

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И КЛИНИЧНИ ПРИЛОЖЕНИЯ НА ИНОВАТИВЕН БИОПРОДУКТ „АЛОХИАЛ“

Катерина Боммерт

Катедра по очни болести и зрителни науки, Факултет по медицина,
Медицински университет - Варна

Научен ръководител: проф. д-р Христина Групчева, д.м.н., FEBO, FICO(Hon), FBCLA,
FIACLE; Катедра по очни болести и зрителни науки, Факултет по медицина,
Медицински университет - Варна

EXPERIMENTAL CONSIDERATIONS AND CLINICAL APPLICATIONS OF THE INNOVATIVE BIOPRODUCT ALLOHEAL®

Catherina Bommert

Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Faculty of Medicine,
Medical University of Varna

Mentor: Prof. Christina Nikolova Grupcheva, MD, PhD, DSc, FEBO, FICO(Hon), FBCLA, FIACLE;
Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Faculty of Medicine,
Medical University of Varna

Адрес за кореспонденция:

Катерина Боммерт
Факултет по медицина
Медицински университет - Варна
ул. „Марин Дринов“ 55
9002, Варна
e-mail: cathi@bommert.de

РЕЗЮМЕ

Цел: Разработване на стандартизиран алгоритъм за ex vivo култивиране на алогенни лимбални епителни стволови клетки, приложим за унифицирана трансплантация в ежедневната клинична практика.

Метод: Оценени са 32 Alloheal® биопродукта, които са произведени чрез култивиране на лимбални епителни стволови клетки, получени от алогенна роговично-склерална донорска тъкан върху криосъхранена и термолизирана амниотична мембрана. Сравняване на специално конструирано, гъвкаво устройство за трансфер на Alloheal® с масово използвания CellCrown (твърд пръстен) и оценка на клиничните трудности и резултати при трансплантация.

Резултат: Въпреки по-продължителното време, необходимо за собственоръчно пришиване на криосъхранената и лиофилизирана амниотичната мембрана към конструираното от нашия екип устройство за трансфер, се установи подобряване на техниката за трансплантация и намаляване на времето на хирургичната интервенция. Гъвкавостта и възможността за лесна манипулация спомагат за адаптация на биологичния продукт без гънки и с намален риск от травма на клетките и/или на очната повърхност и за подобряване на ефекта на хирургическото лечение. Средната оценка на Alloheal® е по-висока(5.28) при сравняване с CellCrown® - златен стандарт в повечето центрове.

Заклучение: Alloheal® е безопасен, ефективен и ефикасен метод с вече доказано клинично предимство за лечение на тежките нарушения на предната очна повърхност. Ще са необходими допълнителни изследвания и разработки за създаване на нови, универсални продукти, подпомагащи роговичната регенерация. Поради специфичните му характеристики, Alloheal® е единственият български биологичен продукт, който не е медицинско изделие.

Ключови думи: амниотична мембрана, биопродукт

Address for correspondence:

Catherina Bommert
Faculty of Medicine
Medical University of Varna
55 Marin Drinov St
9002 Varna
e-mail: cathi@bommert.de

ABSTRACT

Aim: The aim of this article is to develop and standardize an implementable algorithm for ex vivo expanding of allogenic limbal epithelial stem cells, applicable in unified transplantation in everyday clinical practice.

Methods: An evaluation of 32 proprietary Alloheal® grafts that were manufactured by cultivating limbal epithelial stem cells derived from allogenic corneoscleral donor tissue on cryopreserved and thermolysin-treated amniotic membranes was done. These were spanned within a self-prepared flexible device and an insert ring was constructed to compare and to assess a surgically acceptable modality for transfer.

Result: The time-consuming suturing procedure provided better surgical handling. Considering the importance of reduction of the surgical time, this method was seen as beneficial investment. Its flexibility and adjustability improves surgical handling and the rapid transplantation of a wrinkle-free bioproduct carries a decreased risk of trauma to the cells and/or to the ocular surface. The mean score of Alloheal® 5.28 was better when compared with the gold standard in most centers - CellCrown® 4.28.

Conclusion: We think that Alloheal® is a safe, effective and efficient method, clinically meaningful for future advancement and management of complex anterior surface disorders. Further research and development will be needed for better and even more universal products for corneal regeneration. So far, our proprietary Alloheal® is the first biological product at the Bulgarian market. It is not considered a medical device, because of its specific characteristics.

