



REVIEW  **sull'impiego**
della membrana amniotica

M. Corneli

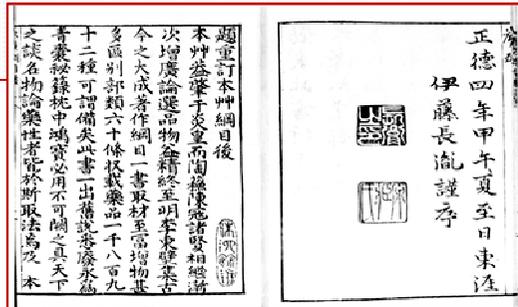
Banca degli Occhi della Regione Marche

Imola, 1 Aprile 2017



Nascere con la camicia...

Introduzione



Li Shi-Zen

Genital reconstructive surgery

1970's-1990's
Various surgical applications: reconstructive surgery (genital and abdominal), prevention of adhesions, ulcers, burns, etc

Skin grafting

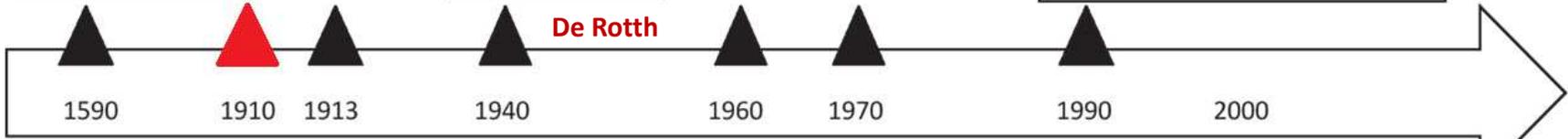
Davis

Compendium of Materia Medica

Ophthalmology: Conjunctival defects

Preparation and sterilization procedures

Ocular repair and other ophthalmologic disorders such as burn treatment, conjunctival reconstruction, etc



