



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**Dipartimento di Scienze Chirurgiche
Clinica Oculistica
Direttore: Prof. Claudio Azzolini**

**IL TRATTAMENTO DELLE ULCERE
NEUROTROFICHE CON TECNICA SLAM**

Coordinatore: Chiar.mo Prof. LORENZO DOMINIONI

Tutor: Chiar.mo Prof. CLAUDIO AZZOLINI

Tesi di Dottorato:

Paolo Sivelli

Anno Accademico 2010-2011

SOMMARIO

1. LA MEMBRANA AMNIOTICA	3
2. LA COLLA DI FIBRINA.....	15
2.1 Colle di fibrina del commercio	16
2.2 Colle di fibrina “home-made”	17
2.3 Uso clinico delle colle di fibrina	20
3. UTILIZZO DELLA MEMBRANA AMNIOTICA ABBINATA A COLLA DI FIBRINA	23
4. MATERIALI E METODI	26
4.1 Studio	26
4.2 Tecnica chirurgica	26
4.3 Strumenti chirurgici dedicati.....	33
5. RISULTATI	36
6. DISCUSSIONE	39
7. BIBLIOGRAFIA	42

1. LA MEMBRANA AMNIOTICA

La membrana amniotica è lo strato più interno delle membrane placentali che formano la “borsa delle acque” in cui è contenuto il feto. Si presenta come un foglietto sottile, traslucido e privo di vasi. Lo spessore totale delle membrane placentari dopo che queste si sono staccate dalle pareti uterine durante il parto è di circa 200-300 μm ed in particolare quello dell’amnios è di 20-30 μm . L’amnios è passivamente adeso al *corion* sottostante dalla pressione interna esercitata dal liquido amniotico e frequentemente si stacca dal resto delle membrane durante il parto o comunque può essere separata facilmente dal corion sottostante, dal momento che le due strutture non risultano mai strettamente legate. L’amnios non contiene vasi ed ottiene il nutrimento e l’ossigeno necessari dal fluido corionico, dal liquido amniotico, dalla superficie dei vasi fetali e, durante le prime 12 settimane di sviluppo, dal magma reticolare.



Figura 1: borsa delle acque

Da un punto di vista istologico la membrana amniotica consiste di uno strato di cellule epiteliali, di una spessa membrana basale e di uno stroma avascolare costituito da sottili filamenti connettivali.

L'epitelio può essere piatto, cilindrico o cubico, a seconda del periodo di sviluppo fetale e della localizzazione. Le cellule epiteliali sono connesse tra loro tramite numerosi desmosomi, gap-junction, canali e da laminina 5, 6 e 7ⁱ. In superficie presentano numerosi microvilli ricoperti da glicocalici con un'alta concentrazione di siti di legame anionici. All'interno delle cellule epiteliali si distinguono in particolare: un reticolo endoplasmatico rugoso molto sviluppato, delle goccioline lipidiche e accumuli di glicogeno. Dal punto di vista istochimico si è dimostrata nelle cellule epiteliali la presenza di anidrasi carbonica, C.A. 1 e 2, con funzione di mantenere il pH del liquido amnioticoⁱⁱ; la dipeptidilpeptidasi IV, con azione idroliticaⁱⁱⁱ; ed enzimi della glicolisi anaerobica^{iv}. Questo epitelio è dunque altamente specializzato e contiene tutte le strutture necessarie alla produzione di enzimi e di citochine che sono responsabili di molte delle proprietà della membrana amniotica che trovano applicazione in oftalmologia.

Le cellule epiteliali appoggiano su una membrana basale, la quale possiede anch'essa un ruolo importante nelle proprietà della membrana amniotica. Costituita da collagene di tipo IV, V e VII, contiene laminina, fibronectina e proteoglicani eparan solfato ed ha perciò una struttura molto simile alla membrana basale della congiuntiva.

La lamina basale si pone in contatto esternamente con uno stroma avascolare, costituito da uno strato compatto di fibrille collagene tipo I e III di 18 e 50 nm, intrecciate tra loro e connesse da fibronectina secreta dalle cellule epiteliali in quantità abbondante.

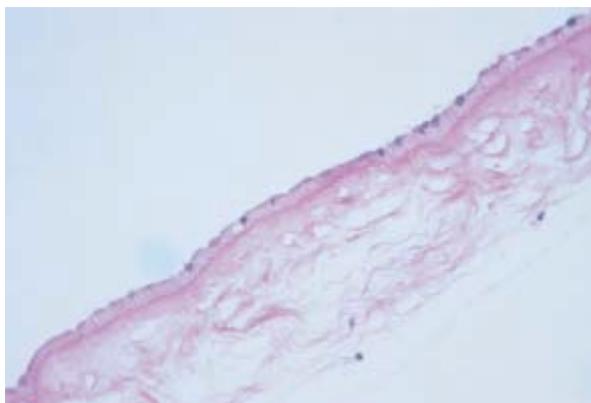


Figura 2: Preparato istologico di membrana amniotica appena prelevata. L'epitelio regolare e poggia sul complesso membrana basale/stroma, privo di alterazioni significative. Le cellule epiteliali della membrana amniotica placentare, a cui si riferisce il campione, sono prevalentemente cuboidali (Ematossilina/eosina, 250).

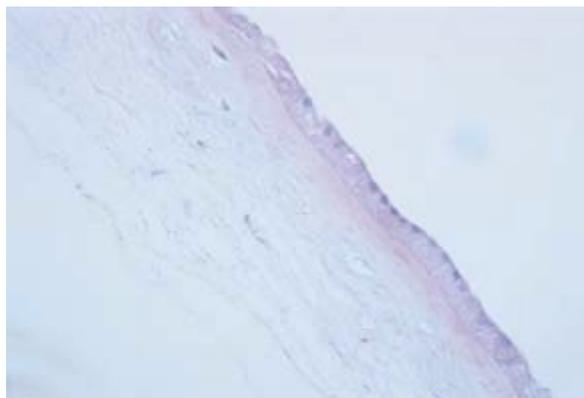


Figura 3: Preparato istologico di membrana amniotica dopo la crioconservazione. L'epitelio presenta alterazioni morfologiche lievi e focali. Il complesso membrana basale/stroma, anche se edematoso, presenta una trama di collagene sostanzialmente mantenuta, evidenziata dalla particolare colorazione (vanGieson, 250).

Gli effetti della membrana amniotica sulla superficie oculare sono numerosi. Il meccanismo d'azione però è a tutt'oggi non ancora completamente conosciuto.

Nel 1999 Fukuda^v ha dimostrato che la distribuzione delle sub-unità α nel collagene di tipo IV della membrana basale della membrana amniotica è identica a quella della congiuntiva e del limbus, ma diversa da quella della cornea, e inoltre che anche altre componenti della membrana basale – come la laminina 1 e 5, la fibronectina ed il collagene tipo IV - sono identiche a quelle della congiuntiva. Questo giustifica il fatto che la membrana sia un supporto ideale per la crescita delle cellule congiuntivali e limbari.

Secondo Tseng^{vi} inoltre, lo stroma della membrana amniotica sarebbe in grado di sopprimere i fattori di crescita dei fibroblasti che si liberano durante i processi fibrotici di riparazione della superficie oculare. E' stata infatti dimostrata in vitro la soppressione della produzione di TGF- β 1,2,3 e dell'espressione del recettore TGF- β II nei fibroblasti corneali e limbari. Questo spiegherebbe l'effetto anticicatriziale della membrana amniotica.

Le proprietà della membrana amniotica sarebbero legate anche alle numerose citochine che le cellule epiteliali e lo stroma sarebbero in grado di produrre. Paradowska^{vii} partendo dall'osservazione clinica e dai dati istopatologici relativi alla frequenza di trasmissione di virus attraverso i tessuti placentari indicanti che la maggior parte delle placente hanno una attività antivirale, ha ricercato la quantità di citochine antiinfiammatorie prodotte dai villi corionici, dalla decidua e dalla membrana amniotica in

cultura. Nel caso di quest'ultima i risultati hanno dimostrato una produzione significativa di IFN- α e β che hanno funzione antivirale, e di IL-10 che bloccando l'azione di citochine proinfiammatorie come IL-6, IL-8 e TNF- α limita l'estensione della cascata infiammatoria e i danni tissutali ad essa legati. Questa funzione antivirale e di controllo dell'infiammazione è in sintonia con la funzione di protezione verso il feto che la membrana amniotica esercita durante la gravidanza ed è probabilmente importante per la difesa della superficie oculare dopo il trapianto.

