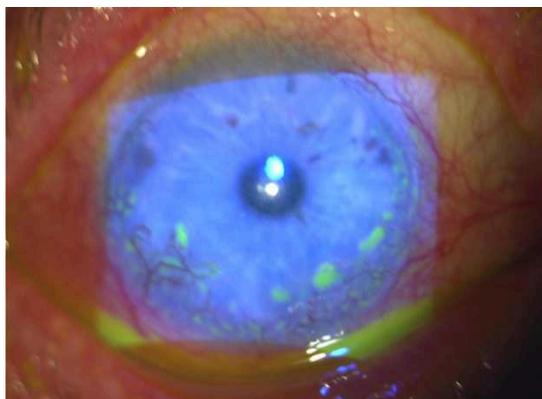
Pz: F, Età: 86 aa

Anamnesi: cheratite da acne rosacea

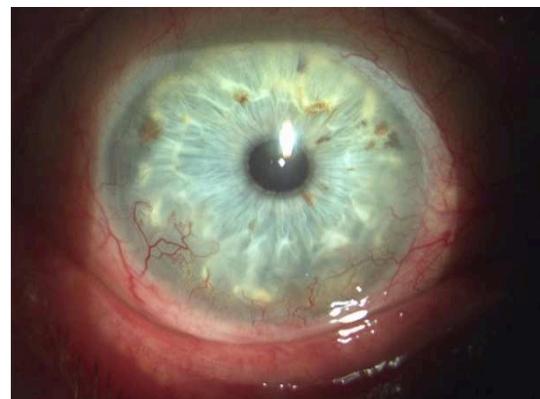
Patologia: cheratite da acne rosacea con neovascolarizzazione perilimbare e flogosi severa