De Roth

Fetal membranes/amniotic membrane

Cells from different placental regions



Introduzione

- I recettori sono presenti nei tessuti, acido, l'infiammazione

Azione
riepitelizzante

Azione
antinfiammatoria

- I canali ionici sono presenti nei tessuti, avere, venire

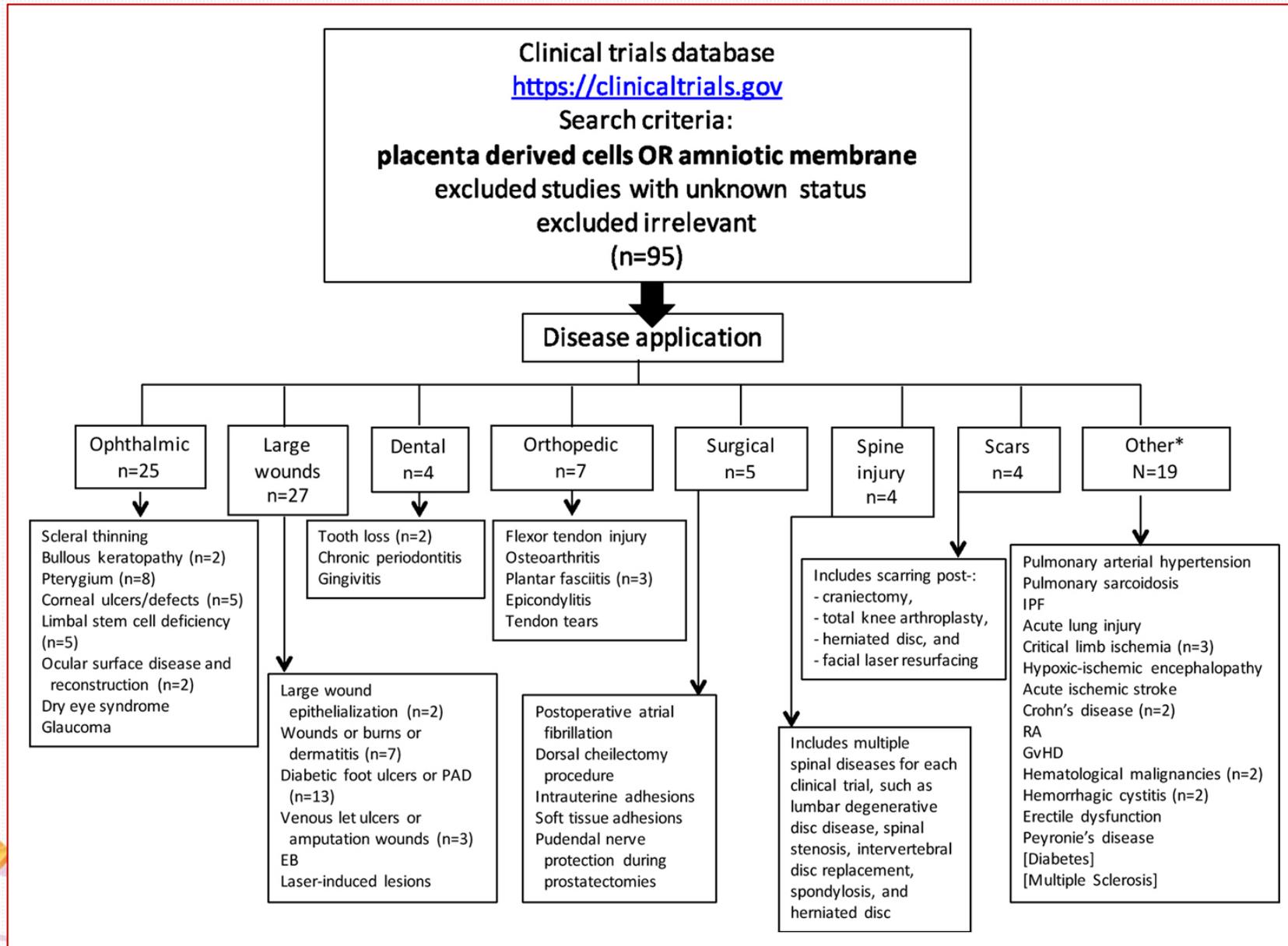


Azione
antifibrotica

Azione
antimicrobica



Trial clinici – U.S. National Institutes of Health



Trial clinici – U.S. National Institutes of Health

important in underlining the safety of placental cells in treating patients with multiple sclerosis, and encourages future studies to investigate therapeutic benefit in this physical and mental disabling condition.

PDA002 cells are currently being tested for the treatment of patients with diabetic foot ulcers and peripheral arterial disease (NCT01859117, active; NCT02460081, recruiting; NCT02264288, recruiting) (Table 2). Human placenta-derived stem cells (HPDSC, also produced by Celgene Cellular Therapeutics) are obtained from placenta perfusion after removal non-viable and red blood cells and tissue debris. These cells are cryopreserved without culture expansion (Kang et al., 2013). HPDSC will soon be investigated for treating neonates with severe hypoxic-ischemic encephalopathy (NCT02434965, not yet recruiting), and patients with hematological malignancies (NCT00596999, enrolling; NCT01586455, recruiting) (Table 5).

Placental-derived MSC are isolated from the placental tissues after the removal of umbilical cord and external membranes by enzymatic digestions (Prince Charles Hospital in Brisbane, Australia) (Brooke et al., 2009). The safety of placental-derived MSC has been studied in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPE, NCT01385644, completed). The results of this study have recently been published and show that intravenous infusion of 2 million cells per kilogram is safe in patients with moderate to severe IPE. Of note, the possibility of embolization of cells in the compromised pulmonary vascular bed, a major concern during this type of treatment, did not lead to major adverse clinical outcomes. Only minor, transient changes in hemodynamics and gas exchange, and only minor adverse events were observed (Chambers et al., 2014).

Placenta-derived decidual stromal cells can be isolated by either trypsin digestion or tissue explants (Karolinska Institutet, Sweden). These cells derive from the decidua parietalis and are of maternal origin (Ringden et al., 2013; Erkers et al., 2015).

2015), showing improved healing of blisters and wounds, but at the same time warranting further investigations on the immunogenicity of these cells.

Notably, other clinical trials have and are currently investigating placental cell derivatives and, in particular *amnion-derived cellular cytokine solution (ACCS)* (Stemnion, Inc., Pittsburgh, PA, USA). ACCS is obtained from amniotic cell culture (Bergmann et al., 2009), and contains factors relevant for wound healing, such as platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), angiogenin, TGF- β 2, TIMP-1, and TIMP-2 (Steed et al., 2008). It is currently being tested in patients with radiation-induced dermatitis (NCT01714973, active), and a separate trial is due to begin in patients with UV-induced burns (NCT02389777, not yet recruiting), (Table 2). Moreover, other trials are currently recruiting patients to test ACCS in dry eye syndrome (NCT02369861, recruiting, Table 1), and gingivitis (NCT02071199, recruiting, Table 3). Two trials, the first aimed at investigating ACCS in partial thickness wounds (NCT00886470), and the second in patients with deep burns (NCT01715012), were terminated due to difficulties in enrolling patients (Table 2).