La funzione di difesa del feto avviene anche con la protezione nei confronti della lisi indotta dal complemento: le cellule epiteliali hanno sulla loro superficie una proteina (CD 59) che viene anche secreta nel liquido amniotico ed inibisce l'attivazione del complemento^{viii}. Anche questo tipo di blocco della reazione immunitaria potrebbe avere un ruolo nella difesa della superficie oculare.

L'effetto antinfiammatorio della membrana amniotica è sicuramente uno degli aspetti clinici più evidenti poco tempo dopo il trapianto. Kruse^{ix} attribuisce questa importante proprietà alla capacità della membrana di inibire la produzione di IL-8, Gro-Alpha, Ena 78 ed MP1alfa, tutti fattori normalmente prodotti in corso di infiammazione della superficie oculare. Inoltre, il gruppo di ricerca di Kruse ha dimostrato che la membrana basale della membrana amniotica inibisce la produzione di IL-1 β mRNA e stimola l'IL-1RA (recettore per l'antagonista) in cellule dell'epitelio corneale, avendo entrambi come effetto finale il blocco dell'azione di IL-1 che è uno dei primi e più importanti stimolatori della cascata infiammatoria.

Secondo Hao^x l'effetto antinfiammatorio sarebbe sì legato all'espressione di IL-1RA sulle cellule stromali ed epiteliali della membrana amniotica, ma anche dalla produzione di IL-10 (potente soppressore di citochine proinfiammatorie) da parte del solo epitelio. Hao evidenzia inoltre la liberazione da parte di entrambi i tipi cellulari di inibitori delle metalloproteinasi (TIMPS, bloccano la lisi dei tessuti), di collagene 18a (precursore di endostatina) e di trombospondina (dal solo epitelio) che giustificerebbe l'inibizione dei processi di neovascolarizzazione della superficie oculare osservati in vivo^{xi}.

Anche se la funzione antinfiammatoria della membrana amniotica è come detto prima legata alla sua capacità di produrre citochine che inibiscono la cascata infiammatoria, recentemente alcuni autori hanno messo in evidenza che anche il solo contatto della membrana amniotica con un tessuto infiammato è in grado di diminuire il numero di cellule infiammatorie nel tessuto stesso. Shimmura^{xii} ha invece dimostrato che la membrana amniotica è in grado di intrappolare cellule infiammatorie presenti sulla superficie oculare e di indurre la loro morte favorendo i processi di apoptosi.

Numerosi sono poi i fattori di crescita prodotti dalla membrana amniotica. Tra questi: epidermal growth factor (EGF), nerve growth factor (NGF), keratocyte growth factor (KGF), hepatocyte growth factor (HGF), basic fibroblast growth factor (bFGF). La liberazione di NGF e di altre neurotrofine da parte della membrana amniotica potrebbe essere la

spiegazione dei buoni risultati ottenuti nel trattamento di ulcere corneali neurotrofiche^{xiii}.

Infine, la membrana amniotica ha effetto di ridurre la carica batterica come si è ben dimostrato con il suo utilizzo nella protezione di ferite cutanee, forse non frequente in Europa, ma diffuso nei Paesi del Terzo Mondo perché efficace e soprattutto economico. Questa proprietà apparentemente non dipende da fattori antimicrobici prodotti dalla membrana stessa, ma dalla sua stretta aderenza alla superficie cui è applicata^{xiv}. Questa aderenza funzionerebbe anche da vera e propria barriera fisica nei confronti della frizione esercitata dalle palpebre durante l'ammiccamento, funzione di protezione che combinata alla capacità di fornire ossigeno e di mantenere idratato l'epitelio corneale sarebbe alla base dei risultati ottenuti nel trattamento delle ulcere corneali^{xv}.

La donazione di membrana amniotica non comporta rischi per il donatore (sia la madre che il bambino) e non richiede che il donatore abbia una parentela con il ricevente. E' indispensabile però che la madre esprima il suo consenso alla donazione.

La partoriente deve sottoscrivere un consenso che contiene le seguenti informazioni: la membrana amniotica viene utilizzata nell'ambito di interventi di chirurgia; la donazione non comporta un pericolo per la donatrice e il neonato (il prelievo non modifica le attività di assistenza alla partoriente ed al neonato); il prelievo della membrana amniotica non costituisce una garanzia dell'utilizzo clinico del tessuto, che deve

possedere caratteristiche biologiche e di sicurezza da accertare successivamente; i dati personali sono coperti da segreto professionale; qualora la membrana amniotica risulti idonea alla crioconservazione, la donatrice dovrà rendersi disponibile ad effettuare un prelievo di sangue dopo 6 mesi, per l'esecuzione di esami sierologici di conferma; in futuro la madre non potrà avanzare diritti sulla membrana amniotica raccolta; tutti gli esami clinici relativi alla donazione sono gratuiti. Lo screening sierologico effettuato sulle candidate al prelievo non è molto diverso da quello eseguito su tutte le gravide, e i dati personali da tutelare sono, oltre ai risultati dello screening, quelli anagrafici, che vengono diffusi solo in forma anonima.

La selezione della donatrice di placenta avviene secondo le seguenti indicazioni: anamnesi patologica della donatrice negativa per tutte le neoplasie maligne, anche localizzate, di natura primitiva o metastatica; sierologia negativa, oltre che per anti-HIV 1 e 2, anti-HCV e HBsAg, anche per TPHA e VDRL (Sifilide), Citomegalovirus (IgM) e Toxoplasma (IgM); assenza di anomalie ecografiche, malformazioni note e/o patologie a carico del nascituro; assenza di familiarità per malattie genetiche; assenza di comportamenti a rischio per entrambi i genitori; età gestazionale superiore a 35 settimane. Dopo sei mesi dalla donazione di placenta si esegue un ulteriore prelievo di sangue periferico della donatrice, per conferma dei test per anti-HIV 1 e 2, HbsAg, anti-HCV e Sifilide.

La placenta viene raccolta nel corso di un parto effettuato con taglio cesareo elettivo e lavorata entro poche ore. Tutte le fasi della

preparazione vengono effettuate in asepsi e materiale chirurgico sterile è confezionato in doppio sacchetto. La placenta, con il cordone ombelicale e il sacco amniotico, viene lavata con fisiologica sterile, per liberarla dal sangue e dai coaguli ematici. Dopo aver eliminato il sacco amniotico, si scolla la membrana amniotica dal corion sottostante, senza danneggiarla. Dopo ripetuti lavaggi con fisiologica la membrana viene distesa sopra un filtro in nitrocellulosa (la superficie stromale a contatto con il filtro e quella epiteliale libera), e viene ritagliata in porzioni grandi quanto i filtri stessi. Le porzioni di membrana amniotica vengono arrotolate assieme al filtro di nitrocellulosa e inserite nelle *cryovials* (Fig.5), che vengono riempite con il terreno di criocongelamento.

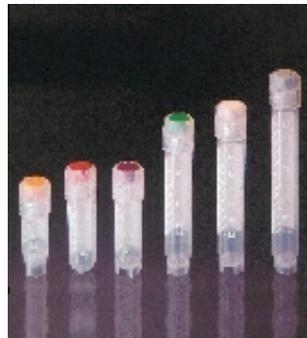


Figura 4: cryovials e tank di conservazione

Le *cryovials* vengono portate alla temperatura di -90°C in una camera da congelamento e vengono quindi inserite in un sacchetto in kapton o kapak, e conservate in vapori di azoto liquido, alla temperatura di -140°C circa.

La vial contenente la membrana viene estratta dal *tank* di crioconservazione e scongelata con acqua calda. La membrana adesa al

filtro viene estratta, fermata al filtro con una molla e lavata abbondantemente con fisiologica. Il tessuto viene trasferito in un contenitore di vetro, riempito di liquido di trasporto e conservato a 4°C fino al momento dell'utilizzo. La membrana amniotica può essere utilizzata fino a 72 ore dallo scongelamento. Un codice assicura l'identificazione del donatore, delle porzioni di tessuto e del ricevente.

