

Amnijska membrana kot biološki nosilec, njena priprava in uporaba v regenerativni medicini v Sloveniji

The amniotic membrane as a biological scaffold, its preparation and use in regenerative medicine in Slovenia

Tina Cirman,¹ Taja Železnik Ramuta,² Zala Lužnik,³ Marko Hawlina,³ Petra Schollmayer,³ Dragica Smrke,⁴ Mateja Erdani Kreft²

Izvleček

Amnijska membrana (AM) je notranja stran posteljice, ki obdaja in ščiti plod. AM je sestavljena iz večplastne strukture, ki jo gradijo amnijske epitelne celice, amnijske mezenhimske stromalne celice, bazalna lamina in vezivno tkivo. Iz njene zgradbe izhajajo tudi lastnosti AM, zaradi katerih se že vrsto let uporablja v terapevtske namene, predvsem v oftalmologiji, saj pospešuje epiteli-zacijo, deluje kot substrat za celice, zmanjšuje fibrozo in neovaskularizacijo tkiva ter deluje protimikrobno. Zaradi mehanskih lastnosti AM, ki so posledica predvsem molekul zunajceličnega matriksa bazalne lamine in vezivnega tkiva ter različnih rastnih dejavnikov, ki jih vsebuje, se AM v zadnjih letih vedno pogosteje uporablja tudi kot biološki nosilec v regenerativni medicini.

Regenerativna medicina je interdisciplinarno področje raziskovanja in kliničnih aplikacij, ki uporablja načela bioloških in inženirskih znanosti za razvoj nadomestkov živih tkiv ali organov. V regenerativni medicini ločimo tri pristope: 1. vsaditev funkcionalnih celic, med drugim tudi matičnih celic, v poškodovano ali okvarjeno tkivo; 2. preoblikovanje poškodovanega ali okvarjenega tkiva z uporabo različnih sintetičnih ali naravnih materialov; 3. tkivno inženirstvo, tj. uporabo ustreznih nosilcev, ki spodbujajo rast tkivno specifičnih celic in oblikovanje novega tkiva. V prispevku predstavljamo uporabo AM kot biološkega nosilca v regenerativni medicini v Sloveniji.

Abstract

Amniotic membrane (AM) is the innermost layer of the placenta, surrounding and protecting the embryo. AM is a multilayered tissue composed of amniotic epithelial cells, amniotic mesenchymal stromal cells, basal lamina, and stroma. AM's properties, which are the result of its structural features, render it extremely useful for therapeutic purposes, since it enhances epithelisation, is a substrate for cell growth, decreases fibrosis and tissue neovascularisation and has antimicrobial properties. Due to its mechanical properties, which are mostly a result of the basal lamina's and stroma's extracellular matrix, and different growth factors that it contains, AM is increasingly used as a biological scaffold in regenerative medicine.

Regenerative medicine is an interdisciplinary field of research and clinical applications, utilising principles of biological and engineering sciences for the development of viable tissue or organ substitutes. In regenerative medicine, we distinguish between three approaches: 1) engraftment of functional cells (including stem cells) into the damaged or defective tissue; 2) reshaping of the damaged or defective tissue using synthetic or natural materials; and 3) tissue engineering, i.e. the use of scaffolds for the enhancement of the growth of tissue-specific cells and development of new, regenerated tissue. Furthermore, we present the use of AM as a biological scaffold in regenerative medicine in Slovenia.

¹ Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana, Slovenija

² Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana Slovenija

³ Očesna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

⁴ Kirurška klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Korespondenca/

Correspondence:

Mateja Erdani Kreft,
e: mateja.erdani@mf.uni-lj.si

Ključne besede:

amnijska membrana;
biološki nosilec;
regenerativna medicina;
oftalmologija;
dermatologija; urologija;
matične celice

Key words:

amniotic membrane;
biological scaffold;
regenerative medicine;
ophthalmology;
dermatology; urology;
stem cells

Prispelo: 2. 1. 2018

Sprejeto: 15. 10. 2018

Citirajte kot/Cite as: Cirman T, Ramuta TŽ, Lužnik Z, Hawlina M, Schollmayer P, Smrke D, Kreft ME. [The amniotic membrane as a biological scaffold, its preparation and use in regenerative medicine in Slovenia]. *Zdrav Vestn.* 2018;87(11–12):530–46.

DOI: 10.6016/ZdravVestn.2684

1 Zgradba in lastnosti amnijske membrane

Posteljica (placenta) je zgrajena iz materinega in zarodkovega dela. Slednjega sestavljata horion (zunanja plast) in amnijska membrana (notranja plast) (1). Amnijska membrana (AM) je neoživčena in neožiljena struktura debeline 0,02–0,5 mm, ki obdaja in ščiti zarodek oz. kasneje plod ter vzdržuje homeostazo amnijske tekočine (2) (Slika 1A). Na zarodek meji enoskladni epitel amnijskih epitelnih celic (AEC), ki imajo apikalno plazmalemo povečano z mikrovili. Na meji med epitelom in vezivnim tkivom (stromo) je bazalna lamina. Stroma je zgrajena iz kompaktne plasti, plasti amnijskih mezenhimskih stromalnih celic (AMSC) in gobaste plasti. AM z gobasto plastjo strome meji na horion (Slika 1) (3).