Another placenta-derived product, amniotic membrane extract (AMX), which is based on lyophilized human AM for topical application, is under investigation in persistent corneal epithelial defects and has shown promising results for reducing epithelial defects (Kordić et al., 2013).

MECHANISMS OF ACTION: THE QUEST FOR SCIENTIFIC RATIONALE

Evidence of long-term survival with no signs of immune reaction was provided many years ago when the AM was used as an allograft under skin (Douglas et al., 1954) or in the peritoneal cavity



Conservazione ed impiego

■ Tessuto "fresco":

- mantenuto in soluzione CPTES (corneal-potassium-TES) + condroitina solfato;
- conservato a 4°C;
- utilizzato come tale.

■ Tessuto congelato:

- mantenuto in soluzione contenente glicerolo (agente crioprotettivo);
- conservato a -80°C;
- utilizzato dopo scongelamento.

■ Tessuto criocongelato:

- mantenuto in soluzione contenente DMSO (agente crioprotettivo);
- conservato a -160°C;
- utilizzato dopo scongelamento.



Conservazione ed impiego

■ Tessuto disidratato:

- disidratato sotto un flusso d'aria sterile o con gel di silice a temperatura ambiente;
- conservato a temperatura ambiente;
- utilizzato come tale o reidratato.

■ Tessuto liofilizzato ed irradiato:

- Liofilizzato a -60°C sotto vuoto ed irradiato con raggi γ a 25KGray;
- conservato a temperatura ambiente;
- utilizzato come tale o reidratato.



Patch vs Graft

■ Patch (bendaggio):

- l'epitelio è rivolto verso il fondo della lesione;
- lo stroma da un lato intrappola le cellule flogistiche dell'ospite, grazie al fenomeno dell'assorbimento, e dall'altro rilascia i fattori specifici responsabili delle sue peculiari proprietà.

■ Graft (ricostruzione):

- lo stroma è rivolto verso il fondo della lesione;
- l'epitelio, grazie al fenomeno dell'integrazione, viene ricoperto dalle cellule corneali e/o congiuntivali dell'ospite.



Preparati

■ Tessuto omogeneizzato:

- sonicato a temperatura controllata e centrifugato;
- conservato a -80°C ;
- utilizzato dopo scongelamento tramite iniezione o per uso topico.

■ Tessuto polverizzato ($\varnothing \sim 100\mu\text{m}$):

- congelato, liofilizzato, polverizzato e γ -irradiato ;
- conservato a temperatura ambiente;
- utilizzato dopo risospensione per uso topico.

■ Tessuto micronizzato ($\varnothing \sim 1-10\mu\text{m}$):

- congelato, liofilizzato, micronizzato e γ -irradiato;
- conservato a temperatura ambiente;
- utilizzato come tale o dopo risospensione tramite iniezione o per uso topico.



Questionario



**Do you...
remember?**



**QUESTIONARIO PER CORSO SIBO DI IMOLA
PROCESSAZIONE DELLA MEMBRANA AMNIOTICA**

Denominazione della Banca:

ATTIVITÀ	La Banca processa membrane amniotiche?	
	Sotto quale forma vengono distribuite? <i>(Patch di tessuto tal quale, patch di tessuto disidratato, patch di tessuto liofilizzato, collirio...)</i>	
	Quali sono le dimensioni dei patch prodotti?	
	Quali sono le Specialità chirurgiche richiedenti? <i>(Se possibile riportare anche approssimativamente in quale percentuale)</i> <i>(Per ogni Specialità chirurgica indicare se l'effetto evocato è soddisfacente, indifferente o non soddisfacente)</i>	
	L'attività trapiantologica è in crescita, stabile o in calo? <i>(Sia in senso globale che per Specialità chirurgica)</i>	
	Secondo Voi, qual è l'effetto più evidente della membrana amniotica?	
	Sono stati registrati eventi avversi correlati all'applicazione del tessuto?	
La Banca svolge attività di ricerca e sviluppo su questo tessuto?		
DECONTAMINAZIONE	Durante la processazione si impiegano soluzioni decontaminanti?	
	Se sì, quali sono i principi attivi presenti nelle soluzioni decontaminanti?	
	Se sì, a quale temperatura e per quanto tempo i patch vengono lasciati a contatto con le soluzioni decontaminanti?	
CONSERVAZIONE	Come vengono conservati i tessuti processati? <i>(Temperatura, durata della conservazione, agente protettivo eventualmente impiegato)</i>	
VITALITÀ	Viene eseguito un test di vitalità cellulare?	
	Se sì, quale tipo di test?	
MICROBIOLOGIA	Quanti e quali tipi di test microbiologici vengono eseguiti durante la fase di processazione pre-conservazione?	
	Quanti e quali tipi di test microbiologici vengono eseguiti durante la fase di processazione post-conservazione?	