Cicli di AM: 2

Pretrattamento



Dopo 7 gg terapia



Dopo 14 gg terapia





## 4. ULCERA CORNEALE CENTRALE

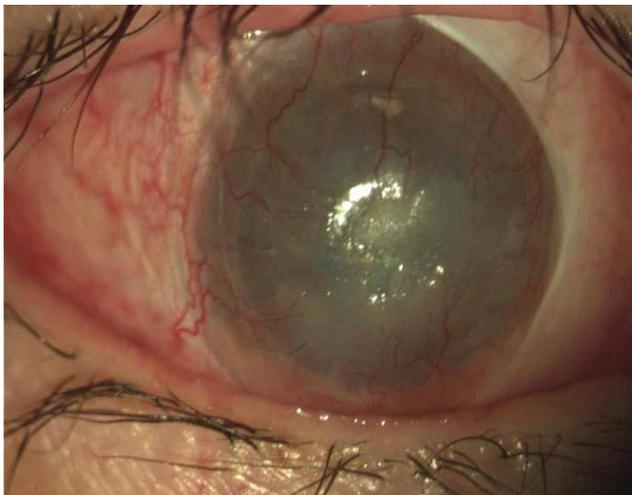
Pz: F, Età: 35 aa

Anamnesi: cheratite neurotrofica, esiti di LK

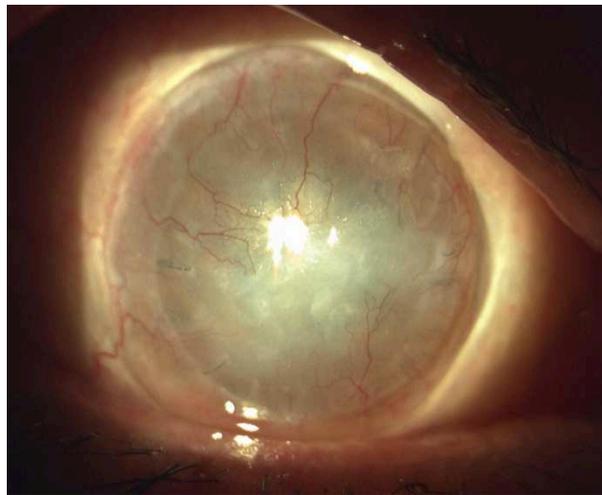
Patologia: ulcera corneale centrale

Cicli di AM: 3