Vengono eseguiti controlli microbiologici per verificare l'assenza di contaminanti sui seguenti campioni di tessuto o liquido: placenta appena prelevata, liquido di arrivo, liquido di lavaggio della placenta appena prelevata, membrana di fine lavorazione, liquido di fine lavorazione, liquido di crioconservazione, liquido di lavaggio del tessuto dopo lo scongelamento e liquido di trasporto dopo l'inserimento del tessuto.

La membrana amniotica viene inviata correlata ad una Scheda Informativa che riassume le caratteristiche della donatrice e del tessuto, e a una Scheda di Utilizzo, che il chirurgo reinvia compilata per confermare l'innesto e le possibili complicanze.

In Italia la fornitura di membrana amniotica ad uso oculistico viene assicurata dalla Fondazione Banca degli Occhi del Veneto, dalla Banca delle Cornee di Bologna, di Cosenza, dell'Aquila, di Roma, di Imola, dalla Banca delle Cornee di Lucca e dalla Banca Regionale delle Membrane Amniotiche della Regione Piemonte.

La membrana amniotica è un tessuto biologico utilizzato nel trattamento di malattie non oculari da oltre un secolo. Nel 1910 Davis^{xvi} fu il primo a

riportare la possibilità di utilizzare la membrana amniotica nel trattamento delle ustioni cutanee, sfruttando la proprietà di protezione dalle infezioni, stimolazione dei processi riparativi, alleviamento del dolore. Successivamente, è stata utilizzata in chirurgia generale per prevenire la formazione di aderenze postchirurgiche, in neurochirurgia per interventi sul cervello, in ginecologia per la ricostruzione di vie urinarie e genitali.

Le prime documentazioni sull'uso della membrana amniotica nella chirurgia oculare risalgono alla prima metà del '900: De Rotth nel 1940^{xvii}, mentre esercitava nel reparto di Oftalmologia di Irme (Budapest, Ungheria), pubblicò una piccola serie di casi clinici nei quali il tessuto biologico veniva utilizzato per la ricostruzione della superficie congiuntivale. Dal 1940 la membrana amniotica, sia fresca che conservata, è stata utilizzata nel trattamento di malattie della superficie oculare interessanti la cornea e la congiuntiva, soprattutto in casi gravi come le ustioni da sostanze chimiche.

Nel 1946, Lavery^{xviii} descrisse il caso clinico di un paziente sottoposto a trapianto di "amnioplastina" (membrana amniotica secca, chimicamente processata) a seguito di ustione da calce, e nello stesso anno Sorsby e Symmons^{xix} pubblicarono uno studio su una serie di 30 pazienti con ustione della superficie oculare trattati con successo. La letteratura non riporta altri studi fino al 1995, quando Kim e Tseng^{xx} dimostrarono la possibilità di ricostruire la superficie corneale mediante membrana amniotica in un modello animale di ustione da alcali. Da allora numerosi studi sono stati pubblicati sulle possibili applicazioni della membrana

amniotica in campo oftalmologico e da gennaio del 2004 il trapianto di membrana amniotica è stato riconosciuto da Medicare negli Stati Uniti come procedura chirurgica standard. Attualmente viene applicato come trattamento di una gamma di patologie sempre più ampia, essendosi dimostrato una tecnica efficace per la ricostruzione della superficie oculare nel trattamento di difetti epiteliali persistenti, ulcere corneali sterili, deficit parziale di cellule staminali limbari e lesioni corneali chimiche o termiche. Il trapianto di membrana amniotica viene effettuato anche in congiunzione con il trapianto di cellule staminali ed in altri tipi di chirurgia oftalmologica, quali l'asportazione di pterigi o la ricostruzione dei fornici congiuntivali.

2. LA COLLA DI FIBRINA

La “colla di fibrina” é un adesivo biologico a 2 componenti composto da un concentrato di fibrinogeno ottenuto da plasma umano, che contiene anche altri fattori attivi nei processi emostatici quali il fattore XIII, la fibronectina e l’aprotinina, e da soluzioni di trombina.

Al momento dell’utilizzo i 2 componenti vengono miscelati in presenza di ioni calcio, riproducendo così le fasi finali del processo della coagulazione: la trombina induce il distacco dei fibrinopeptidi A e B dalle rispettive catene A-alfa e B-beta del fibrinogeno e la formazione di monomeri di fibrina che polimerizzano immediatamente mediante deboli legami a idrogeno, per formare un primo coagulo gelatinoso ed instabile. Il fattore XIII, a seguito dell’attivazione indotta dalla stessa trombina e in presenza di ioni calcio, catalizza la conversione dei deboli legami ad idrogeno tra i monomeri di fibrina in forti legami covalenti e conseguentemente induce la formazione di un coagulo stabile, insolubile e non friabile. Il fattore XIII inoltre induce il legame al coagulo di un inibitore della plasmina svolgendo così un ruolo molto importante nel proteggere il coagulo da una precoce degradazione da parte della plasmina plasmatica. Il fattore XIII, infine, interagendo con fibronectina ed altre glicoproteine plasmatiche concorre ad aumentare l’adesione del coagulo alla sede della lesione ^{xxi xxii}.

La colla di fibrina é priva di tossicità per i tessuti umani su cui viene applicata, risulta essere completamente riassorbita in qualche giorno e

appare in grado di stimolare i processi riparativi e la crescita dei tessuti lesi^{xxiii}.

Attualmente vengono utilizzati differenti tipi di “colla di fibrina” che vengono normalmente suddivisi in 2 categorie, i prodotti commerciali e quelli realizzati in laboratorio (o “home-made”), che si differenziano per la metodologia di preparazione del concentrato di fibrinogeno. Nei prodotti commerciali il fibrinogeno é estratto da pool di un elevato numero di unità di plasma prevalentemente utilizzando il processo di frazionamento di Cohn, mentre nella colla di fibrina "home made" il fibrinogeno viene ottenuto da singole unità di plasma allogenico o autologo per lo più attraverso il processo della crioprecipitazione.

2.1 Colle di fibrina del commercio

Attualmente in Europa sono disponibili in commercio diversi prodotti identificati come colla di fibrina tra i quali i più comunemente utilizzati sono noti con il nome commerciale di Tissucol/Tissel, Biocol e Beriplast.

Nella maggior parte dei prodotti per la preparazione del concentrato di fibrinogeno viene utilizzato il metodo del frazionamento di Cohn che consente, attraverso ripetuti passaggi di precipitazione termo-chimica, di ottenere un prodotto con elevate concentrazioni di fibrinogeno (circa 80-120 mg/ml) e di fattore XIII (10-30 UI/ml)^{xxiv}. Il frazionamento di Cohn viene inoltre utilizzato da tutti i produttori per la preparazione delle soluzioni di trombina che attualmente nella quasi totalità dei prodotti disponibili in Europa viene preparata esclusivamente da plasma umano.

Nel corso del processo di preparazione, tutti i prodotti attualmente in commercio sono sottoposti a uno o più processi di sterilizzazione ed inattivazione virale che variano da prodotto a prodotto (trattamento con solvente-detergente, pastorizzazione, autoclave, etc.) garantendo la pressoché assenza di rischio di trasmissione di agenti virali, in particolare per quanto concerne i virus dell'epatite e l'HIV. Se i rischi di trasmissione di agenti virali attraverso questi prodotti sono da ritenersi oggi superati, persistono invece numerosi timori per quanto riguarda la trasmissione di prioni o il rischio di immunizzazione nei confronti di uno o più componenti delle colle di fibrina^{xxv}.

Tali rischi, benché ridotti rispetto ad un recente passato per la sostituzione di trombina di origine bovina con quella di origine umana, sono tuttavia motivati dalla presenza nei prodotti del commercio di aprotinina di origine bovina.

Un ulteriore elemento che ha limitato l'uso delle colle di fibrina del commercio, soprattutto per quei campi di utilizzo che richiedono l'applicazione di elevati volumi di prodotto, è rappresentato dall'elevato costo, che in Italia è attualmente di circa 80-100 euro/mL.