N.B.: restituire un solo questionario per ogni Banca, anche nel caso in cui non vengano processate membrane amniotiche.

Attività



Dimensioni

3×3

5×5

$3 \text{ml} (30 \text{cm}^2)$

$\varnothing 3,7$

$10 \times 12,5$

3×5

$5 \times$

10×15

3×6

$\varnothing 2,5$

2×3

6×6

9×9

$12,5 \times 15$

$> 150 \text{cm}^2$



Specialità chirurgiche (2016)

- Chirurgia ferite difficili
 - 4,8%
- Chirurgia plastica
 - 1,7%
- Dermatologia +
Odontostomatologia
 - 0,0%
- Neurochirurgia
 - 1,0%
- Oftalmologia
 - 92,4%
- Ortopedia
 - 0,1%



Unità distribuite

2014	2015	2016
1342	1398	1340



DECONTAMINAZIONE



Situazione

2/9

Non decontaminano
membrana amniotica



7/9

Decontaminano
membrana amniotica



Metodo di decontaminazione



WARNING

LA MEMBRANA AMNIOTICA HA LA CAPACITÀ DI ASSORBIRE I PRINCIPI ATTIVI IMPIEGATI NELLE SOLUZIONI DECONTAMINANTI E DI RILASCIARLI GRADUALMENTE NEL SITO DI APPLICAZIONE.

REAZIONE ALLERGICA NEI PAZIENTI SENSIBILI.

VALIDARE UN METODO DI LAVAGGIO.

INDICARE SULLA SCHEDA LA PRESENZA (EFFETTIVA O POSSIBILE) DI ANTIBIOTICI ED ANTIFUNGINI.

CONSERVAZIONE



Metodo di conservazione (tessuto tal quale)



WARNING

LA MEMBRANA AMNIOTICA HA LA CAPACITÀ DI ASSORBIRE IL DMSO E DI RILASCIARLO GRADUALMENTE NEL SITO DI APPLICAZIONE.

EFFETTI TOSSICI EVOCATI NEI PAZIENTI.

VALIDARE UN METODO DI LAVAGGIO.

INDICARE SULLA SCHEDA LA POSSIBILE PRESENZA DI DMSO

VITALITÀ



Test di vitalità

B

Metodo

Calcolo

Vitalità residua

Essendo

$$A_{B1} \text{ e } A_{B2}$$

→ assorbanza del "Bianco 1" e del "Bianco 2"

$$A_{C1} \text{ e } A_{C2}$$

→ assorbanza del "Campione 1" e del "Campione 2"

allora

$$A_P = \left(\frac{A_{C1} + A_{C2}}{2} \right) - \left(\frac{A_{B1} + A_{B2}}{2} \right)$$

→ assorbanza assoluta del patch

essendo inoltre

$$A_{P1}, A_{P2}, A_{P3}, \dots, A_{Pi}$$

→ assorbanze assolute di tutti i patch processati

allora

$$A_{Pmedia} = \frac{\sum_{i=1}^N A_{Pi}}{N}$$

→ media delle assorbanze assolute

$$\sigma_{A_{Pmedia}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (A_{Pi} - A_{Pmedia})^2}{N-1}}$$

→ deviazione standard delle assorbanze assolute

quindi

$$V_{P\%} = \left(\frac{A_P}{A_{Pmedia} + \sigma_{A_{Pmedia}}} \right) \cdot 100$$

→ vitalità percentuale del patch

essendo infine

$$V_{P\%1}, V_{P\%2}, V_{P\%3}, \dots, V_{P\%i}$$

→ vitalità percentuali di tutti i patch processati

allora

$$\text{Tessuto vitale} := V_{P\%} > q_{1/4}(V_{P\%i})$$

→ determinazione del grado di vitalità del patch

Banca
8

Banca
9

-

-

-

-

-

-



MICROBIOLOGIA



Test microbiologici (tessuto tal quale)

