



Амниотична мембрана

- Идеалната носеща матрица;
- Устойчива ембрионална тъкан;
- Среда за клетъчна адхезия, миграция, растеж, пролиферация и диференциация;
- Индуцира формиране на екстрацелуларен матрикс и подпомага възстановяването на тъканите;



История

- 1910- Davis /кожна трансплантация/;
- 1913- Stern и Sabella: биологично покритие при кожни изгаряния и повърхностни рани на кожата;
- Допълнителна тъкан при хирургична реконструкция на устната кухина, пикочния мехур и вагината;
- Тимпанопластика, артропластика, възстановяване на омфалоцеле;
- За предотвратяване на тъканната адхезия при хирургични процедури на корем, глава, таз.

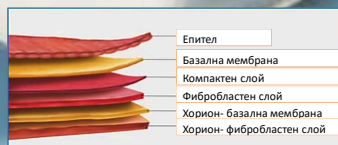


Приложение в офталмологията

- 1940г. - De Roth-биологична трансплантация при конюнктивални дефекти/**прясна** АМ, амнион и хорион/;
- 1946г. - Sorsby и 1947г.-Simmons- **химично обработена и подсушена** АМ при химични очни изгаряния;
- 1965г. - Dino и сътрудници - разделяне, стерилизация и безопасно използване дори и на по-късен етап;

1962г. Bourne, хистология...

- Монослой от кубоидални епителни клетки;
- Дебела базална мембрана;
- Строма:
 - Вътрешен компактен слой: кондензиран, ацелуларен, аваскуларен слой от колагенни влакна тип I, II, и V;
 - Среден, фибробластен слой;
 - Външен спонгиозен слой, покрит от муцин, гликопротеинов лубрикант;



Приложение в офталмологията

- 1989г.- предлагане и разпространение на съхранена АМ от Индонезийски банки:
 - ALS радиация- лиофилизирана, радиационно стерилизирана;
 - AAS радиация- въздушно изсушена и радиационно стерилизирана;
 - Съхранение 2години на стайна температура;
 - Рани от изгаряния, отворени рани, постоперативни рани, рани от диабет, лепрозни рани;

Приложение в офталмологията

- 1995г. Kim и Tseng- фокусиране върху начините на съхранение и запазване на биологичните и качества:
 - Първи експериментален модел: съхранение в 100% глицерол при 4°C за една седмица при експериментални очни заболявания при зайци;
 - Следва...криосъхранение- в 50% глицерол при -80°C/с най-добро запазване на биологичните качества/;
 - 40% подобрение на роговичната прозрачност!!!

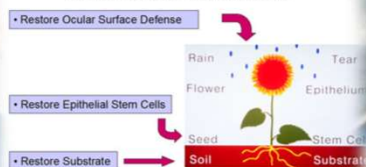


Dr. Scheffer
Tseng



Основни стратегии за реконструкция на ПОП, Sheffer Tseng MD, Ph.D

General Strategies Ocular Surface Reconstruction



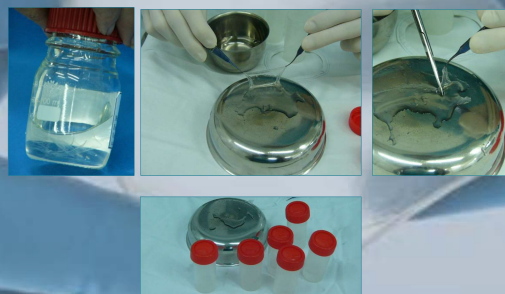
Tseng & Tsubota AJO 124:825-835, 1997
Important Concepts for Treating Ocular Surface and Tear Disorders

Амниотична мембрана в България

От 2005-2013 AM е съхранявана в глицерин
Приготвяна екс темпоре
Стандартен протокол



Първи стъпки



Първоначална оценка/селекция на донор



АНАМНЕЗА:

Изключващи критерии след снета анамнеза:

- позитивна серология на HIV, HTLV, HBV, HCV, TRNA;
- прекарани заболявания с неясна етиология;
- заболявания на ЦНС с неясен произход;
- риск от предаване на болестта чрез приони;
- системни инфекции с неясен произход;
- заболявания на женските полови органи;
- индикации за рискови фактори за инфекциозно заболяване;
- употреба на вредни вещества – CN-, Pb, Fe, Au
- ваксини;

Информирано съгласие на донора

Запознаване с....