Keywords: *amniotic membrane, bioproduct*

ВЪВЕДЕНИЕ

Амниотичната мембрана с нейните биохимични и морфологични свойства има традиция в медицината и по-специално в очната хирургия (1,2). За първи път тя е използвана от DeRotth през 1940 г. (3) и Sorsby през 1946 г. (4). Само за три десетилетия трансплантацията на амниотична мембрана (АМТ) стана, от отдавна забравена възможност за лечение, златен стандарт за възстановяването на предната очна повърхност при тежки заболявания. С откриването на криоконсервирането на тъкани в средата на ХХ век (5) и възможността за дългосрочно съхранение на материалите, се откриха нови възможности за трансформиране на амниотичната мембрана в различни биопродукти и медицински изделия. Новоразработеният метод за съхранение е крайъгълният камък в трансплантацията на амниотичната мембрана, довел до промяна в перспективите и възможностите за реконструкция на предния очен сегмент в световен мащаб.

Чрез своите противовъзпалителни и антицикатрициални свойства (6), както и наличието на растежни фактори, подпомагащи епителизацията (7), амниотичната мембрана е доказано средство на избор при тежки и трудно лечими заболявания на предната очна повърхност. В последните години се засили интересът към АМ за използването ѝ като матрица и носител за ex vivo култивирани епителни стволови клетки (8) в лечението на лимбална стволова недостатъчност. Деепителизираната АМ с култивирани стволови клетки е единствен и доказан метод за лечение на тези пациенти (7, 9, 10). Няколко групи в Европа, включително и нашата, са насочили усилията си върху разработването на жизнеспособни транспланти с култивирани стволови клетки. Тази публикация е първият доклад за предизвикателствата и постиженията в

INTRODUCTION

The amniotic membrane (AM) with its biochemical and morphologic properties has a tradition in medicine, particularly in the field of surgical ophthalmology (1,2). The first ophthalmic application was introduced by DeRotth in 1940 (3) and Sorsby in 1946 (4).

Within only three decades amniotic membrane transplantation (AMT) turned from a long-time forgotten possibility for treatment into a gold standard in the reconstruction of severe ocular surface diseases. Since the establishment of tissue cryokonservation in the mid-1900s (5), the new possibility of long-term material storage opened a new opportunity not only for use on demand, but also an opportunity to transform the amniotic membrane into a variety of bioproducts and medical devices. The availability of the newly developed preservation method was the milestone of amniotic membrane transplantation and led to a change in viewpoint and possibilities in corneal and conjunctival reconstruction surgery techniques worldwide.

Due to the well-known favorable characteristics of the amniotic tissue including anti-inflammatory effects, anti-scarring effects (6), and growth factors that promote epithelial wound healing (7), AM is mainly used in the treatment of challenging, even untreatable, ocular surface diseases.

Quite recently rising scientific interest in introducing AM as a matrix and carrier for ex vivo cultivation has been observed (8). In this recently developed procedure AM is used as a scaffold for cultivating cells for reconstruction surgery in handling limbal epithelial stem cell deficiency (LESCD) (1).

Due to the fact that there are no medical treatment possibilities for restoring limbal stem cells (9), and still no fully satisfying results of conventional limbus transplantation (7), the repopulation of cultured limbal epithelial stem cells on a bio-engineered graft like the AM with devitalized epithelium is an appealing option (10). Therefore, several groups in Europe, including ours, are working on the development of viable limbal stem cell cultured

този гълъз е сложен както от технологична, така и от регулаторна гледна точка процес.

ЦЕЛ

Целта на настоящото проспективно проучване е разработването на стандартизиран алгоритъм за ex vivo култивиране на алогенни, лимбални епителни стволови клетки, приложим за унифицирана трансплантация в ежедневната клинична практика.

МЕТОДИ

Оценени са 32 биологични продукта Alloheal®, произведени в центъра по транслационна медицина и клетъчна терапия на УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна. Alloheal® е собствен биопродукт, който е създаден чрез култивиране на лимбални епителни стволови клетки, получени от алогенна, роговично-склерална донорна тъкан върху криоконсервирана и термолизирана амниотична мембрана. Клетките са култивирани в среда (DMEM) с добавени 1% човешки серум и антибиотици.