2.2 Colle di fibrina “home-made”

L'elevato costo dei prodotti del commercio e il divieto posto nel 1978 dalla Food and Drug Administration alla loro distribuzione negli Stati Uniti ha stimolato la produzione delle cosiddette colle di fibrina “home-made” ossia

di preparati a base di concentrato di fibrinogeno realizzati nei laboratori di centri trasfusionali e di banche del sangue a partire da singole unità di plasma allogenico o autologo.

Per la produzione di concentrati di fibrinogeno in laboratorio sono stati sperimentati e messi a punto sia metodi di precipitazione chimica che di crioprecipitazione. Benché i metodi di precipitazione chimica consentano di ottenere concentrazioni di fibrinogeno e fattore XIII simili a quelle dei prodotti del commercio i sistemi di gran lunga più utilizzati in laboratorio sono quelli che si basano sulla crioprecipitazione in quanto la precipitazione chimica può essere realizzata solo su limitati volumi di plasma e richiede l'impiego di sistemi aperti.

La metodica di crioprecipitazione che viene utilizzata per la preparazione del concentrato di fibrinogeno delle colle di fibrina "home-made" è la medesima che viene adottata per la preparazione del crioprecipitato, normalmente prodotto nei centri trasfusionali e utilizzato a scopi trasfusionali e prevede lo scongelamento a + 4°C per circa 12 ore di una unità di plasma fresco congelato, da donazione convenzionale o da aferesi, e contemporaneo trasferimento per sifonamento del plasma sovranatante in una sacca satellite posta ad un livello più basso della sacca madre^{xxvi}. Tale metodica, molto semplice ed economica, consente tuttavia di ottenere concentrazioni di fibrinogeno sensibilmente inferiori a quelle presenti nei prodotti del commercio e raramente superiori a 25-30 mg/ml.

Per incrementare il contenuto di fibrinogeno del crioprecipitato sono state messe a punto numerose varianti alla metodica classica tra le quali, in particolare, quelle che prevedono la centrifugazione dell'unità di plasma dopo lo scongelamento o un doppio ciclo termico di crioprecipitazione della unità di plasma seguito da centrifugazione. Tali metodologie di crioprecipitazione consentono di ottenere concentrazioni di fibrinogeno di circa 40-60 mg/ml^{xxvii}.

La colla di fibrina "home made" presenta, nei confronti dei prodotti del commercio, un importante vantaggio in termini di economicità ma ha altresì rilevanti svantaggi che ne hanno limitato l'utilizzo.

In primo luogo la concentrazione di fibrinogeno e fattore XIII è sensibilmente inferiore a quella presente nei prodotti commerciali e soprattutto altamente variabile da una preparazione all'altra. Inoltre, benché la metodica di preparazione sia semplice ed utilizzi procedure familiari al personale che lavora in centro trasfusionale, la produzione in laboratorio richiede molto tempo (il che rende di fatto impossibile l'utilizzo di prodotti "home made" in interventi d'urgenza) ed un consistente impegno di personale.

Le colle di fibrina prodotte in laboratorio, infine, non vengono sottoposte a processi di sterilizzazione o di inattivazione virale, il che rende tali prodotti, in particolare quelli che vengono preparati da unità di plasma allogenico, meno sicuri dei prodotti del commercio anche per il rischio di inquinamento batterico in corso di preparazione, sempre presente quando vengono utilizzati sistemi aperti.

Un ulteriore problema dei prodotti “home made” è rappresentato dal tipo di soluzione che viene miscelato al momento dell’applicazione al concentrato di fibrinogeno per indurre la trasformazione in fibrina. A tale scopo sono state utilizzate soluzioni di trombina, bovina o umana, o prodotti surrogati. L’uso della trombina bovina, benché efficace ed economico, è stato ormai abbandonato in quasi tutti i Paesi non solo per il rischio di trasmissione di prioni ma anche per il documentato e grave rischio di indurre la produzione di anticorpi nei confronti di fattori della coagulazione bovini (in particolare del fattore V) in grado di “cross-reagire” con quelli umani e di indurre gravi coagulopatie^{xxviii}.

Le soluzioni di trombina umana, che nei prodotti commerciali hanno sostituito quelle di origine bovina, sono difficilmente reperibili essendo quelle in commercio sono generalmente approvate per esclusivo uso diagnostico e con costi elevatissimi. I prodotti surrogati, quali la batroxobina (Botropase), seppur molto economici, inducono un’attivazione molto lenta del fibrinogeno, rendendoli idonei all’utilizzo solo in limitati campi di impiego.

2.3 Uso clinico delle colle di fibrina

Le preparazioni di colla di fibrina, sia in commercio che “home made”, hanno trovato un largo impiego in vari campi della pratica chirurgica ove sono state utilizzate principalmente con uno dei seguenti obiettivi: facilitare l’adesione tessutale, coadiuvare o sostituire le suture chirurgiche e favorire l’emostasi. Purtroppo, benché in letteratura siano reperibili

numerosissimi studi clinici in una ampia varietà di applicazioni chirurgiche, la maggior parte delle pubblicazioni si riferiscono a studi non controllati e condotti su un limitato numero di pazienti.

Le più comuni applicazioni cliniche della colla di fibrina sono nel campo della chirurgia plastica, cardiovascolare, toracica, oftalmica e neurochirurgica. Recentemente sono inoltre stati ottenuti anche buoni risultati nel campo della chirurgia addominale e maxillofacciale.

La più ampia esperienza finora acquisita sulla colla di fibrina riguarda sicuramente l'ambito cardiovascolare nel quale tali prodotti sono stati utilizzati come emostatici per ridurre il sanguinamento, lento e diffuso, che si produce su ampie superfici di tessuti cruentati, lungo linee di sutura di anastomosi vascolari o in sedi di puntura d'ago. Numerosi studi pubblicati in questo ambito, molti dei quali randomizzati e controllati, sembrano dimostrare l'efficacia della colla di fibrina nel ridurre il sanguinamento nei reinterventi su bypass coronarico e nella chirurgia delle cardiopatie congenite^{xxix}.

Importanti risultati sono stati ottenuti nella chirurgia toracica, in particolare per il trattamento di lesioni e fistole bronchiali con fuoriuscita gassosa che possono verificarsi nel corso di interventi di decorticazione o resezione polmonare.

In campo neurochirurgico la colla di fibrina è utilizzata con ottimi risultati nel trattamento di brecce della dura madre con perdite di liquor e come "sigillante" nelle anastomosi vascolari intracraniche o nelle suture della dura dopo craniotomia.

In chirurgia addominale è stata dimostrata l'efficacia dell'applicazione per via endoscopica della colla di fibrina per il trattamento dell'ulcera gastrica sanguinante.

La colla di fibrina è stata inoltre utilizzata con successo per controllare il sanguinamento dopo estrazioni dentali o nel corso di piccoli interventi chirurgici in pazienti ad elevato rischio di sanguinamento per difetti congeniti della coagulazione o perché in terapia anticoagulante.

Infine, la colla di fibrina viene largamente utilizzata e con ottimi risultati in chirurgia plastica (soprattutto per facilitare l'attecchimento di trapianti cutanei in pazienti ustionati) e maxillofacciale.

3. UTILIZZO DELLA MEMBRANA AMNIOTICA ABBINATA A COLLA DI FIBRINA

L'innesto di membrana amniotica ha oggi in oftalmologia numerose applicazioni cliniche: viene utilizzato nella ricostruzione della congiuntiva in seguito ad ustioni di natura termica o chimica, ad asportazione di ampie neoplasie congiuntivali o nelle ricostruzioni del fornice congiuntivale nell'intervento di entropion cicatriziale; nel trattamento delle algie oculari dovute a disepitelizzazioni secondarie a patologie quali: cheratopatie bollose, la sindrome dell'occhio secco, il deficit corneale limbare o la Sjogren syndrome; nella ricostruzione della superficie corneale negli interventi di rimozione dello pterigio sia primario che secondario e ultimamente anche nella chirurgia del glaucoma^{xxx}.