K integriteti in biokemijskim lastnostim AM pomembno prispevajo stični proteini med AEC (okludin, klavdin-3 in klavdin-4, dezmozoplakin) in sestavine zunajceličnega matriksa bazalne lamine ter strome AM (kolagen tipa I, III, IV, V, VI, laminin, fibronektin, hialuronan in drugi proteoglikani) (4–9).

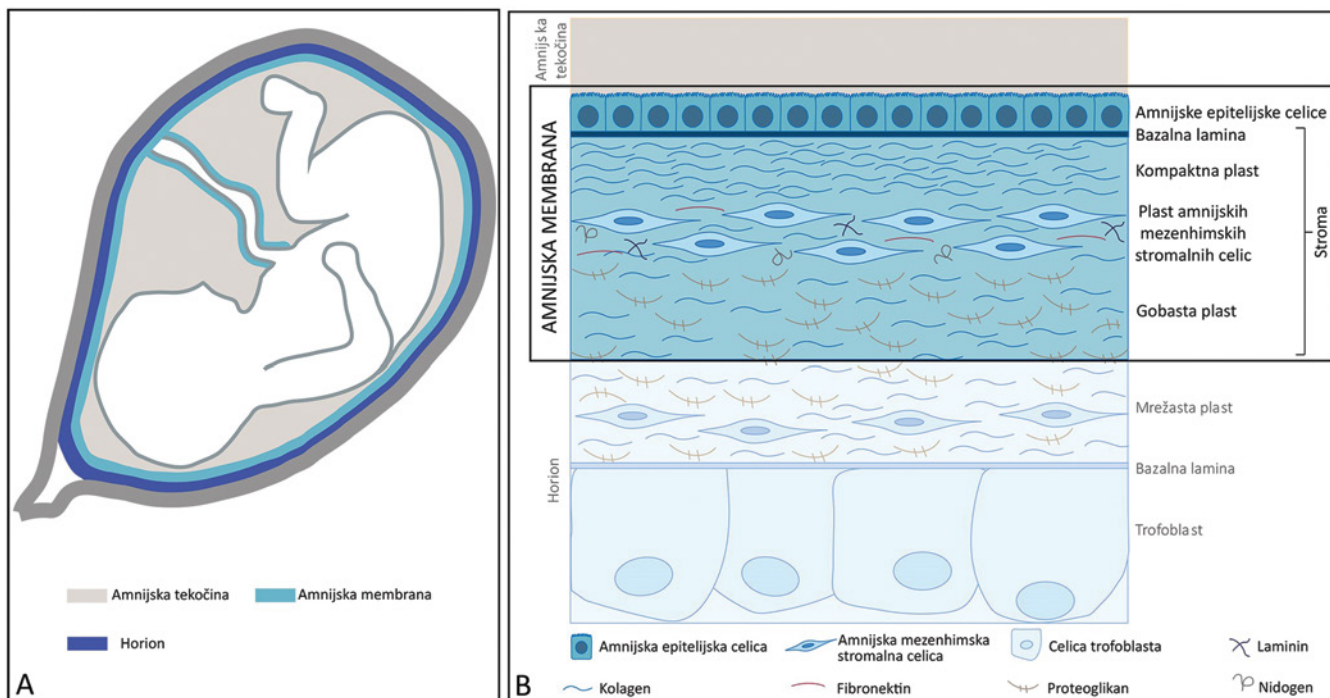
Proteini, ki se nahajajo v različnih plasteh strome (kolagen tipa I, III, IV, V, VI, VII, laminin in fibronektin), delujejo kot **substrat za celice** (6,9–13). Laminin in fibronektin sta kemoatraktanta ter delujeta kot substrat in pospešujeta migracijo epitelnih celic, zato ni presenetljivo, da AM pospešuje epitelizacijo (14–18).

AM vsebuje tudi različne rastne dejavnike, med drugim epidermalni rastni dejavnik (*angl.* epidermal growth factor, EGF), transformirajoči rastni dejavnik-

α (*angl.* transforming growth factor- α , TGF- α), keratinocitni rastni dejavnik (*angl.* keratinocyte growth factor, KGF), hepatocitni rastni dejavnik (*angl.* hepatocyte growth factor, HGF), bazični fibroblastni rastni dejavnik (*angl.* basic fibroblast growth factor, bFGF) in transformirajoči rastni dejavnik- β_1 in - β_2 (*angl.* transforming growth factor, TGF- β_1 in - β_2) (19–22). Rastni dejavniki se v AM *ex vivo* nahajajo v koncentracijah od nekaj pg na mg do nekaj pg na g svežega tkiva (23,24). Opravljajo različne funkcije: pospešujejo epitelizacijo in celično diferenciacijo, zavirajo vnetje, fibrozo, apoptozo ter vaskularizacijo tkiva in delujejo protimikrobno (25).