- Целта на използваната тъкан;
- Изследванията и правото да бъде информиран за резултатите;
- Мерките за защита на донора;
- Медицинската конфиденциалност;
- Ползата от трансплантацията на амниотичната мембрана;

Аз, долуподписаният:

Имена на довора
(собствено, бащино фамилно име на донора)

ЕГН:.....;

Адрес: гр./с..... област.....;

ЖК/бул./Ул..... №.....;

бл..... вх..... ет..... ап.....;

тел:.....;

Запоната съм от д-р.....

с ползване от призоването на амниотичната мембрана в офталмологията за очно здраве – използването на тълната като биологично покритие и трансплантат с цел подобряване на зрението, възстановяване целостта и комфорта на предната очна повърхност. Известно ми е, че липсват последствия и рискове за мен и плода. Гарантирана ми е анонимност и по отношение на сбирката ми документация, и по отношение на генетична ми информация. Запоната съм с правото си да бъда информирана, както за резултатите от проведените ми лабораторни изследвания, така и от самата трансплантация.

Запоната съм подробно с дадената ми информация и давам съгласието си за вземане на плацентата.

Дата: Декларатор:
гр. Варна Подпис:

Изследване на донора и мониториране на инфекциозен статус

- Венозна кръв в серумен вакутейнер 5 ml;
- Серологични изследвания/PCR;
- Вирусологичен статус на донора: HIV I и II; anti-HBc; anti-HBs; HCV; Treponema; CMV; EBV; Toxoplasmosa;
- Микробиологичен статус на донора;
- Серологичните тестове се повтарят 3-6 месеца по-късно при серонегативните лица. АМ се съхранява под карантина до разпознаване на серонегативното състояние на донора;
- Резултатите получени от PCR дават възможност за използване на амниотичната мембрана веднага след обработката;

Оборудване, вещества и медикаменти

- Оборудване: сак, контейнери, легени, пинсети, хирургична ножица/уескот, хладилна чанта, лед
- Транспортна среда: DMEM+1% антибиотик/антимикотик;
- Hanks' balanced salt solution (HBSS) или Phosphate-buffered saline (PBS), физиологичен серум;
- Бутилка 125 ml от полипропилен/полиестерен с широко гърло;



Вземане и обработка на амниотична мембрана

В гинекологичната клиника



- Плацентата се взема от лекар-гинеколог в стерилни условия при планирано цезарово сечение след пълна бременност;
- Измива се със стерилен физиологичен разтвор /студена, течаща вода/ за 1 час до отстраняване на кръвните съсиреци;
- Тъпа дисекция- внимателно разделяне на амниона от хориона;

Вземане и обработка на амниотична мембрана

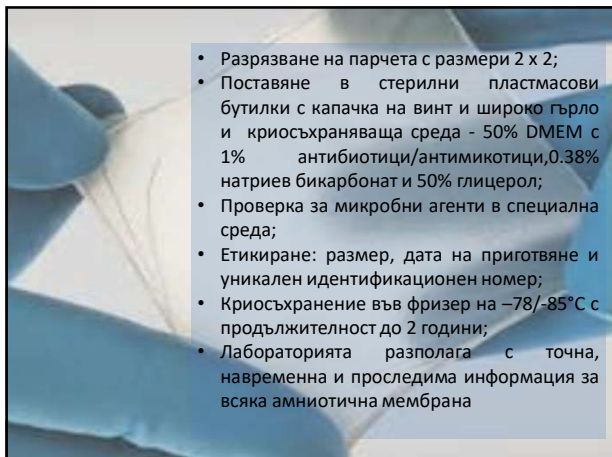
- Измиване на остатъчните кръвни съсиреци с физиологичен разтвор;
- Внимателно отстраняване на остатъците от хориона върху АМ с помощта на хирургичен пинсет;
- Поставяне на АМ в 125 ml бутилка с широко гърло с 50ml транспортна среда в свободно състояние;
- Означаване на бутилката с етикет;
- Транспорт до лабораторията от специална транспортна фирма в хладилна чанта при температура от 2 °C до 40 °C / сух лед и мониторинг;