L'indicazione primaria all' utilizzo del trapianto di membrana amniotica tramite posizionamento con colla di fibrina risiede però nel trattamento delle malattie della cornea. Viene utilizzata in caso di erosioni epiteliali recidivanti^{xxxi}, di ulcere post-erpetiche immunitarie e neurotrofiche^{xxxii xxxiii}, di ustioni termiche e chimiche^{xxxiv}, di patologie degenerative^{xxxv} e di difetti epiteliali post PRK^{xxxvi}.

L'epitelio corneale ha la funzione di preservare l'integrità e la trasparenza dello stroma formando una barriera che ne prevenga complicanze legate ad agenti esterni infettivi e traumatici. Normalmente un difetto corneale

guarisce rapidamente grazie alla migrazione delle cellule adiacenti al difetto ed alla proliferazione di cellule staminali del limbus. Diversi fattori quali insulti chimici e fisici, abuso di farmaci, traumi meccanici, compromissione della lubrificazione della superficie oculare e denervazione sensitiva possono compromettere il normale ricambio fisiologico dello strato più esterno della cornea ed esitare in un difetto epiteliale persistente, che eventualmente può progredire in ulcerazione e perforazione corneale.

Il trattamento dei difetti epiteliali è spesso poco efficace, come accade per esempio nelle forme erpetiche neurotrofiche, e nonostante nuove terapie siano in fase di sperimentazione, il trapianto di membrana amniotica rimane una valida opzione terapeutica a nostra disposizione. Condizioni indispensabili per tale trattamento chirurgico sono l'esclusione della natura infettiva e l'integrità del limbus, dove sono contenute le cellule staminali dell'epitelio corneale. L'applicazione della membrana amniotica sulla cornea viene eseguita dopo aver rimosso l'epitelio necrotico in sfaldamento. Alcuni autori propongono di innestare la membrana amniotica con l'epitelio rivolto verso l'alto, utilizzando la membrana basale come substrato per la crescita dell'epitelio (tecnica "graft"). Altri invece, suggeriscono di innestarla con l'epitelio rivolto verso il basso, dal momento che l'epitelio ha la funzione di migrare sulla cornea e non sulla membrana amniotica (tecnica "patch")^{xxxvii}.

La membrana può essere fissata alla cornea sottostante utilizzando diverse tecniche chirurgiche. Una prevede l'utilizzo di punti di sutura

singoli eseguiti con filo di nylon 10/0. Un'altra comprende la sutura corneale associata all'utilizzo di colla di fibrina: dopo aver pulito i margini dell'ulcera, la ferita viene riempita con il collante biologico e ricoperta con la membrana che viene ben distesa e fissata con punti singoli radiali in nylon 10/0. Un'ultima invece prevede l'utilizzo associato di punti di sutura e colla di fibrina, separando però i due componenti di questa, fibrinogeno e trombina: dopo aver ripulito la ferita si posiziona una goccia di trombina alla base dell'ulcera, si deposita una goccia di fibrinogeno al lato della stessa, si trascina la membrana delicatamente sul fibrinogeno e la si posiziona poi sull'ulcera, fissandola infine con la sutura a punti separati.

Le numerose proprietà della membrana amniotica consentono altrettante numerose applicazioni in caso di danno della superficie oculare.

E' sempre importante una precisa diagnosi della malattia che ha determinato l'alterazione della superficie della cornea e della congiuntiva, perché lo scopo dell'innesto di membrana amniotica è di favorire i processi di guarigione ma tale applicazione non risolve i quadri patologici sottostanti. Inoltre, prima dell'applicazione della membrana amniotica si deve considerare la superficie oculare nel suo complesso, e dunque un corretto trattamento di eventuali anomalie anatomiche o patologiche del bordo palpebrale e del film lacrimale.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Studio

Questo studio prospettico ha analizzato 15 pazienti che presentavano patologie corneali ulcerative di eziologia neurotrofica, trattati nella Clinica Oculistica dell'Università dell'Insubria di Varese dal settembre 2009 all'aprile 2011.

Sono stati valutati 15 pazienti, 8 maschi e 7 femmine, di età media pari a 65 anni. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad interventi di innesto di membrana amniotica con colla di fibrina.

Il follow up ha previsto un controllo settimanale per il primo mese dopo l'intervento ed uno al mese per i seguenti cinque. In tali controlli il paziente è stato sottoposto ad un esame con lampada a fessura, ad una valutazione dell'acuità visiva, ad uno studio della microscopia confocale e all'esecuzione di un Visante - OCT.

I controlli sono proseguiti periodicamente nell'arco dell'anno, fino ad osservare il completo riassorbimento della membrana amniotica.

4.2 Tecnica chirurgica

L'intervento inizia con la disinfezione il campo operatorio e la somministrazione di soluzione anestetica (4 ml carbocaina 2%, 1 ml sodio

bicarbonato, 4 ml mercaina 0,5%, 1 ml ialuronidasi) tramite iniezione peribulbare con ago 25G. Si ripete la disinfezione del campo operatorio con soluzione cutanea betadine 10% e si copre il volto del paziente. Per garantire l'asepsi del campo operatorio si posiziona un telino sterile appositamente creato per la chirurgia oftalmica, che ha in corrispondenza della regione orbitario-oculare una membrana trasparente adesiva. Praticato un taglio in corrispondenza della guaina trasparente del telino si accede all'occhio posizionando il blefarostato. Questa tecnica chirurgica viene eseguita utilizzando un microscopio operatorio Zeiss OPMI Vario/S88 con Lampade Xenon 180 W.

Una volta che il campo operatorio è stato adeguatamente preparato, si procede con l'intervento sul paziente: si pratica uno scraping dei tessuti necrotici che consiste nella rimozione con una lama piana crescent bevel up dell'epitelio e dello stroma danneggiati tramite uno slamellamento manuale a secco fino all'ottenimento di un piano regolare. In caso di sanguinamento durante queste fasi, si arresta l'emorragia tramite diatermia dei vasi con diatermo bipolare. Contemporaneamente si adagia il foglietto di membrana amniotica nell'apposito recipiente preventivamente riempito con soluzione fisiologica e si preparano uno o più patch di varia dimensione. I patch sono ottenuti con un taglio a pressione in immersione su tampone di silicone effettuato con una lama circolare da noi appositamente disegnata. E' possibile ottenere patch di vario diametro, dai 14 ai 18 mm a seconda dell'estensione della lesione da trattare. Il patch circolare così ottenuto viene posizionato su di una pinza per membrana

amniotica specificamente progettata dalla nostra equipe e realizzata dalla ditta E. Janach®.



Figura 5: colla di fibrina, Tissucol Baxter

Scongelata la colla di fibrina (Tissucol Baxter, Figura 1), conservata a -18°C, e separate le due siringhe contenenti l'una fibrinogeno e l'altra trombina, si instillano alcune gocce di fibrinogeno sulla superficie corneale precedentemente courettata. Il fibrinogeno ha viscosità maggiore rispetto alla trombina, viene quindi posizionato per primo sulla cornea, in modo da creare un substrato uniforme su cui posizionare l'altro componente. Si distribuisce il fibrinogeno in maniera uniforme su tutto l'ambito corneale con una spatola di Barraquer. L'altro componente, la trombina, viene instillato in un contenitore sterile nel quale viene immersa la superficie di membrana che andrà a contatto con la superficie corneale.

Si appone il patch di membrana amniotica precedentemente preparato sulla superficie corneale e con seguente lieve pressione del manico della pinza, si svincolano le branche dal campo operatorio dando modo alle due componenti della colla biologica di polimerizzarsi. L'interazione biochimica tra trombina e fibrinogeno avviene in circa 15 secondi.

A membrana ben distesa e tenacemente adesa alla superficie corneale, si asportano i residui di colla depositatisi sulla congiuntiva e nel fornice ed eventualmente si rifila il patch in modo da ottenere margini regolari.

Ad intervento terminato si medica con collirio antibiotico e posiziona una lente a contatto terapeutica per favorire la completa adesione della membrana e evitare lesioni o infezioni della superficie oculare.

I pazienti operati in day surgery vengono dimessi il giorno stesso dell'intervento. In dimissione viene prescritto loro l'utilizzo di collirio antibiotico (*Nettacin* Netilmicina Solfato, 2 gocce per 3 volte/die) che verrà protratto sino ad un mese dall'intervento, sino a quando non verrà eliminata anche la lente a contatto terapeutica.