Основното предизвикателство пред нашия екип бе разработването на унифициран носител за биопrodukта и начин за трансфер, безопасен за клетките и удобен за хирургичната работа.

Корнеосклерален пръстен

Лимбалните епителни стволови клетки се вземат от донорска корнеосклера. В стерилни условия, бутоните се разфасоват по подходящ начин. Излишните остатъци от роговица, конюнктива и ирис се отстраняват, докато частта от лимбалната зона се запазва и нарязва на еднакви части с размер от 1 до 2 mm. В зависимост от характеристиките на донорския материал е възможно да бъдат получени до 20 броя корнеосклерални алогенни отрязъка.

Подготовка на AM за тъканно инженерство

Тънката и прозрачна структура на амниотичната мембрана, в съчетание с лепливия фибробластен слой, затрудняват равномерното ѝ разпределение и опъване, без да се образуват гънки. В резултат на своята еластичност и липсваща предварителна фиксация, амниотичната мембрана се контрахира и прави невъзможно равномерното култивиране на лимбалните стволови клетки. Мембраната трябва да се поддържа във фиксирана, стабилна и хоризонтална позиция, като по този начин се осигуряват най-добри условия за оптимална скорост на пролиферация. Нашият екип създаде по-гъвкав и лесен за използване носител за фиксиране на AM, вместо използвания от други групи CellCrown® (Фиг. 1).

В стерилни условия се подготвя еластичен пръстен, изработен от гъвкава пластмасова тръба с лумен от 2 mm и дължина 9 cm. Краищата на тръбата се фиксират, образувайки кръг с площ от 6,442 cm². Амниотичната мембрана се фиксира чрез пришиване с непрекъснат шев с епителната страна нагоре. Така приготвените носители се пренасят в стерилни плаки за клетъчно култивиране, като всяка плака съдържа 6 ямки (Фиг. 2).

transplant. This paper is the first report on the challenges and achievements in this process.

AIM

The aim of this article is to develop a step-by-step algorithm for ex vivo expanding of allogenic limbal epithelial stem cells, and developing of a bioproduct applicable in everyday clinical practice.

METHODS

The study included a prospective evaluation of 32 biological products, fully manufactured in the Laboratory for Translational Medicine at St. Marina University Hospital, Varna. The study was approved by the local Ethics Committee. The Alloheal® bioproduct was manufactured by cultivating limbal epithelial stem cells derived from allogenic, corneoscleral donor tissue on cryopreserved denuded amniotic membranes acting as a scaffold. The cells were cultured in DMEM–Dulbecco's Modified Eagle Medium with the addition of 1% human serum and antibiotics. The principal challenge is to develop the uniform carrier for the formed bioproduct comprised of acellular amniotic membrane and uniformly differentiated allo-limbal stem cells, and then to develop a surgically acceptable modality for transfer.

Cornea and Corneoscleral Rims

Limbal epithelial stem cells are taken from surplus corneoscleral donor rims. Under sterile conditions under the laminar flow cabinet, the cadaveric buttons were cut with a scalpel in equally sized pieces. The redundant parts of the central cornea, conjunctiva and iris were removed, until only parts of the limbal region were left and cut in sizes of 1 to 2 mm. It is possible to generate up to 20 pieces depending on the donor characteristics.

Anchoring the AM for Tissue Engineering

The sticky fibroblast layer of the AM and a very thin transparent structure makes it challenging to prepare a final product, which is stretched out without wrinkles, with accurate alignment for cell seeding, and without further contraction. Without fixation, the amniotic membrane contracts due to its elasticity and makes the equal cultivation of limbal epithelial stem cells impossible. The membrane needs to maintain a stable, fixed and horizontal position to provide an optimal environment for optimal proliferation rate. Although other groups are using CellCrown® as a fixation device, we decided to customize a more flexible and easier-to-use carrier (Fig. 1).