Вземане и обработка на амниотична мембрана

В лабораторията



- Обработката при стайна температура, при стерилни условия в ламинарен бокс;
- Трикратно със стерилен физиологичен разтвор в специален стерилен леген;
- Разстилане на АМ върху стерилизирана нитроцелулозна хартия със стромата към хартията, а епителния слой/базална мембрана нагоре;
- АМ и нитроцелулозната хартия (47 mm или 25 mm): се измиват в стерилен фосфатно-буфериран разтвор съдържащ антибиотици/антимикотици;



- Разрязване на парчета с размери 2 x 2;
- Поставяне в стерилни пластмасови бутилки с капачка на винт и широко гърло и криосъхраняваща среда - 50% DMEM с 1% антибиотици/антимикотици, 0.38% натриев бикарбонат и 50% глицерол;
- Проверка за микробни агенти в специална среда;
- Етиктиране: размер, дата на приготвяне и уникален идентификационен номер;
- Криосъхранение във фризер на $-78/-85^{\circ}\text{C}$ с продължителност до 2 години;
- Лабораторията разполага с точна, навременна и проследима информация за всяка амниотична мембрана

ОБРАБОТКА НА ДАРЕНАТА ТЪКАН

- Дарената амниотична мембрана се обработва в контролирана среда, като се спазва валидирана методика.
- Обработката се състои в отделянето и почистването на амниотичната мембрана от хориона на плацентата.
- След обработката, мембраната се поставя върху нитроцелулозна хартия и се оразмерява.
- Всяка оразмерена мембрана се замразява индивидуално в пеницилиново шишенце с криопротектираща среда.



Съхранение на АМ

Етикет

- Идентификационен номер;
- Име на лабораторията;
- ID номер на банката за тъкани (включително адрес и телефонен номер);
- Вид на тъканта-криоконсервирана;
- Срок на годност;
- Статус на тъканта (под карантина, готова за употреба)

Разпространение на АМ

- **Лабораторията разполага с точна, навременна и проследима информация за всяка АМ;**
- **Етикет на транспортния контейнер:**
 - Тип тъкан – Внимание! Човешка тъкан (криосъхранена амниотична мембрана) за очна трансплантация;
 - ID номер или код
 - ID номер и име на лабораторията (включително адрес и телефонен номер) и лице за контакт в случай на нужда
 - Срок на годност;
 - Самоличността на получателя/хирурга (адрес и телефонен номер) и лице за контакт, което трябва да получи контейнера за доставка
 - Дата и час на началото на транспорта
 - Информация относно условията за транспорт/складиране, свързани с качеството и безопасността на човека и на превозвания товар

-1-
Форма за проследяване на алогографт продукт

Их. № от г.
Име на лечебното заведение:

Попълването на тази форма е задължително при употреба на графт продукти според закона за трансплантация на органи, тъкани и клетки (наредба 13 от 15.04.2004г., приложение 3 към ал.9).

Необходимо е да върнете формуляра на лабораторията към многопрофилна болница за активно лечение „Св.Марина“ ЕАД - Варна

Лечебно заведение, в което е извършена трансплантацията на амниотична мембрана:

Име:
Адрес:
Лице за контакт:

Дани за пациента:
Реципиент/ ИЗ №:
Име:
ЕГН:
Пол:
Диагноза:
Придружаващи заболявания:

Декларация за съгласие от реципиента/ или родителите му за трансплантиране на амниотична мембрана:
Долуподписания:
ЕГН:
Давам съгласието си за трансплантация на мен/ или на детето ми на амниотична мембрана
Подпис:

-2-
Форма за проследяване на алогографт продукт

Операция:
Дата на операцията:
Вид на операцията:
Име и специалност на хирурга:
Подпис:

Амниотична мембрана:
Моля, попълнете следната информация или залепете стикерите на използваните амниотични мембрани;
Необходима информация за всяка амниотична мембрана използвана при трансплантация:

Производител:
Вид:
Сериен номер/ID:
Срок на годност:

Бележки:
1. С усложнения;
2. Без усложнения;
Описание на усложненията:
Забележки (взрущена опаковка, увреден етикет и др. ...)

Моля, попълнете и върнете на посочения адрес или изпратете на факс...

Алотрансплантат – човешка амниотична мембрана в криопротектираща среда

МБАЛ "Света Марина" ЕАД - Варна

Лаборатория по клинична имунология

АИЗЯМ

КАК ДА ПОРЪЧАМЕ?