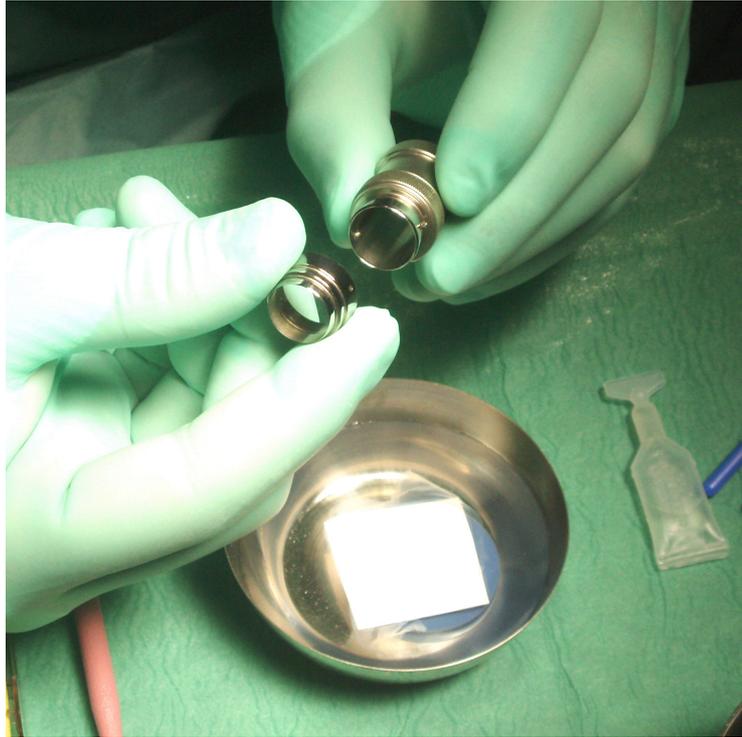


Figura 6: inserimento di lama circolare sul manipo per il taglio della membrana amniotica

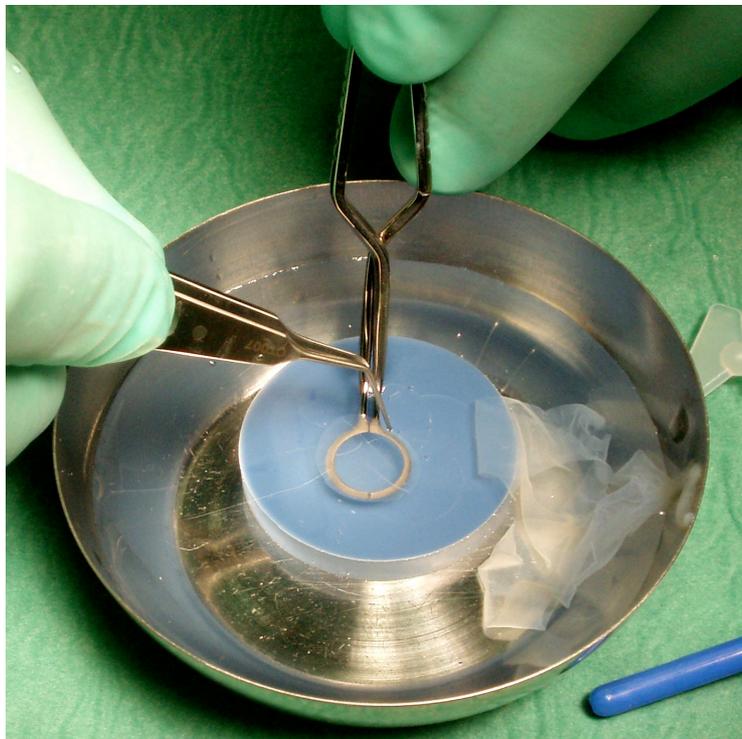


Figura 7: posizionamento del patch di membrana amniotica precedentemente tagliata sull'apposita pinza



Figura 8: immersione del patch di membrana amniotica, già posizionato sulla pinza, nella trombina

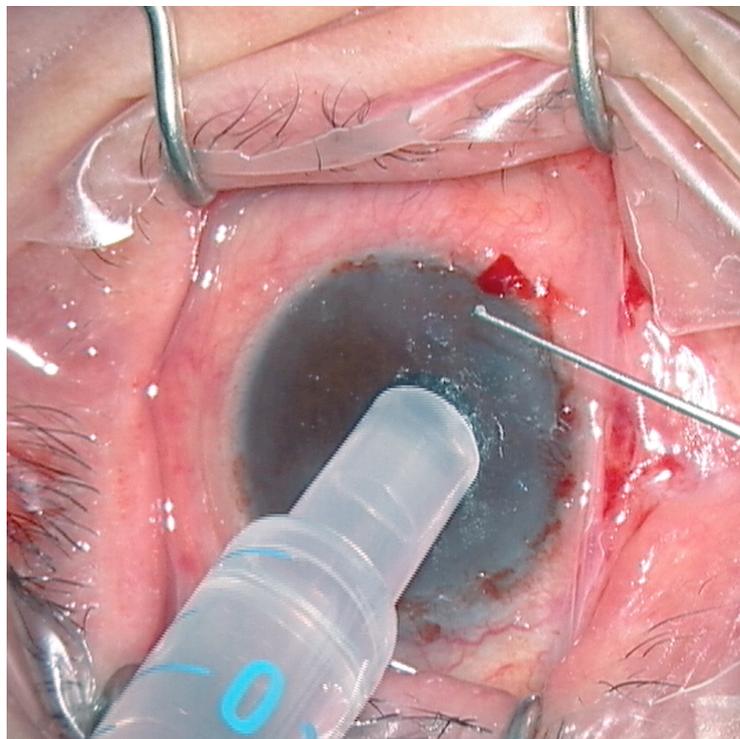


Figura 9: distribuzione uniforme sulla superficie corneale di fibrinogeno con spatola di Barraquer



Figura 10: posizionamento del patch di membrana sulla superficie corneale

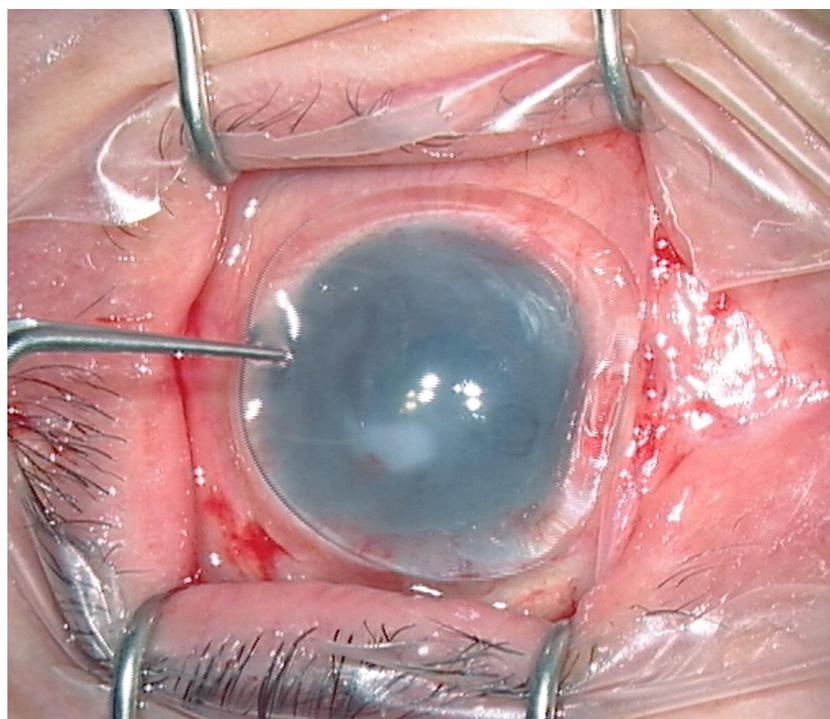


Figura 11: apposizione di lente a contatto terapeutica a fine intervento

4.3 Strumenti chirurgici dedicati

Poiché la membrana amniotica risulta essere un tessuto estremamente sottile e di difficile lavorazione, dovendo essere manipolato in immersione, si è reso necessario lo studio di strumenti idonei al trasporto sul campo operatorio e alla distensione della stessa. Questa necessità nasce inoltre dall'utilizzo della colla di fibrina come unico strumento atto alla fissazione della membrana sull'epitelio corneale. Una delle principali caratteristiche della colla di fibrina è il tempo di polimerizzazione dei suoi due elementi, di circa 3 secondi, il che non permette al chirurgo di poter modificare la posizione del patch di membrana nel momento in cui la colla lo fissa. La membrana deve essere quindi già ben distesa e centrata nel momento in cui viene adagiata sulla superficie corneale.