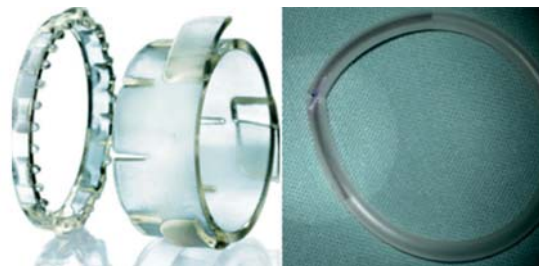


Fig. 1. Fixation of AM with a CellCrown (A) and flexible ring (B)

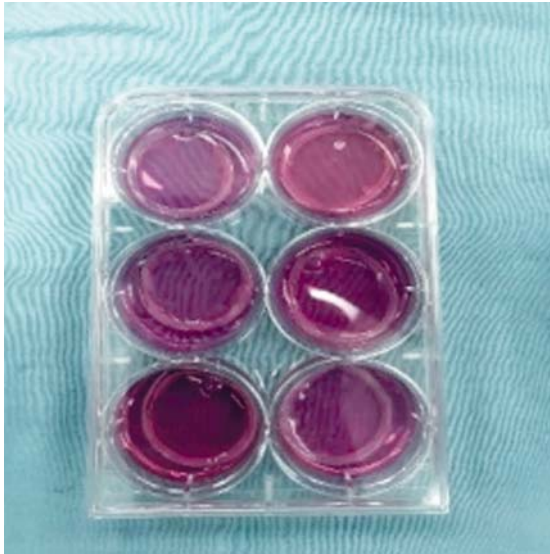


Fig. 2. Load for prepared carriers, with basement membrane facing up

В рамките на 3-4 седмици амниотичните мембрани се покриват изцяло от слой стволови клетки. Контролът се осъществява по два независими метода – контрастна микроскопия на културите и имунохистохимично оцветяване на остатъчните части от биопродукта след трансплантацията му. На фиг. 3 е представена хистофотография на Alloheal®, показваща зрели, добре диференцирани епителни, стволови клетки. Разработен е алгоритъм за клинично приложение, описващ всяка стъпка на трансплантацията, който не е обект на тази статия. Извършена е и оценка на всяка стъпка от хирургичното приложение чрез скала от 2 до 6: работа с контейнера, измиване преди превърляне към очната повърхност, превърляне към очната повърхност, ориентиране преди изрязването (Табл. 1).

РЕЗУЛТАТИ

Въпреки по-продължителното време, необходимо за собственоръчно пришиване на криосъхранената и лиофилизирана амниотичната мембрана към конструираното от нашия екип устройство за трансфер, се установи подобряване на техниката за трансплантация и намаляване на времето на хирургичната интервенция. Значителни предимства на Alloheal® са неговата гъвкавост, лесната манипулация и голямата адаптивност, които са предпоставка за осъществяване на трансплантация, без да бъде компрометиран материалът, запазвайки по-голямата част от клетките на индуцираната популация. От своя страна това намалява риска от контрахиране на мембраната по време на адаптирането ѝ към очната повърхност. Наблюдаваните предимства, заедно със статистиката, са дадени в таблица 1.

Ръчно конструираното от нашия екип устройство ясно доказва, че осигурява възможност за лесна работа



Fig. 3. HE staining of Alloheal®, demonstrating vital, well differentiated cells

A flexible device was prepared under sterile conditions. The round carrier was facilitated by a flexible plastic tube with a lumen of 2 mm and was cut in a length of 9 cm in order to form a platform with an area of 6.442 cm². The ends of the tube were fixed, forming a perfect ring-shaped device. The amniotic membrane was sutured with interrupted sutures with the epithelial/basal membrane side up, maintaining optimal tension. The prepared carriers were packed in a special bath dish. Each load contained 6 carriers (Fig. 2).

Within 3 to 4 weeks AM was fully covered by a layer of stem cells. Control was exercised in two ways - by phase contrast microscopy in culture and by special immunohistochemistry stain from surplus after transplantation. The histology of Alloheal® is demonstrated on Fig. 3. An algorithm for clinical application was developed in order to provide step-by-step instructions for clinical use. This algorithm is not a subject of this paper. However, the surgical application was assessed using a 2-6 grading scale for: handling from the container, washing before transfer to the ocular surface, transfer to the ocular surface, adjustment for cutting, cutting and adaptation.

RESULTS

The time-consuming suturing procedure provided better surgical handling, and considering the importance of reduction of the surgical time was encountered as beneficial investment. The flexibility and adjustability of the biological product and its easy use were significant advantages, these combined with the precondition for no-touch technique, lead to the preservation of most of the cells from the induced population. This modality also reduces the risk of membrane contraction during the tailoring on the ocular surface. The encountered advantages, together with the statistics are provided in Table 1. It is clear that the custom-made device provided easy handling and ocular surface adaptation with less trauma to the cells as well as to the ocular surface.