Съгласно действащото законодателство, АлоАМ – човешка амниотична мембрана в криопротектираща среда, се предоставя на лечебни заведения с регистрация в Изпълнителната агенция по трансплантация и сключили договор с МБАЛ „Света Марина“ ЕАД.

ЧОВЕШКА АМНИОТИЧНА МЕМБРАНА В КРИОПРОТЕКТИРАЩА СРЕДА

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ПРОДУКТА

- Алотрансплантат – човешка амниотична мембрана в криопротектираща среда.
- Амниотичната мембрана се обработва в Лабораторията по клинична имунология към МБАЛ „Св. Марина“ ЕАД гр. Варна, съгласно действащото законодателство на България и Европейския съюз.



Цел на съхранението

- Запазване на:
- Структурния интегритет;
- Биомеханичната стабилност;
- Активността на клетъчно сигналните фактори (цитокини, растежни фактори, протеогликани);

Топлинно изсушена

- При този метод, след подготовката на тъканта в ламинарен бокс с чистота клас 100, тъканта се изсушава една нощ в печка при температура $40 \pm 2^\circ \text{C}$. След това се стерилизира при използване на 25 KGy гама облъчване. При този метод мембраната губи много от биологичните си свойства поради високата температурна подготовка и поради това се използва като биологично покритие, основно при лечение на изгаряния.

Въздушно изсушена

- След отделянето и промиването АМ се разстила в ламинарен бокс и се излага на въздух за една нощ, за да се изсуши. След това използвайки гама-облъчване се извършва опаковане и стерилизация.
- Въпреки че при този метод не се използва висока температура, някои свойства на амниона са загубват или се променят значително вследствие дехидратацията.
- По този начин подготвена АМ също често се използва за покритие на рани.

Лиофилизирана

- Лиофилизацията е физично извличане на водата от тъканите чрез изсушаване;
- АМ се нарязва на парчета и бързо се замразява при -50 до -80°C . След това се изсушава под висок вакуум с помощта на лиофилизатор. Водата се извлича от тъканта чрез сублимация, достигаща крайно водно съдържание 5-10%. На края се извършва опаковка и стерилизация с помощта на гама-облъчване. Тази техника предизвиква минимални промени в свойствата на АМ, но води до промени в архитектурата.
- Продуктът може да се съхранява при стайна температура.
- Техниката е сложна и по-скъпа от предишните два метода.
- Тази АМ се използва главно за лечение на рани.

Съхранение в студен глицерол

- Използва 80% глицерол за изсушаване на АМ
- Глицеролът е бил използван като криопротективно средство дълго време. Благодарение на неговото високото осмотично налягане той извлича интерстициална вода от амниотичната мембрана.
- Може да се съхранява при 4° С за по-дълъг период от време, въпреки че загубва част от своите биологични свойства.
- Така съхранен амниона се използва за покритие при рани от изгаряне.

Съхранение в студен глицерол

- Криосъхранението в неговата стандартна процедура в 50% глицерол при температура -80гр. води до намаляване жизнеността на клетките, без промяна на тъканната морфология и структура. При съхранение две години не се променя стерилността и експресията на екстрацелуларните клетъчни протеини.

Роговична трансплантация

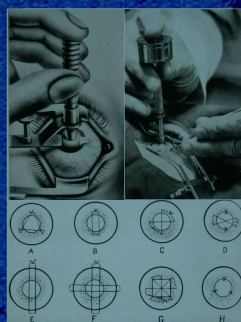
" The replacement of diseased organs by a transplant of healthy tissue has long been an objective in medicine but it has been frustrated to no mean degree by the uncooperative attempts of the body to reject grafts from other individuals"

Ivan Roitt (1993)

" Замяната на болните органи чрез трансплантация на здрава тъкан е отдавнашна цел на медицината, която е спирана от усилията на тялото да отхвърля всяка тъкан от друг индивид."

Ivan Roitt (1993)

Исторически аспекти на трансплантацията



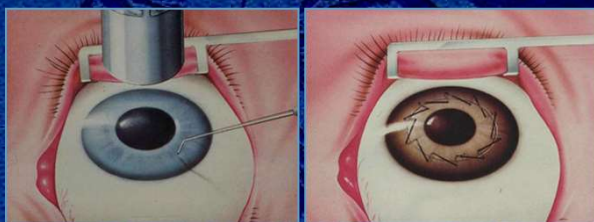
Новото време ...