AEC izražajo tudi protivnetne proteine, kot sta antagonist receptorja za interleukin-1 (IL-1ra) in IL-10 (26,27). Različni tipi celic (npr. roženične in limbalne celice, fibroblasti iz roženice, epitelne celice veznice), ki so jih obdelali z izvlečkom AM oz. so bile gojene na njej, so izražale manjše količine provnetnih interleukinov-1 α in -1 β , interleukina-2, interferona- γ (IFN- γ), tumor nekrotizirajočega dejavnika- α (*angl.* tumor necrosis factor- α ; TNF- α) in interleukina-6 (28–32). AM zaradi protivnetnega delovanja zmanjšuje fibrozo in neovaskularizacijo tkiva (2,31).

Prav tako AM *in vivo* deluje tudi protimikrobno. V citoplazmi in na plazmalemi AEC so določili prisotnost histonov H2A in H2B, za katera je znano, da med drugim delujeta tudi protimikrobno ter nevtralizirata endotoksine (33). V AEC so dokazali prisotnost tudi cDNA za



Slika 1: Zgradba posteljice. A) Amnijska membrana (AM) je notranja plast posteljice, ki zagotavlja zaščito in podporo plodu *in vivo*. B) AM sestavljajo enoskladni epitel amnijskih epitelnih celic, debela bazalna lamina in vezivno tkivo (stroma).

cistatin E, kar kaže, da te celice najverjetneje proizvajajo tudi cistatin E, ki je inhibitor cisteinskih proteaz in lahko še dodatno prispeva k protimikrobnemu učinku AM (36). V AEC so zaznali še protimikrobni molekuli elafin in defenzin- β (34,35).

Transplantacija AM ne povzroči akutne imunske reakcije, saj so človeški levkocitni antigeni -A, -B, -C in -DR (*angl.* human leukocyte antigens, HLA), tako kot pri ostalih embrionalnih tkivih in celicah, na AEC zelo šibko izraženi (37). Tako ni prišlo do zavrnitve človeške AM niti pri ksenotransplantacijah (38). Na AEC so dokazali tudi izražanje HLA-G, ki igra pomembno vlogo pri sprožitvi imunske tolerance (39).

2 Amnijska membrana kot nosilec v tkivnem inženirstvu

Naloga tkivnega inženirstva je razvoj tkivnih nadomestkov, ki ponovno vzpostavijo, vzdržujejo ali izboljšajo

funkcijo tkiva (40). Regeneracijo tkiva ali nadomestitev slabo delujočih oz. nedelujočih organov lahko dosežemo s kombinacijo ustreznih nosilcev (sintetičnih ali bioloških), celic in bioaktivnih molekul (41-44).

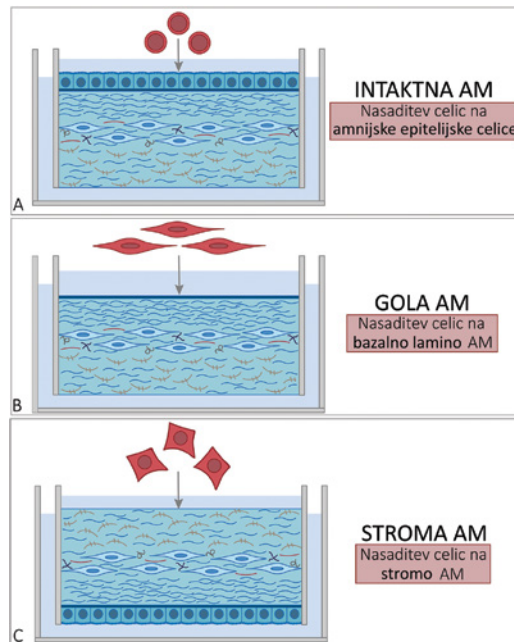
Pomemben korak v tkivnem inženirstvu je izbira ustreznega materiala za nosilec. Nosilci morajo zagotavljati ustrezno okolje za rast in diferenciacijo celic in omogočati tvorbo funkcionalnega tkivnega nadomestka, poleg tega pa se morajo učinkovito integrirati v gostiteljevo tkivo po transplantaciji *in vivo* (45). Biti morajo tudi biokompatibilni (v tkivu ne povzročijo strupenega, karcinogenega ali imunološkega odziva, vnetje pa jih ne uniči) (3), razgradljivi (sčasoma telesu lastne celice nadomestijo vsadek) in imeti mehanske lastnosti, primerne glede na mesto vsaditve (45,46). Naravni (biološki) materiali so pogosta izbira v tkivnem inženirstvu, saj vsebujejo naravne bioaktivne molekule, ki spodbujajo rast in diferenciacijo (47). Od vseh

bioloških materialov je najdlje v uporabi prav AM (3), saj jo je sorazmerno lahko pridobiti (uporaba AM je etično sprejemljiva, saj posteljico po porodu navadno zavržemo), procesirati in transportirati. AM je biološko skladna, ima ustrezne mehanske lastnosti (permeabilnost, stabilnost, elastičnost, fleksibilnost, plastičnost) ter potencial za dostavo rastnih dejavnikov (3).