Sono per tanto stati ideati e progettati due strumenti: uno atto a facilitare la funzione di taglio e renderla più precisa, in modo da ottenere un patch circolare del diametro idoneo alla patologia da trattare e l'altro atto allo spostamento ed alla applicazione del patch così ottenuto sulla superficie corneale.

Il primo strumento (Fig. 12) è un trapano a lama circolare costituito da un manipolo cilindrico zigrinato per aumentarne il grip nelle mani del chirurgo, sul quale si possono fissare lame di differente diametro (da 12 a 16 mm). Questo strumento viene utilizzato esercitando un'idonea pressione sulla membrana preventivamente adagiata su un tampone di silicone in immersione.



Figura 12: fase di ideazione e realizzazione del punch per taglio della membrana amniotica

Il secondo strumento (Fig. 13-14) è una pinza a branche curve che lavorano in contrapposizione permettendo così di svincolare lo strumento chirurgico nel momento in cui viene appoggiato alla superficie corneale. Le branche, di larghezza pari ad 1 mm, vanno a costituire un anello del diametro di 8,50 mm, sul quale viene adagiato il patch di membrana durante il trasporto e il posizionamento sulla superficie corneale. La superficie superiore delle branche viene trattata con sabbiatura, in modo da aumentare l'attrito con il tessuto, la parte inferiore invece viene lucidata, in modo da garantire un ottimo scorrimento sulla superficie oculare.

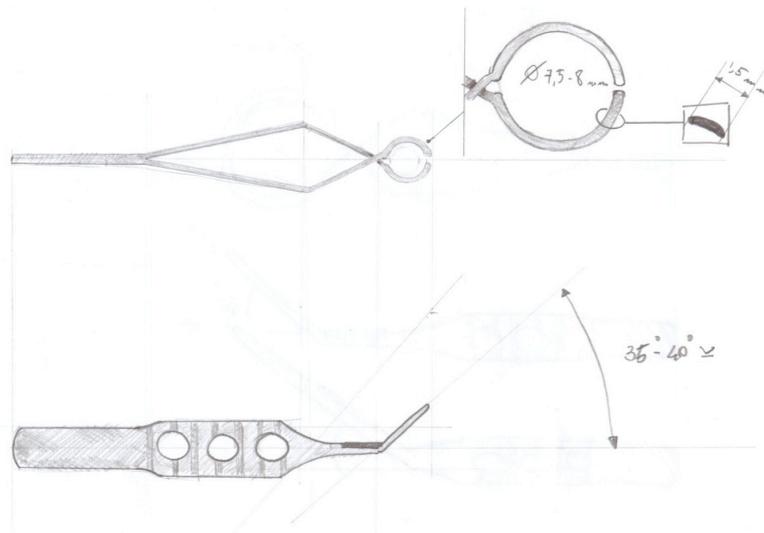


Figura 133: fase di ideazione della pinza



Figura 14: pinza realizzata per apposizione della membrana amniotica

5. RISULTATI

Sono stati studiati 15 casi di ulcera corneale trattata con innesto di membrana amniotica con colla di fibrina senza l'utilizzo di punti di sutura.

Durante il primo controllo, il giorno seguente l'intervento, tutti i 15 pazienti da noi trattati riferiscono assenza di dolore e di altri sintomi soggettivi quali bruciore, sensazione di corpo estraneo o fastidio. All'esame microscopico con lampada a fessura, la lente a contatto terapeutica risulta essere in sede, la membrana appare ben distesa, adesa completamente sui 360°, aderente interamente alla superficie corneale, senza sollevamenti o pieghe; la congiuntiva appare leggermente iperemica, senza però segni di infiammazione franca o flogosi. Il tono bulbare è nei limiti, ovvero compreso tra gli 11 e i 21 mmHg.

Ad un mese dall'intervento il quadro obiettivo mostra una riduzione dell'ulcera sottostante e i pazienti riferiscono un miglioramento soggettivo dei sintomi. All'esame con lampada a fessura la membrana appare tenacemente adesa all'epitelio corneale, ben distesa e protetta dalla LAC, che viene rimossa ad un mese dall'intervento. A 3 mesi dall'intervento i pazienti vengono sottoposti ad un esame dell'acuità visiva mediante la lettura di tavole ottotipiche standardizzate per lontano.

Paziente	Visus Pre-Operatorio	Visus Post-Operatorio (3 mesi)	Complicanze
L.C.	1/20	1/10	/

L.M.	1/10	3/10	Adesione imperfetta MA
D.R.	1/20	1/10	/
G.B.	1/20	1/10	/
F.P.	1/50	2/10	/
L.P.	1/10	3/10	/
L.P.	1/20	2/10	/
I.P.	1/10	4/10	/
P.I.	1/20	1/10	/
M.B.	1/20	2/10	/
E.F.	1/50	1/20	/
A.R.	2/10	5/10	/
E.F.	3/10	5/10	/
G.B.	1/20	2/10	/
P.F.	1/10	4/10	/

Tabella 1: visus pre e post operatorio, complicanze

Tutti pazienti vengono seguiti con controlli periodici a scadenza mensile durante i quali si apprezza il progressivo riassorbimento della membrana.

A 3 mesi dall'intervento la membrana appare completamente riassorbita. I pazienti riferiscono un soddisfacente recupero dell'acuità visiva. L'esame al biomicroscopio mostra una cornea trasparente, con risoluzione completa del quadro patologico iniziale. Nell'80% dei casi è stato possibile apprezzare una risoluzione dell'ulcera con esito leucomatoso. Nei casi in cui fosse stato presente un ulteriore deficit profondo del tessuto corneale, questo è stato colmato completamente dall'apposizione di vari strati di membrana, consentendo una perfetta ricostruzione dell'integrità dello stroma corneale.

Solo in 1 caso trattato con innesto di membrana amniotica senza punti di sutura si è presentata una complicanza, insorta nel periodo post operatorio: nei primi giorni dopo l'intervento si è verificato lo spostamento

della membrana: questa complicanza ha richiesto la revisione dell'adesione del patch con reinserimento della colla e fissaggio definitivo del tessuto.

La complicanza è stata valutata e trattata precocemente e non ha inficitato l'esito del trattamento.

I pazienti sottoposti a tecnica SLAM sono stati valutati, sia nei controlli precoci che in quelli più tardivi, ad esame della microscopia confocale e a studio con Visante-OCT.

La microscopia confocale è un esame ad altissima risoluzione che permette di studiare la morfologia e le eventuali alterazioni di tutti gli strati che compongono la cornea.

Lo strumento da noi utilizzato è un *Confoscan 4*, prodotto da NIDEK TECHNOLOGIES. Si tratta di un microscopio vero e proprio che scansiona l'intero spessore corneale e da un computer che analizza e elabora le immagini (fino a 350) ottenute durante l'esame. La registrazione dei profili di intensità luminosa caratteristici di ogni strato corneale è data dalla curva z , rappresentata da un grafico delle riflettività dei vari strati. Con tale tecnica diagnostica si ottengono quindi scansioni della cornea estremamente precise (dell'ordine di micron) che permettono di studiare la forma e le dimensioni delle cellule di ogni singolo strato corneale.

6. DISCUSSIONE

Dalla nostra esperienza maturata in 3 anni di innesto di membrana amniotica eseguita con differenti tecniche¹³⁻²⁰, è emerso come questo tipo di innesto con colla di fibrina, risulti estremamente vantaggioso, sia per la gestione operatoria, che per il miglioramento della qualità di vita dei pazienti.