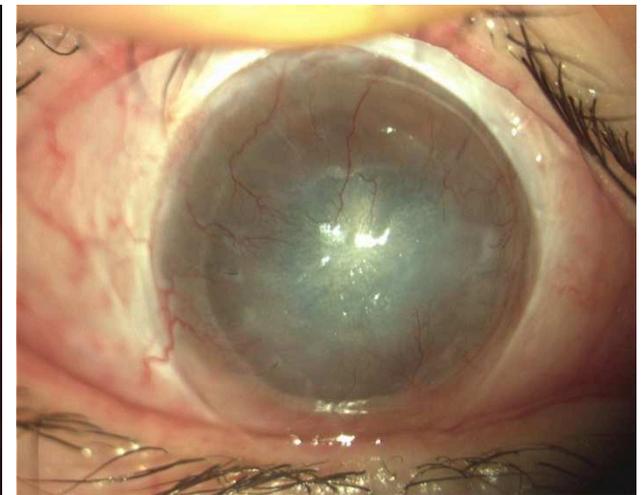
Pretrattamento



Dopo 21 gg terapia



Dopo 2 mesi terapia



## 5. EROSIONI EPITELIALI RECIDIVANTI

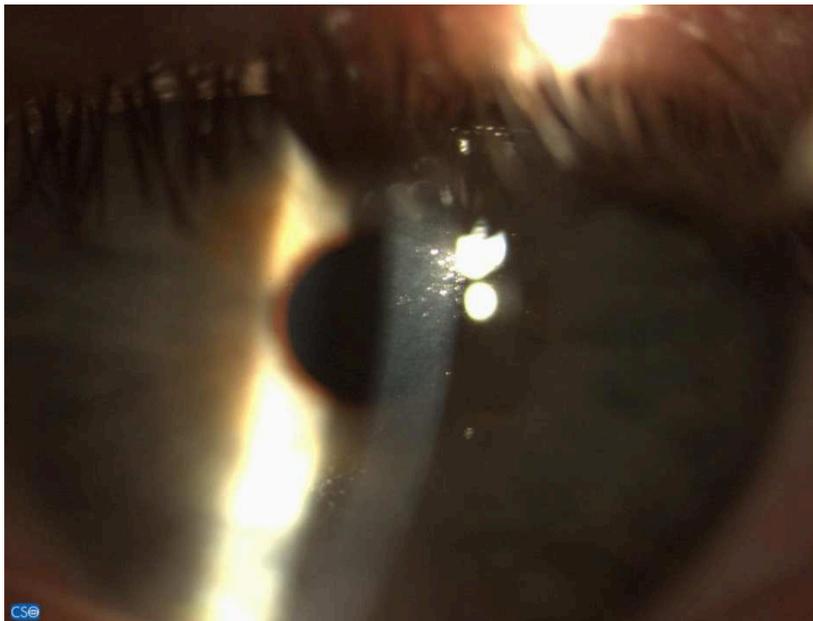
Pz: M, Età: 30 aa

Anamnesi: rimozione corpo estraneo di origine vegetale

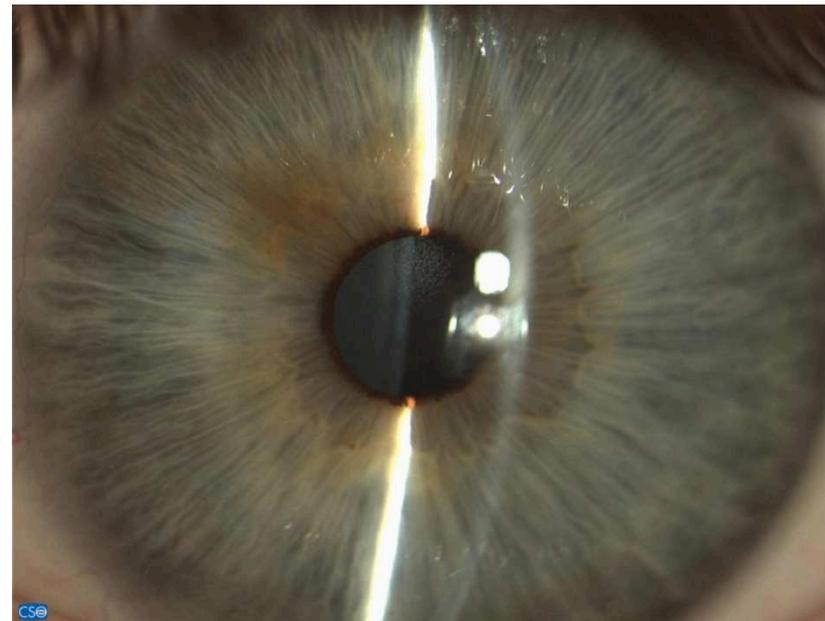
Patologia: erosioni epiteliali recidivanti