Največje pomanjkljivosti za širšo uporabo AM v kliniki so: 1. nestandardiziranost postopkov za pripravo in shranjevanje AM, 2. biološka variabilnost AM in 3. nizka mehanska moč AM (49). Zato kot nosilce za rekonstrukcije očesne površine pogosto uporabljamo tudi druge materiale, kot so: kolagen, fibrin, siloksan hidrogel, poli- ϵ -kaprolakton, želatina-hitosan idr. (48).

Tabela 1: Pregled uporabe AM kot nosilca za gojenje različnih tipov celic in tkiv ter kot nosilca za zdravila.

AM kot nosilec za:	Referenca	Opombe
roženično/limbalni epitel z limbalnimi epitelnimi matičnimi celicami	Koizumi in sod., 2000 (19, 23), Grueterich in sod., 2003 (119), Shortt in sod., 2007 (120), Tsai in sod., 2000 (121), Sharma in sod., 2011 (122), Mariappan in sod., 2010 (123), Ang in sod., 2010 (124), Pathak in sod., 2016 (125), Zakaria in sod., 2014 (126), Vazirani in sod., (127)	za presaditev gojenega roženično/limbalnega epitela <i>ex vivo</i> , ki vsebuje limbalne epitelne matične celice (LEMC) v sklopu kliničnih študij ali kot rutinska terapevtska metoda le v nekaterih državah raziskovalno za transplantacije
hondrocite	Krishnamurithy in sod., 2011 (128), Diaz-Prado in sod., 2010 (129), Jin in sod., 2007 (130)	raziskovalno za presaditve hondrocitov pri popravljanju sklepnega hrustanca
fibroblaste	Mahmoudi-Rad in sod., 2013 (131)	raziskovalno za pripravo začasnih kožnih nadomestkov
epidermalne keratinocite	Huang in sod., 2013 (132)	raziskovalno za pripravo dermalnih nosilcev za rekonstrukcijo strukture kože
avtologne melanocite	Redondo in sod., 2011 (133)	gojenje melanocitov na goli AM za zdravljenje vitiliga
uroteljske celice	Jerman in sod., 2014 (64), Sharifiaghdas in sod., 2007 (64, 134)	raziskovalno za pripravo urotelija za presaditve <i>in vivo</i>
človeške alogene primarne fibroblaste in keratinocite	Wilshaw in sod., 2008 (135)	raziskovalno za pripravo konstrukta za zdravljenje diabetičnih razjed goleni, okvar roženice, opeklin
mezenhimske roženične matične celice, eksplantna tehnika gojenja	Lužnik in sod., 2016 (87)	kot raziskovalni model in kot potencialni terapevtski produkt
mezenhimske matične celice, pridobljene iz maščobnega tkiva (hADM-SC)	Gholipoumalekabadi in sod., 2016 (136)	raziskovalno: priprava hADM-SC za pospeševanje regeneracije tkiva in zdravljenje poškodb kože
mezenhimske matične celice, pridobljene iz kostnega mozga	Chehelcheraghi in sod., 2016 (137), Tan in sod., 2011 (138)	raziskovalno: AM nosilec za diferenciacijo mezenhimskih matičnih celic
epitel ustne sluznice	Dobrowolski in sod., 2015 (139), Amemiya in sod., 2015 (140)	rekonstitucija površine ustne sluznice in očesne površine
celice solznega žleznega mešička (acinarne solzne žlezne celice)	Tiwari in sod., 2012 (141), Schrader in sod., 2007 (142)	kot raziskovalni model in kot potencialni terapevtski produkt
diferenciacijo celic iz AM in Whartonove žolce	Sanluis Verdes in sod., 2017 (143)	raziskovalno: AM kot nosilec za celice, ki se diferencirajo v celice, podobne živčnim celicam
zdravilo bevacizumab	Mayer in sod., 2013 (144)	kot nosilec za zdravilo pri zdravljenju razjed roženice



Slika 2: Primeri različnih nosilcev iz AM. Različne tipe celic lahko nasadimo na A) epitel AM (intaktna AM), B) bazalno lamino AM (gola AM) ali C) stromo AM.