Questa tecnica inoltre costituisce una valida alternativa per il trattamento di pazienti con patologie corneali ulcerative candidati al trapianto perforante di cornea. L'utilizzo di questa metodica comporta beneficio da diversi punti di vista. Per prima cosa la possibilità di eseguire l'intervento in anestesia locale, consentendo innanzitutto di ridurre i rischi per il paziente, potendo inoltre essere eseguito anche in soggetti compromessi da un punto di vista sistemico, e in secondo luogo favorendo la possibilità di gestire il paziente in regime ambulatoriale evitando una condizione di ricovero che risulterebbe dispendiosa per la struttura e disagiata per il paziente stesso.

Rispetto alle altre tecniche con sutura classica, l'assenza di punti di sutura consente di ridurre l'irritazione post operatoria, aumentando il comfort del paziente e riducendone il disagio oculare.

Un altro vantaggio nell'utilizzo di questa tecnica eseguita con strumenti appositamente realizzati, consiste nella possibilità di gestire il patch di membrana amniotica in maniera rapida e semplice, riducendo i tempi

chirurgici e garantendo una maggior precisione ed accuratezza dell'innesto. Inoltre la colla di fibrina utilizzata con questa metodologia risulta più semplice e vantaggiosa, consentendo di ottenere un film estremamente sottile e regolare. L'adesione, al contrario della tecnica con sutura circolare, avviene su tutto l'ambito e non solamente lungo il perimetro del patch.

Le complicanze intraoperatorie sono minime e consistono principalmente nel sanguinamento dei vasi perilimbari, al quale si può rapidamente porre fine tramite la cauterizzazione degli stessi con diatermo bipolare.

Oltre ai benefici legati strettamente alla procedura chirurgica, l'innesto di membrana amniotica con colla di fibrina è un presidio terapeutico altamente vantaggioso per il paziente anche da un punto di vista sociale e di qualità di vita.

Rispetto al trapianto perforante di cornea, non richiede l'anestesia generale, necessitando di un minore tempo di ospedalizzazione, con riduzione sia dei disturbi personali che dei disagi per l'assistito e la sua famiglia.

Il paziente può riprendere a tempi molto brevi dall'intervento la sua normale attività la sociale e lavorativa.

Le eventuali complicanze, quali mancata adesione del patch di membrana, o perdita della lente a contatto terapeutica, possono facilmente e rapidamente essere risolti con intervento ambulatoriale.

In conclusione il trattamento chirurgico con innesto di membrana amniotica di patologie ulcerative della superficie corneale, non responsive

a terapia farmacologia, risulta essere oggi una delle più valide alternative del panorama chirurgico. L'utilizzo di questa nuova tecnica che sostituisce la colla di fibrina all'uso di suture corneali, rende questa tipologia di intervento più semplice e veloce per il chirurgo, maggiormente tollerata del paziente e con maggiori garanzie di risultati per il paziente ed infine meno dispendiosa per la struttura.

7. BIBLIOGRAFIA

- i Champlaud MF, et al. Human amnios contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J Cell Biol* 132(6):1189-1198, 1996
- ii Crecimanno C, et al. Immunocytochemical expression patterns of carbonic anhydrase isoenzymes in human placenta, cord and membranes. *Placenta* 14: a11, 1993
- iii Gossrau R, Graf R, Ruhnke M and Hanski C. Proteases in the human full-term placenta. *Histochemistry* 86:405-413, 1987
- iv Weser H and Kaufmann P. Lichtmikroskopische und histochemische Untersuchungen an der chorionplatte der reifen menschlichen. *Placenta Arch Gynecol* 225:15-30, 1978
- v Fukuda K, Nishida T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva. *Cornea* 18: 73-79, 1999
- vi Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor isoforms, TGF beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Phys* 179: 325-335, 1999
- vii Paradowska E, Blach-Olszewska Z, Gejdel E. Constitutive and induced cytokine production by human placenta and amniotic membrane at term. *Placenta* 18: 441-446, 1997
- viii Rooney IA, Morgan BP. Characterization of the membrane attack complex inhibitory protein CD 59 antigen on human amniotic cells and in amniotic fluid. *Immunology* 76: 541-547, 1992
- ix Kruse FE, Jousen AM, Rohrschneider K, You L, Sinn B, Baumann J, Volcker HE. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238: 68-75, 2000
- x Hao YX, Ma DK, Hwang Dg, et al. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 19: 348-352 2000
- xi Kim Jc, Tseng SC. The effect of inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol* 9: 32-46, 1995
- xii Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 20: 408-413, 2001

-
- xiii Chen HJ, Pires RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br J Ophthalmol* 84: 826-833, 2000
- xiv Talmi YP. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* 12: 285- 288, 1991
- xv Baum J. Amniotic membrane transplantation. Why is it effective? *Cornea* 21: 339-341, 2002
- xvi Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J* 15: 307-396, 1910
- xvii De Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol* 23: 522-525, 1940
- xviii Lavery W. Lime burns of conjunctiva and cornea treated with amnioplastin graft. *Trans Ophthalmol Soc UK* 66: 6668-6671, 1946
- xix Sorsby A, Haythorne J, Reed H. Amniotic membrane grafts in caustic soda burns. *Br J Ophthalmol* 31: 401-404, 1947
- xx Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14: 473-484, 1995
- xxi Martinowitz U, Schulman S. Fibrin sealant in surgery of patients with a hemorrhagic diathesis. *Thrombosis and Haemostasis*; 1995; 74: 486-92
- xxii Radosevich M, Goubran HA, Burnouf T. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. *Vox Sang* 1997;72:133-143.
- xxiii Gibble JW, Ness PM. Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion* 1990; 30 (8):741-7
- xxiv Alving BM, Weinstein JS, Finlayson JE, Menitove JE, Fratantoni JC. Fibrin sealant: summary of a conference on characteristics and clinical use. *Transfusion* 1995; 35: 783-90
- xxv Nichols W. Adverse antibody-mediated reactions to topical bovine thrombin and fibrin glue. Symposium on Fibrin Sealant: Characteristics and Clinical Use. Bethesda, Uniformed Services University of the Health Sciences. 1994 pp 5-10
- xxvi Strada P, D'Angiolino A, Caloprisco G. Prelievo, preparazione. Conservazione e assegnazione di componenti del sangue umano per uso terapeutico non trasfusionale. *Il Servizio Trasfusionale* 2000; 6: I-XII

-
- xxvii Wan HL, Huang ST, Floyd DM, et al. Is the amount of fibrinogen in cryoprecipitate adequate for fibrin glue? Introducing an improved recycled cryoprecipitate method. *Transfusion* 1989; 29 (suppl) 41S
- xxviii Streiff MB, Ness PM. Acquired FV inhibitors: a needless iatrogenic complication of bovine thrombin exposure. *Transfusion* 2002; 42: 18-26
- xxix Kjaergard HK, Fairbrother JE. Controlled clinical studies of fibrin sealant in cardiothoracic surgery. A review. *Eur J Cardiothorac Surg* 1996; 10: 727-33.
- xxx Barabino S, Rama P, Valente C, Rolando M. *Indicazioni cliniche per il trapianto di membrana amniotica*. *Ottica Fisiopat* 2007; XII: 129-136
- xxxi Lee S, Tseng SCG. *Amniotic membrane transplantation in persistent epithelial defects with ulceration*. *Am J Ophthalmol* **123**: 303-312, 1997
- xxxii Heiligenhaus A, Bauer D, Meller D, et al. *Improvement of HSV-1 necrotizing keratitis with amniotic membrane transplantation*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 1969-1974, 2001
- xxxiii Chen HJ, Pires RT, Tseng SC. *Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers*. *Br J Ophthalmol* **84**: 826-833, 2000
- xxxiv Meller D, Pires RTF, Mark RJS. *Amniotic Membrane Transplantation for Acute Chemical or Thermal Burns*. *Ophthalmology* **107**: 980-989, 2000
- xxxv Prabhasawat P, Tesavibul N, Komolsuradej W. *Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation*. *Br J Ophthalmol* 85: 1455-1463, 2001
- xxxvi Woo HM, Kim MS, Kweon OK, et al. *Effects of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal remodeling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea*. *Br J Ophthalmol* 85: 345-349, 2001
- xxxvii Kruse FE, Meller D. *Amniotic membrane transplantation for reconstruction of the ocular surface*. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*. 2001 Sep;98(9):801-10.