	Banca 1 DEC	Banca 2 DEC	*Banca 3 NO-DEC	*Banca 4 NO-DEC	Banca 5 DEC	Banca 6 NO-DEC	Banca 7 DEC	*Banca 8 DEC	*Banca 9 DEC
Pre	Soluzione post-dec.	Tampone placenta pre-dec.	Liquido placenta	Liquidi lavaggio × 4	Liquido placenta pre-dec.	Liquido placenta	Tampone placenta pre-dec.	Biopsia placenta pre-dec.	Liquido lavaggio pre-dec.
	Tessuto post-dec.	Soluzione post-dec.	Liquido lavaggio	Tessuto pre-taglio	Liquido Lavaggio pre-dec.	Liquidi lavaggio × 5	Soluzione post-dec.	Liquido lavaggio pre-dec.	Tessuto post-dec.
	Soluzione cong.	Tampone placenta	Biopsia placenta	Liquido taglio × 2	Tessuto post-dec.		Tampone placenta	Liquido lavaggio	Liquido stand-by dec.
<p>Test eseguiti tramite brodo BHI, HB&L e Bactec/BacT-ALERT su batteri aerobi/anaerobi e miceti</p>									
		Soluzione cong.		Soluzione cong.			Tessuto a campione post-dec.		
Post	Soluzione cong.	-	Tessuto	Patch PVDF	Soluzione cong.	Soluzione cong.	-	Liquido lavaggio × 2	-
	Terreno trasp.		Terreno trasp.	Soluzione cong.	Terreno trasp.				
Totale	5 test	5 test	6 test	11 test	6 test	7 test	4 test + test a campione	6 test	3 test

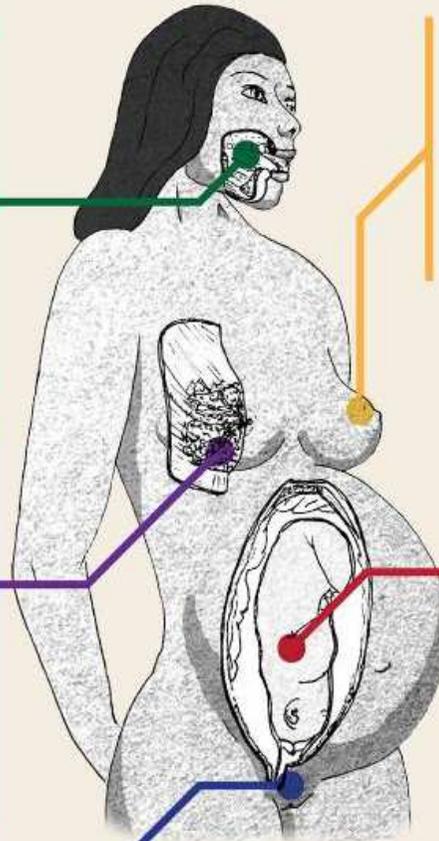
...a proposito di microbiologia...il meconio...

Mouth

- Amniotic fluid bacteria with an oral origin include *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus* spp., *Bergeyella* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Rothia dentocariosa*, and *Filifactor alocis*.
- Oral bacteria are likely transmitted to the uterus via the blood stream, especially if gingiva inflammation is present.

Internal Breast

- Aseptically-collected breast milk contains 100-600 OTUs. Abundant genera include *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Corynebacteria*, *Lactococcus*, *Weisella*, and *Leuconostoc*.
- An entero-mammary pathway brings gut bacteria to the mammary gland via lymph and blood circulation. External sources of milk microbes include the maternal skin and infant oral cavity.



External Breast

- The sebaceous skin of the breast is an external source of microbes for breast milk (*Staphylococcus* and *Corynebacteria*) but may also provide skin bacteria not common in milk (such as *Propionibacteria*) to the suckling infant.

Uterus

- Contrary to the "sterile womb" paradigm, bacteria are found in umbilical cord blood, amniotic fluid, fetal membranes, and meconium of healthy, term infants.
- Meconium microbiomes are dominated by Enterobacteriaceae (*Escherichia* and *Shigella*) and lactic acid bacteria (*Leuconostoc*, *Enterococcus*, and *Lactococcus*).
- Microbes likely gain access to the womb through ascension from the vagina and/or through the blood stream for bacteria of intestinal or oral origin.

Vagina

- Vaginal microbial communities vary significantly among women of different ethnicities and could influence which microbes are transferred to an infant.
- The vaginal microbiota becomes less diverse during pregnancy while certain *Lactobacillus* species become enriched.
- The initial microbiota of vaginally-born infants resembles that of their mother's vagina, while that of C-section infants is dominated by skin microbes not related to those of their mother.

Conclusioni



Grazie...