For the period of experimental follow-up 32 products were prepared and 31 of them were used in real surgery. Each product demonstrated good cell population, evaluated by phase contrast microscopy as demonstrated on Fig. 4. The surgical outcomes will not be reported here, but in general significant ocular surface

Table 1. Comparison of CellCrown® (n=12) and a custom ring of Alloheal® (n=20), using the 2-6 grading scale from surgical point of view

Method/Stages of the Surgical Process	Handling from the Container	Washing before Transfer to the Ocular Surface	Transfer to the Ocular Surface	Adjustment for Cutting	Cutting and adaptation	Mean Evaluation Score
CellCrown	5.5	4.8	4.3	3.7	3.1	4.28
Custom ring Alloheal	5.6	4.7	5.6	5.6	4.9	5.28
Statistical significance	P=0.1	P=0.32	P=0.031	P=0.01	P=0.002	P=0.04

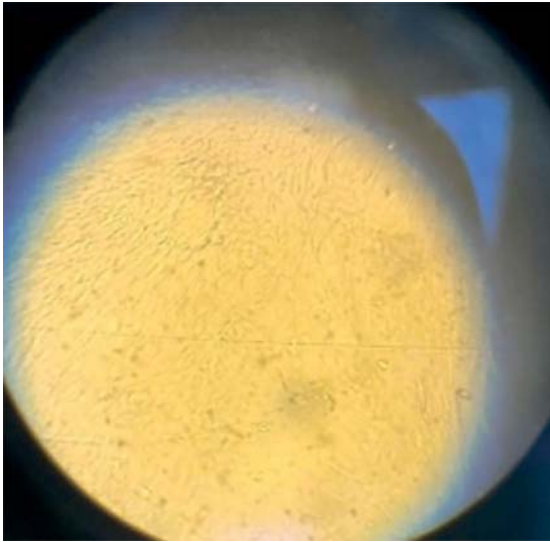


Fig. 4. Overview of the cell population after 3 weeks of cultivation

и адаптация, както и че е по-малко травматично за култивираните клетки и предната очна повърхност. За периода на експериментално проследяване бяха подготвени 32 продукта, като се извърши трансплантация на 31 от тях. Всеки продукт демонстрира добра клетъчна популация, оценена чрез контрастна микроскопия, както е показано на Фиг. 4. Хирургичните резултати няма да бъдат докладвани тук, но като цяло се наблюдава значително подобрение в състоянието на предната очна повърхност (намалена болка, подобро зрение и намалено зачервяване). За проследения период не са възникнали усложнения. Трябва да се отбележи, че обективното подобрение включва не само намалено възпаление и по-бързо възстановяване, но и известна степен на регенерация на стромата. Демонстрира се увеличение на роговичната дебелина с 40-80 микрона при 5 пациенти с десеметоцеле (Фиг. 5). Този интересен феномен ще бъде предмет на бъдещи проучвания.

ДИСКУСИЯ

Лимбалните стволови клетки имат важно значение за роговичното здраве. Предната очна повърхност и лимбът могат да бъдат засегнати след химически или топлинни изгаряния, очен пемфигоид, инфекции на роговицата и др., които неизбежно водят и до лимбална стволова недостатъчност. Загубата или пълното унищожаване

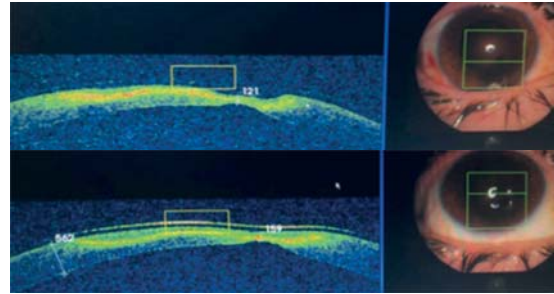


Fig. 5. Dynamics of the corneal thickness in a patient with impending perforation before and 20 days after Alloheal® transplantation

improvement (reduced pain, improved vision and decreased redness) was observed in all cases. No complications were encountered for the experimental period. Interestingly, objective improvement included not only reduced inflammation and improved healing but also some degree of stromal regeneration. In 5 patients with descemetocoele, the corneal thickness changed significantly with 40-80 microns (Fig. 5). This interesting phenomenon is a subject of further ongoing studies.