Cicli di AM: 1

Pretrattamento



Dopo 14 gg terapia



## 6. CHERATITE PUNTATA

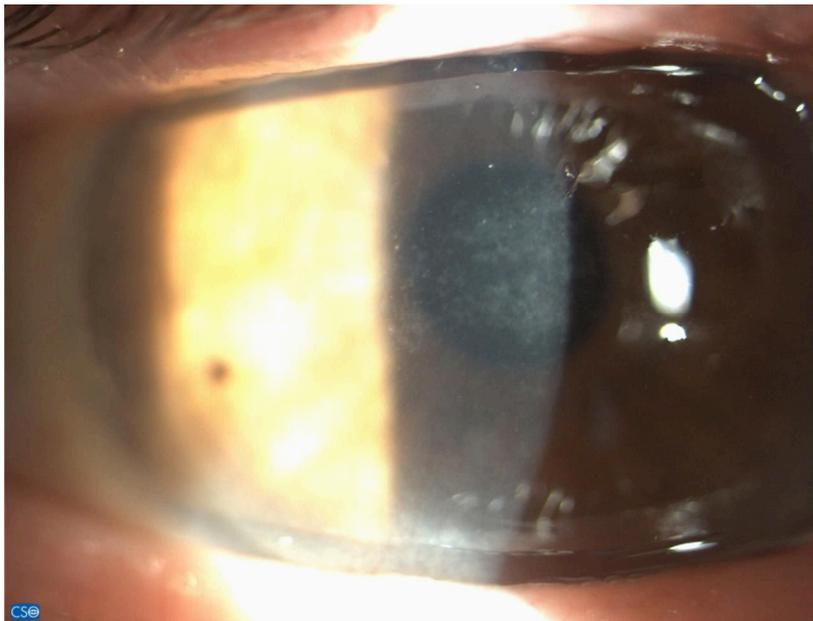
Pz: F, Età: 70 aa

Anamnesi: trabeculectomia con inserto, sindrome secca

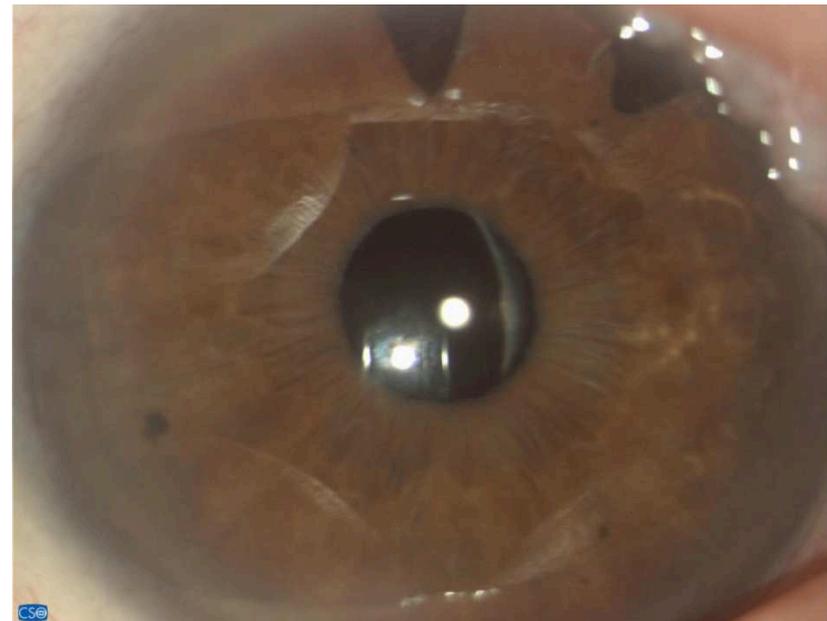
Patologia: cheratite puntata

Cicli di AM: 2

Pretrattamento



Dopo 21 gg terapia



## 7. ULCERA CORNEALE IN ESITI DI PK

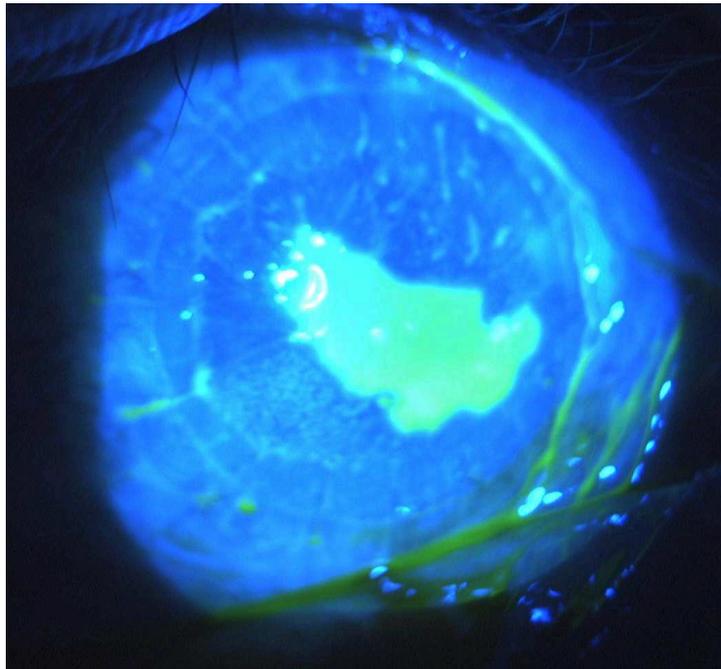
Pz: M, Età: 56 aa

Anamnesi: PK per trauma

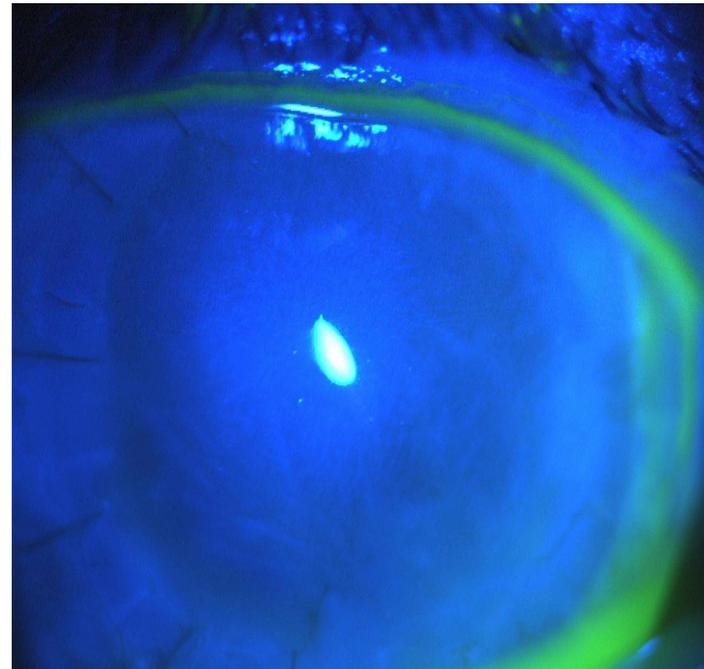
Patologia: ulcera corneale in esiti di PK