Možni načini uporabe AM kot nosilca so prikazani v Tabeli 1 in na Sliki 2. AM se kot nosilec epitelnih celic, ki jih pridobimo bodisi iz biopsij limbusa bodisi iz biopsij ustne sluznice (mukoze), najpogosteje uporablja za rekonstrukcijo očesne površine (48).

3 Priprava AM, ki jo uporabljamo kot nosilec

AM, ki bi jo uporabili kot nosilec, zaradi možnosti obporodne bakterijske okužbe z vaginalno mikrobioto vedno odvezamo pri elektivnem carskem rezu (50-52). Darovalka (porodnica) mora biti seznanjena z namenom uporabe AM v raziskovalne ali klinične namene in se mora z odvzemom strinjati.

Optimalna metoda za shranjevanje AM izpolnjuje naslednje pogoje: a) AM obdrži lastnosti, pomembne za uporabo AM kot nosilca, b) zagotavlja funkcionalnost in sterilnost AM, c) omogoča njeno

enostavno uporabo (53). Pri uporabi AM v klinične namene zakonodaja določa, da je AM potrebno pred uporabo testirati na potencialno okužbo z različnimi virusi ali bakterijami. V nekaterih primerih mora biti AM še 6 mesecev v karanteni, zato se sveža AM redko uporablja (54). Najpogostejša načina shranjevanja AM sta: a) shranjevanje sveže AM pri -80°C (v raztopini fosfatnega pufru in DMSO (dimetil sulfoksid) ali hranilnega medija MEM (*angl.* Modified Eagle Medium) in glicerola), b) zamrzovalno sušenje (*angl.* freeze-drying) (13,54). Manj pogosto se uporablja sušenje AM na zraku, tretiranje z glutaraldehidom in politetrafluoroetilenom ali liofilizacija (2,13,50).

Različne študije so pokazale, da različni načini obdelave, shranjevanja in sterilizacije AM vplivajo na njene lastnosti (55-57), medtem ko Adds in sod. niso dokazali razlike v klinični učinkovitosti AM, v kolikor je bila uporabljena sveža ali zamrznjena (v 50-odstotnem glicerolu, shranjena pol leta pri -80°C) (51). Tako zamrzovanje AM v 50-odstotnem glicerolu ne omogoča preživetja celic AM, ohrani pa osnovno morfologijo (51,58,59). Ena od pomanjkljivosti uporabe AM kot nosilca za gojenje različnih celic je pomanjkanje študij, ki bi pokazale, kateri način shranjevanja je optimalen. Jasno pa je, da različni načini obdelave in shranjevanja AM vplivajo na njene lastnosti, pomembne za gojenje celic, kot so mehanske lastnosti, omogočanje pritrditve in proliferacije celic na AM, zmanjšana vsebnost oz. sproščanje rastnih dejavnikov, spremenjene lastnosti bazalne lamine, čeprav so bili vsi načini obdelave in shranjevanja (zamrzovanje v glicerolu, zamrzovanje v pufru HBSS – (*angl.* Hank's balanced salt solution, liofilizacija) primerni za rast celic (53,60-62).

Če želimo AM uporabljati kot nosilec, lahko uporabljamo AM z AEC (in-

taktna AM) ali AM brez AEC, t. i. golo AM (*angl.* denuded AM) (3,28,63). AEC lahko odstranimo na več načinov: a) z obdelavo z EDTA ali encimom dispazo, b) s termolizinom (3,28,64), c) z obdelavo z detergentom NaDS (natrijev dodecilsulfat) (3).

AM, ki jo želimo uporabiti kot nosilec, lahko modificiramo tudi drugače, npr. s transglutaminazo TG-2, ki poveča mehansko moč AM in odpornost proti proteolitsko/kolagenazni razgradnji, hkrati pa ne vpliva na pritrjanje, razraščanje, proliferacijo in diferenciacijo celic (65). S polimernimi vlakni, ki so izdelana s postopkom elektrostatskega sukanja, povečamo mehansko trdnost AM, s tem pa tudi njeno primernost za uporabo v rekonstruktivni urologiji (66). Za gojenje limbalnih matičnih celic pa se je za zelo primeren nosilec izkazala AM, modificirana s karbodiimidom oz. kombinacijo karbodiimida in L-lizina (67,68).

4 AM kot vir matičnih celic

V AM sta dve populaciji celic, ki jima pripisujemo lastnosti matičnih celic, in sicer AEC ter AMSC. V nasprotju z embrionalnimi matičnimi celicami je prednost matičnih celic iz odraslih tkiv in matičnih celic iz AM v tem, da ne tvorijo teratomov (69-71).