1872 Henry Power

1886 Von Hippel

1905 Edward Zirm

Пенетрираща кератопластика - техника !



Имунологична привилегированост на окото

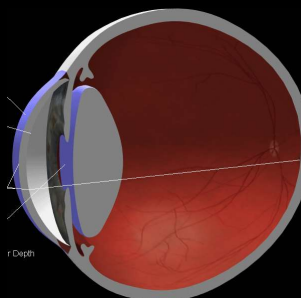
Имунологичната привилегированост като статичен механизъм

Очно-кръвна бариера
"tight junctions"

- ирисови и ретинални съдове
- цилиарен епител
- ретинален пигментен епител

Липса на съдове в роговицата

Липса на лимфен дренаж с изключение на хореоидеята и увеосклерален



Привиден успех на роговичните алотрансплантати

Първична
Неkomplицирана ПК,
до 90% преживяемост
за 2 години

Високорисковите ПК
водят до преживяемост
по-ниска от тази на
бъбреци, сърце и
черен дроб



Трупен донор

- Време след настъпване на смъртта;
- Възраст на пациента;
- Причина за смъртта;
- Очни заболявания и операции;
- Дефекти на предната очна повърхност;
- Серологични изследвания. Вирусологичен статус на донора: HIV I и II; anti-HBc; anti-HBs; HCV; Трепонема; Микробиологичен статус;

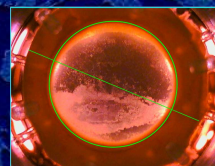
Видове донорство

- На цял булб;
- На корнеосклерален бутон;



Оценка на донорския материал

- Епител
- Строма
- Ендотел



Начини на съхранение

- Хранителна среда
- Тъканна култура



Етикетиране и транспорт

- Постоянна температура
- Без разклащане

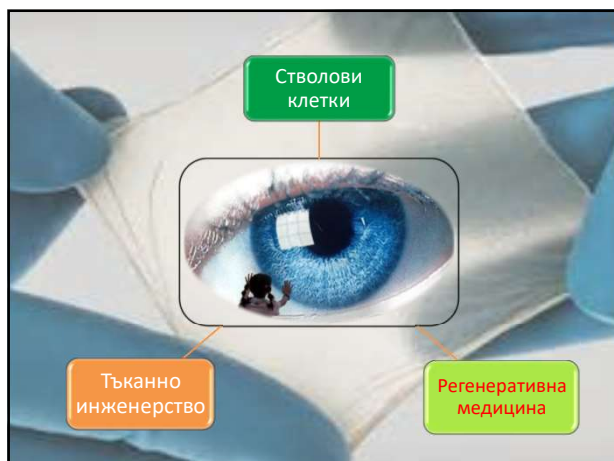


Прием на материала по процедура

- Проверка на документите
- Проверка на състоянието на опаковката
- Цветни индикатори
- Външен вид

Приложение в офталмологията

- Кератопластика в цяла дебелина
- Дълбока ламеларна кератопластика
- Смяна на ендотелно-десцеметовия комплекс
- Дълбока стромално-ендотелна кератопластика



Идеалната матрица

- Биосъвместимост!!!
- Да не произвежда токсични, вредни, канцерогенни в-ва;
- Да не предизвиква имунна реакция в живата тъкан;
- Да е устойчива на възпаление, да реагира адекватно в условията на гостоприемната тъкан;
- Да притежава механични свойства: пропускливост, стабилност, еластичност и гъвкавост; пластичност и резорбируемост;
- Да позволява клетъчната адхезия;
- Да доставя биомодулаторни в-ва, като растежни фактори и генетични материали;

Baguneid и др., 2006, Young и др., 2005, Yang и др., 2001, Walgenbach и др., 2001

Биоматериали

- Синтетични:
 - Не приличат на естествените тъкани и органи,
 - Ниска биосъвместимост;
 - Ниска способност за ремоделиране на тъканите;
- Естествени биоматериали:
 - Биосъвместимост,
 - Биоразградимост,
 - Ремоделиране;

Биоматериали

- Синтетични:
 - Метали, керамика, неразградими полимери,
- Естествени биоматериали:
 - На базата на протеини (колаген, желатин...)
 - На базата на полизахариди (целулоза, хитин/хитозан, глюкоза...)
 - Децелуларизирани тъкани и органи;

Холоклар



Бъдещето



Благодаря за
вниманието!