Cicli di AM: 3

Pretrattamento



Dopo 3 cicli di terapia



## 8. EROSIONE CORNEALE PERILIMBARE PROFONDA

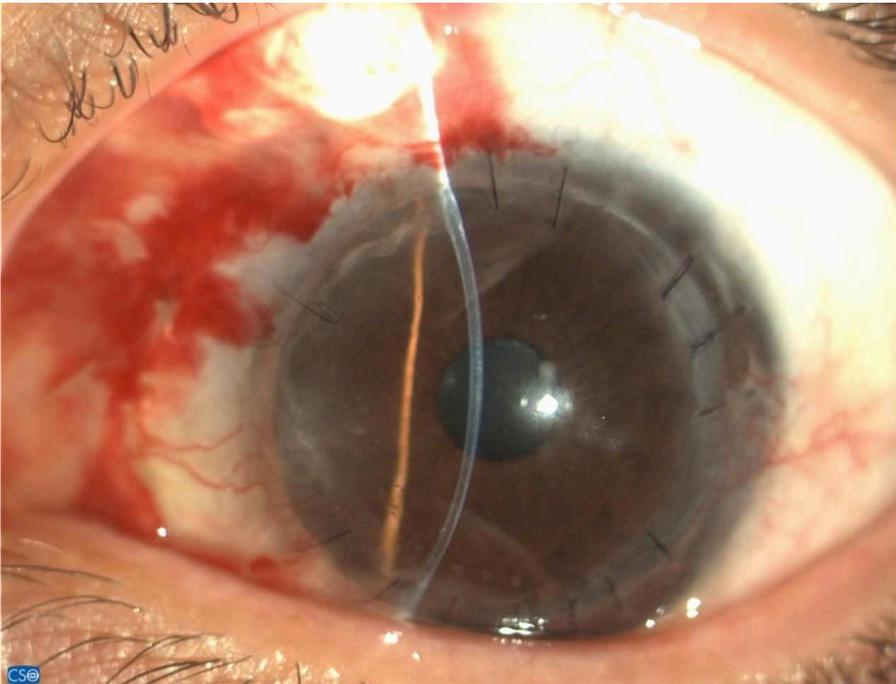
Pz: F, Età: 41 aa

Anamnesi: operata di LK su grave pterigio invasivo con interessamento del centro corneale

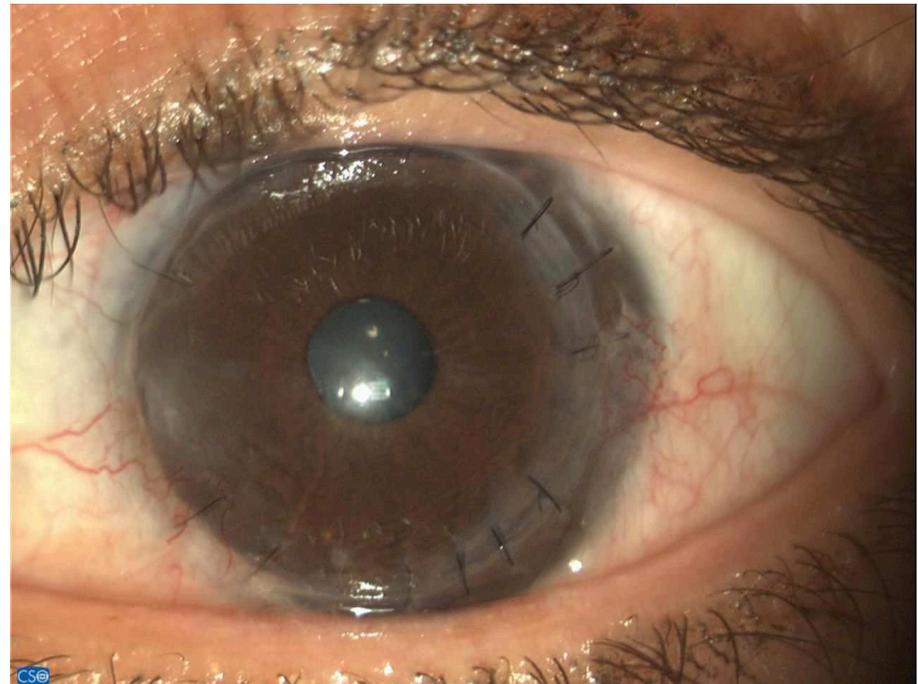
Patologia: erosione corneale profonda paralimbare temporale, sofferenza epiteliale diffusa, quadro flogistico