DISCUSSION

Gravely pathologic destructions of the limbal epithelial stem cells of the cornea due to chemical or thermal burns, ocular pemphigoid or infections can lead to limbal stem cell deficiency. A loss or total destruction of limbal epithelial cells invariably heals with conjunctivalization, neovascularization, chronic inflammation, opacification of the cornea, and recurrent or persistent corneal epithelial defects.

Throughout the last decade the therapeutic techniques of ocular surface reconstruction have been significantly improved by the introduction of AMT and limbal epithelial stem cell transplantation.

Ever since the establishment of tissue cryoconservation in the mid-1900s (5), the new possibility of long-term material storage removed the inconvenient time-dependency between the initiation of the process and AMT.

The option of newly developed preservation methods was the milestone of amniotic membrane products and provoked a change in the viewpoint and possibilities in corneal and conjunctival reconstruction surgery techniques worldwide.

Due to its favorable characteristics (6,7), AM provokes new interest as a culture substrate for ex vivo cultivation of limbal epithelial stem cells. Since there is no treatment for restoring limbal stem cells (9) the repopulation of cultured limbal epithelial

на лимбални епителни клетки е основната причина за конюнктивализация, неоваскуларизация, хронично възпаление и рецидивиращи или персистиращи епителни дефекти, като това неизбежно води до нарушаване на оптичната функция на розовицата, хронична болка и трайно нарушаване на качеството на живот.

През последното десетилетие терапевтичните техники за реконструкция на очната повърхност се промениха значително на база различни техники на трансплантация на амниотична мембрана. Особено обещаващи са методиките с *ex vivo* култивирането на лимбални епителни стволови клетки.

С въвеждането на криоконсервирането на тъканите през 20-и век (5) и възможността за дългосрочно съхранение на материалите, трансплантацията на АМ се оказва най-гъвкавата методика за менажиране на предната очна повърхност. Новоразработените методи за съхранение са крайгълният камък в производството на продукти от АМ и провокираха промяна в гледната точка и възможностите за реконструкция на предния очен сегмент в световен мащаб.

Напоследък нараства интересът към АМ като субстрат за *ex vivo* култивиране на лимбални епителни стволови клетки (6,7). До този момент няма открит метод за *in situ* възстановяване на собствените лимбални стволови клетки (9) и култивирането им върху децелулирана АМ е обещаващо за тъканното инженерство.

Следвайки тази цел, успяхме да произведем биологичния продукт Alloheal® от алогенна корнеосклерална донорска тъкан и криоконсервирана АМ, създавайки алгоритъм за *ex vivo* култивиране. Впоследствие разработихме успешно персонализиран универсален носител за Alloheal® под формата на гъвкав пръстен, който дава стабилност, но също така и достатъчно гъвкавост за най-доброто жизнеспособно култивиране, безопасно транспортиране и ефективно хирургическо приложение.

Въпреки удълженото време за закрепване на децелулираната АМ към конструирания от нашия екип гъвкав пръстен, спрямо стандартния метод – CellCrown®, се установи подобряване на трансфера и адаптацията на биологичния продукт. Улеснението при работата с Alloheal® води до по-добър хирургичен резултат, чрез намаляване на усложненията и травмата на култивираните клетки и предната очната повърхност.

Вече има серия от пациенти, при които имаме документирана значителна регенерация не само на епитела, но и на стромата, подобрение на зрителната острота, намаляване на зачервяването и болката. За периода на изпитването не са наблюдавани усложнения по време на възстановяването и регенерацията на очната повърхност.

Нашите резултати, съпоставими и с други проучвания, показват, че АМ е отлична среда за култивиране на лимбални епителни клетки, което я прави ефективен, сигурен и значим метод за напредъка на реконструктивната хирургия на преден очен сегмент. Като се имат предвид различните техники в отделните операционни зали,

stem cells on denuded AM as a bio-engineered scaffold makes the handling promising.

Following this goal, it was possible for us to generate the biological product Alloheal® from allogenic corneoscleral donor tissue and cryopreserved denuded AM, together with a promising algorithm for *ex vivo* cultivation. Further, we managed to prepare a customized uniform carrier for the Alloheal® graft in the form of a flexible ring, which provides stability but also enough flexibility for best viable cultivation, transportation and surgical application.