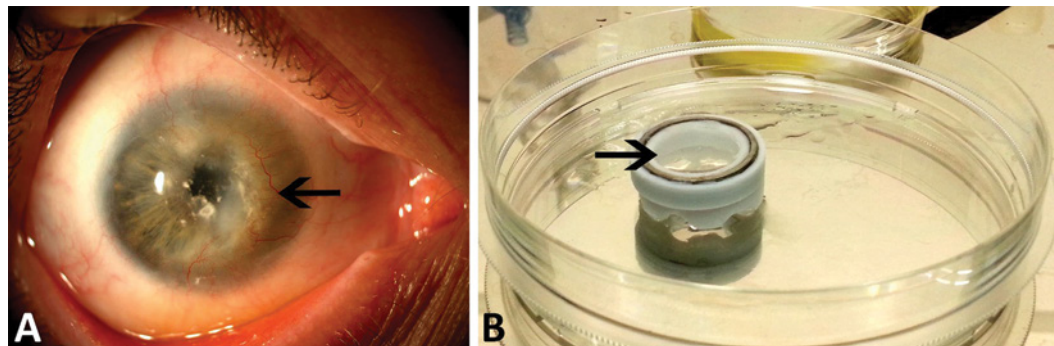
AEC in AMSC so v razmerah *in vitro* sposobne diferenciacije v celice vseh treh zarodnih plasti (72,73). AEC izražajo označevalce CD105/CD90, CD44/CD90 in CD271/CD44, SSEA3 ter SSEA4, STRO1, TRA1-60, TRA1-81, OCT4, SOX2 in Nanog (69,74). AMSC izražajo tipične mezenhimske označevalce (CD73, CD90, CD105) in tudi označevalce pluripotentnosti, npr. OCT4, SOX2, Rex1, Nanog.

Celice AM so zaradi svojih lastnosti, kot so protivnetno delovanje (zaviranje proliferacije aktiviranih limfocitov

T, zaviranje izločanja vnetnih citokinov Th1, indukcija regulacijskih limfocitov T itd.) (20,75), spodbujanje epitelizacije (AEC izločajo dejavnike bFGF, HGF, EGF, KGF, ki spodbujajo epitelizacijo) (26,76) in protiangiogeno delovanje (AEC in AMSC izločajo dejavnike endostatin, trombospondin-1, tkivna inhibitorja metaloproteinaz-1 in -2) (26,77,78), zelo uporabne v terapevtske namene. V zadnjih letih so izvedli številne študije na različnih živalskih modelih, na katerih so proučevali učinek celic AM pri Parkinsonovi in Alzheimerjevi bolezni, multipli sklerozi, poškodbah hrbtenjače, možganski in srčni kapi, pljučnih boleznih, fibrozi jeter, mišični distrofiji, diabetesu in poškodbah kosti ter hruščanica. Potekajo tudi klinične študije, ki proučujejo uporabo celic AM za zdravljenje opeklin, Crohnove bolezni, diabetičnega stopala, hematopoetskih boleznih, presnovnih motenj, diabetesa in revmatoidnega artritisa (79). V prihodnje bodo morale nadaljnje klinične študije celostno ovrednotiti učinek matičnih celic iz AM na potek bolezni in zdravljenje pri človeku.

5 AM kot nosilec za gojenje roženičnih (limbalnih) epitelnih matičnih celic

Roženične matične celice omogočajo obnovo roženičnega epitela in se nahajajo v bazalnih slojih limbalnega epitela, zato jih imenujemo tudi limbalne epitelne matične celice (LEMC). Če so LEMC okvarjene ali jih primanjkuje, se roženični epitel ne obnavlja več. Postopno ga zamenja veznični epitel. Posledica so ponavljajoče se erozije epitela, vaskularizacija roženice, kronično vnetje, bolečine, zamotnitev roženice in poslabšanje vida (Slika 3A). Vzroki pomanjkanja ali okvare limbalnega epitela so največ-



Slika 3: A) Konjunktivalizacija in brazgotine roženice (puščica) zaradi pomanjkanja ali okvare limbalnih epitelialnih matičnih celic (LEMC) (foto: Petra Schollmayer). B) Človeška AM, vpeta v nosilec in pripravljena za gojenje LEMC (foto: Zala Lužnik).

krat pridobljeni (kemične in termične poškodbe, sindrom Stevens-Johnson, očesni cikatrikantni pemfigoid, nepravilno nošenje kontaktnih leč), redkeje pa prirojeni kot npr. pri aniridiji (80).

Limbalnih epitelialnih matičnih celic (*angl.* limbal stem cell deficiency, LSCD) lahko delno ali popolno primanjkuje na enem očesu ali na obeh očeh. Zdravljenje pomanjkanja LEMC je zahtevno in dolgotrajno (81). Pri popolnem pomanjkanju LEMC je potrebna presaditev zdravih LEMC oz. zdravega limbalnega tkiva (82,83), ki je lahko avtolognega ali alogenega izvora (iz trupla ali darovano od živega sorodnika). V svetu trenutno obstajata 2 glavni kirurški tehniki transplantacije LEMC: klasični kirurški pristop, pri katerem neposredno presadimo zdravo donorsko limbalno tkivo, in transplantacija *ex vivo* gojenega roženičnega epitela, ki vsebuje LEMC (*angl.* cultivated limbal epithelial transplantation, CLET) in se vzgoji iz majhne limbalne biopsije velikosti 1–2 mm² (84). Obe tehniki imata svoje prednosti in slabosti. Odkar je leta 1997 Pellegrini s sod. (84) opisala prvi klinični primer uporabe CLET, so se po svetu razvili številni protokoli gojenja limbalnega epitela.