Cicli di AM: 2

Pretrattamento



Dopo 21 gg terapia





## 9. CAUSTICAZIONE CORNEALE DA ALCALI

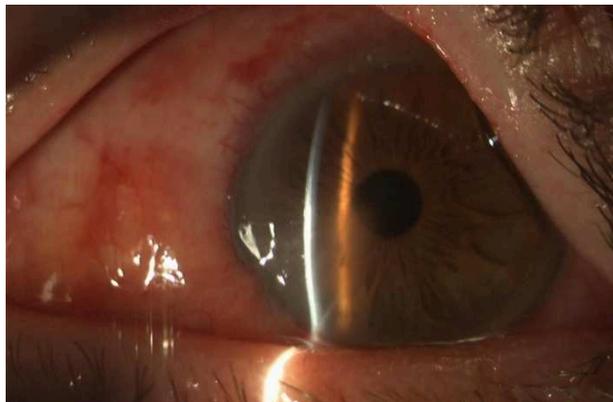
Pz: M, Età: 36 aa

Anamnesi: grave causticazione corneale da alcali

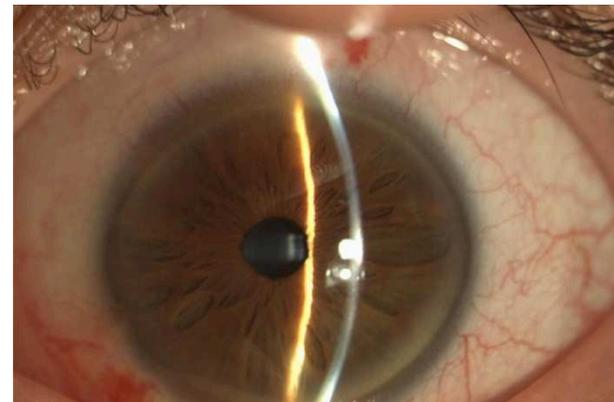
Patologia: causticazione corneale di grado 3 (totale disepitelizzazione corneale con congiuntiva ischemica su 360°);