Even though the self-customized flexible ring proved to be more time-consuming in anchoring the membrane than using an existing insert crown, the flexible ring saved time by providing more precise surgical application, transfer and better adjustment at cutting. Decreased surgery time was achieved by overall easier handling and a better surgical outcome was accomplished by reducing complications and trauma to the cells and ocular surface.

Furthermore, we could recognize significant improvements, including reduced redness, reduced pain and improved vision and also stromal regeneration in several patients, without any complications in ocular surface regeneration in all cases.

Our results, also comparable with other studies, have shown that AM is a perfect scaffold material and that cultivation of limbal epithelial cells on AM is an effective, safe and meaningful method for the advancement of ocular surface reconstruction.

CONCLUSION

We think that developing a biological product Alloheal® is a safe, effective and efficient method for managing complex anterior surface disorders. As these are the first steps in the country we paid special attention to ensuring easy handling of our product, which will reduce the operation time in the interest of patient. Considering the variabilities between surgical theatres, our surgeons developed an algorithm to facilitate application in standard clinical practice. Of course, further research and development will be needed for the creation of better and even more universal products for corneal regeneration. So far, our proprietary Alloheal® is the first biological product. It is not considered a medical device, because of its specific characteristics.

Acknowledgement

This work is part of the University self-sponsored research, project number KS 1265, and there is no financial disclosure. We acknowledge the contribution of the laboratory staff of the Sector for Translational Medicine, St. Marina University Hospital, as well the fellow residents Dr. Mladena Radeva and Dr. Maria Boyadzhieva.

REFERENCES

1. Meller D, Pauklin M, Thomasen H, Westekemper H, Steuhl KP. Amniotic membrane transplantation in the human eye. *Dtsch Arztebl Int.* 2011a;108(14):243-8. doi: 10.3238/arztebl.2011.0243.
2. Mamede AC, Botelho MF, editors. Amniotic membrane: Origin, characterization and medical applications. Springer Netherlands; 2015.

нашите хирурзи разработиха алгоритъм за улеснение на приложението му в стандартната клинична практика. Ще са необходими допълнителни изследвания и разработки за създаване на нови, универсални продукти, подпомагащи роговичната регенерация. Поради специфичните му характеристики, Alloheal® е единственият български биологичен продукт, който не е медицинско изделие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработеният нов български биологичен продукт Alloheal® показва висок профил на безопасност и е ефикасен и ценен метод за комплексно лечение на нарушенията на предната очна повърхност. Тъй като това са първи стъпки на подобен продукт в страната, отделихме специално внимание в осигуряването на модел за лесно манипулиране, което ще намали оперативното време в интерес на хирургичния резултат.

Този доклад е част от научен проект на Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ - Варна с номер KS 1265 и е без финансови интереси. Изказваме благодарност за сътрудничеството на екипа на Центъра по транслационна медицина и клетъчна терапия на УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна, както и на д-р Радева и д-р Бояджиева.

3. de ROTTH A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch Ophthalmol.* 1940;23(3):522-5. doi:10.1001/archophth.1940.00860130586006.
4. Sorsby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (burns of the second degree). *Br J Ophthalmol.* 1946; 30(6):337-45. doi:10.1136/bjo.30.6.337.
5. Kim JC, Tseng SCG. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol.* 1995;9(1):32-46. doi: 10.3341/kjo.1995.9.1.32.
6. Tseng SC, Espana EM, Kawakita T, Di Pascuale MA, Li W, He H, et al. How does amniotic membrane work? *Ocul Surf.* 2004;2(3):177-87. doi:10.1016/S1542-0124(12)70059-9.
7. Meller D, Pauklin M, Thomasen H, Westekemper H, Steuhl KP. Amniotic Membrane Transplantation in the Human Eye. *Dtsch Arztebl Online* 2011b. doi: 10.3238/arztebl.2011.0243.
8. Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: Amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol.* 2003;48(6):631-46. doi:10.1016/j.survophthal.2003.08.003.
9. Jain P, Jhagta H. Limbal stem cell deficiency: A review. *J Clin Ophthalmol Res.* 2015;3(2):71. doi:10.4103/2320-3897.156582.
10. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol.* 1998; 116(4):431-41. doi:10.1001/archophth.116.4.431.