Klinično sta se najbolj izkazala dva protokola: suspenzijska metoda goje-

nja LEMC na podpornem mišjem fibroblastnem sloju (fibroblasti, izolirani iz embrionalnih miši – 3T3 J2) ter gojenje limbalnega tkiva na človeški AM. Ker je bazalna membrana AM po sestavi podobna bazalni membrani roženice in veznice, je še posebej primerna kot biološka podlaga pri tehnikah gojenja epitelialnih matičnih celic *ex vivo* (23). Za gojenje LEMC je namreč izjemno pomembno ustrezno mikrookolje, v katerem se celice nahajajo (83). Koizumi je prvi leta 2000 uporabil AM kot biološko podlago za gojenje LEMC (23). Za gojenje se lahko uporablja zamrznjena intaktna AM z ohranjenim odmrlim amnijskim epitelom (2,85) ali gola AM (23,86). AM se z epitelno stranjo navzgor vpne v obroče, ki omogočajo razprtost AM med gojenjem (Slika 3B). Limbalno biopsijo (pri eksplantni metodi) se nato položi na epitelno stran AM (86). Epitelne celice iz limbalne biopsije pod standardnimi pogoji *ex vivo* proliferirajo in prerastejo AM v 2–3 tednih (85–87).

Čeprav po svetu obstajajo različni protokoli gojenja LEMC *ex vivo*, poročajo o dolgoročni uspešnosti CLET nad 75 % (88) s približno 3 % zavrnitvenih reakcij pri alogeni transplantaciji CLET (89).

Različne klinike po svetu zagovarjajo uporabo gole ali intaktne AM (85,86,90). Koizumi in sod. so primerjali uporabo gole in intaktne AM za gojenje LEMC (90). Pri uporabi intaktne AM je bil fenotip izraščajočega epitela bolj podoben limbalnemu epitelu (domneva se, da tako vsebuje več matičnih celic), medtem ko je gojeni epitel na goli AM bolj podoben zrelemu roženičnemu epitelu (2,90). Tudi stromalna stran AM bi se lahko uporabila kot podlaga za gojenje limbalnega epitela, saj vsebuje še posebej visoke koncentracije živčnega rastnega dejavnika (*angl.* nerve growth factor, NGF), ki igra bistveno vlogo pri razvoju epitelov in preživetju matičnih celic (85). Solomon s sod. je opisal, da stromalna stran AM v gojenem limbalnem epitelu zavira z lipopolisaharidom sproženo povečano izražanje IL-1 α in β (29).

V Sloveniji že vse od leta 2000 v klinični praksi uspešno uporabljamo AM (91) za pospeševanje celjenja razjed in perforacij roženice, za rekonstrukcijo očesne površine in akutno zdravljenje termičnih in kemičnih poškodb (25). Na Očesni kliniki v raziskovalne namene uporabljamo eksplantno tehniko gojenja limbalnega tkiva trupel na AM od leta 2014 in pridobitve soglasja Komisije za medicinsko etiko Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Prvi rezultati gojenja limbalnega tkiva na AM *ex vivo* (eksplantna tehnika) so primerljivi z rezultati prej objavljenih raziskav. Med prvimi pa smo dokazali tudi vsebnost celic, ki so bile pozitivne za označevalce mezenhimskih matičnih celic (CD73/CD90/CD105+ in CD45-) (87).

Identifikacija matičnih celic v kulturah je zelo pomembna za oceno kakovosti gojenega limbalnega/roženičnega epitela *ex vivo*, saj želimo v oko bolnika vsaditi ustrezno število LEMC (84). Matični potencial celic določamo s funkcionalnimi testi, ki omogočajo identifi-

kacijo živih LEMC v gojeni kulturi in so še vedno zlati standard opredelitve števila matičnih celic v kulturi (92). V zadnjih letih se v znanosti pojavljajo tudi številni domnevni molekularni označevalci za LEMC. Specifičnega označevalca zanje še ni, na podlagi kombinacij izražanja številnih domnevnih pozitivnih in negativnih označevalcev pa lahko sklepamo na prisotnost matičnih celic *in situ* (93).