Cicli di AM: 2

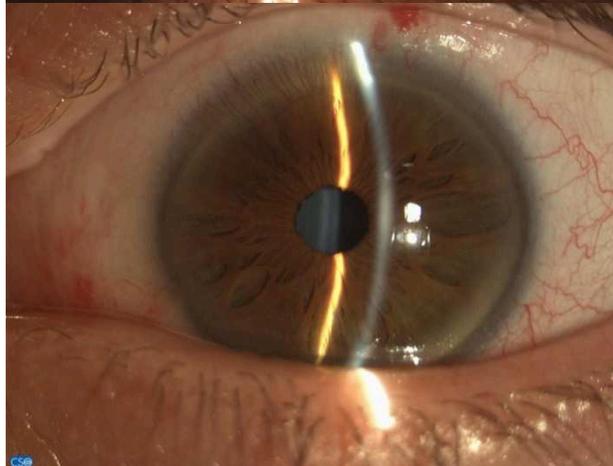
Dopo 7 gg  
terapia



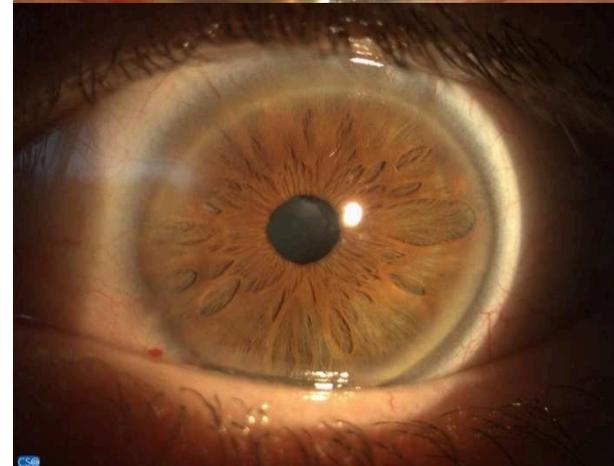
Dopo 21 gg  
terapia



Dopo 14 gg  
terapia



Dopo II ciclo  
di terapia





## 10. GRAVE RITARDO DI RIEPITIZZAZIONE POST PRK

Pz: M, Età: 29 aa

Anamnesi: PRK miopica

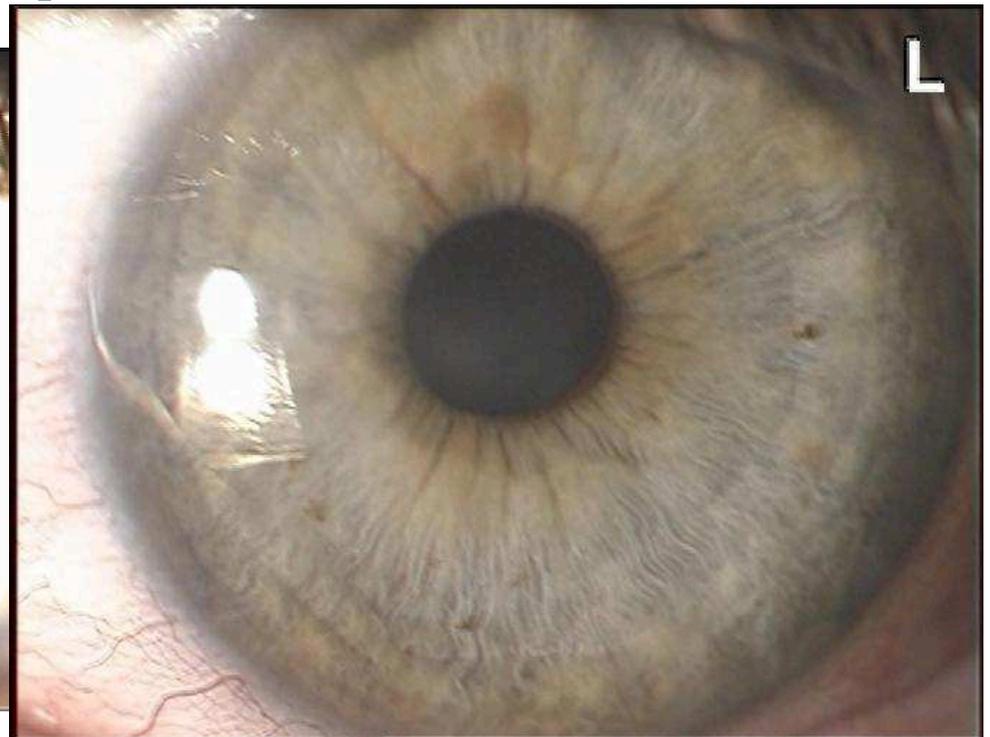
Patologia: grave ritardo di riepitelizzazione

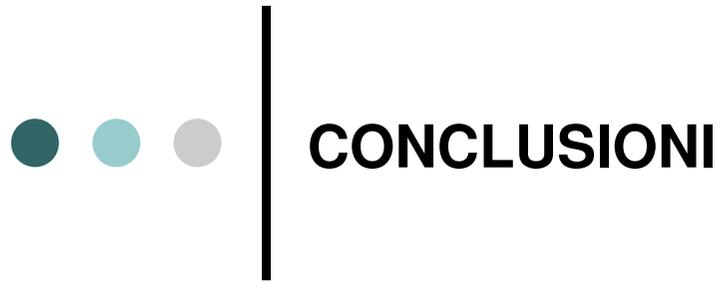
Cicli di AM: 1

Dopo 7 gg di terapia

Dopo 14 gg di terapia

Pretrattamento





## CONCLUSIONI

### TAKE HOME MESSAGE

Amniocoll is a new therapeutic option:

- safe & effective
- usefull for long-term treatment or for periodic protocol therapy

# XI CORSO NAZIONALE

SOCIETA' ITALIANA BANCHE DEGLI OCCHI

Imola, 1 Aprile 2017

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Si ringraziano:  
Francesca Nasciuti  
Alessandra Russo  
Paolo Bonci

Banca delle Cornee di Imola  
UOC Oculistica UsI Imola

 **SIBO**  
Società Italiana Banche degli Occhi