V naši raziskavi smo z imunohistokemijskimi metodami prepoznali epitelno rast na obeh straneh AM. Na obeh straneh AM je bil epitel večskladen, neporoženevajoč, v bazalnih slojih epitela so celice izražale transkripcijski dejavnik p63, ki je eden od označevalcev matičnosti. Posamezne celice so bile pozitivne za Ki67, kar nakazuje proliferacijski potencial gojenega limbalnega epitela. V tuji literaturi je rast limbalnega epitela na epitelni strani AM že dobro opisana, še vedno pa obstajajo nesoglasja glede sposobnosti gojenja limbalnega epitela na stromalni strani AM. Zakaria s sod. je opisala, da na stromalni strani niso opazili izražanja limbalnega epitela, vendar so uporabili drugačen hranilni medij kot naša skupina (86).

Vsebnost limbalnih mezenhimskih stromalnih matičnih celic (MSC) v limbalnih kulturah na AM v literaturi še ni opredeljena. Naše meritve so pokazale, da AM omogoča selektivno rast epitelnih celic, saj je bil odstotek celic, pozitivnih za označevalce mezenhimskih matičnih celic (CD73/CD90/CD105+ in CD45-) statistično značilno nižji v primerjavi s kontrolnimi kulturami. Szabo s sod. je opisal 22 % pozitivnih celic na CD184 in samo 0,6 % pozitivnih celic na CD117 v limbalnih kulturah (94), oba predstavljata domnevna površinska označevalca za LEMC. V naši raziskavi smo v limbalni kulturi izmerili 2–7 % celic, ki so izražale CD184 in CD117. Dosedanje klinične študije so potrdile dober klinični izid pri

presaditvi gojenega limbalnega epitela z vsebnostjo LEMC nad 3 % (92), ki bi jo lahko na podlagi trenutnih laboratorijskih eksperimentalnih rezultatov dosegli z eksplantno tehniko gojenja limbalnega tkiva na AM. Tako si z multidisciplinarnim pristopom in medkliničnim sodelovanjem želimo v prihodnosti v Sloveniji uvesti tudi zdravljenje z gojenimi LEMC *ex vivo*.

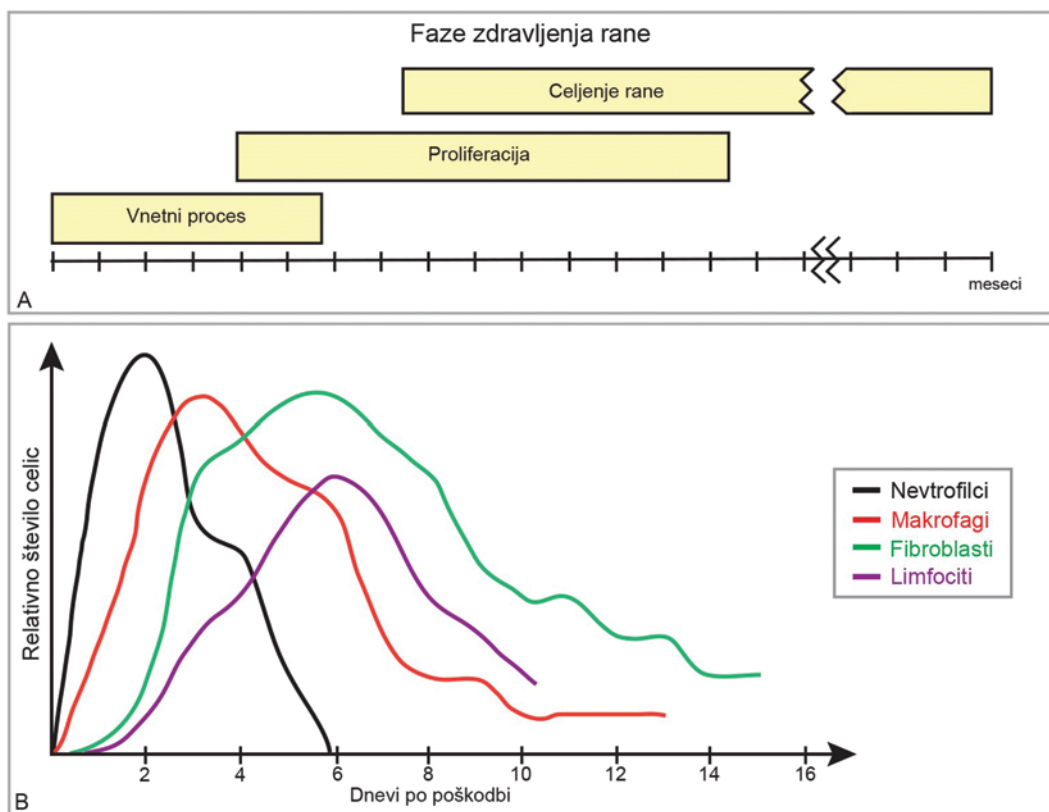
6 AM kot nosilec za urotelijske celice

Steno sečnega mehurja sestavljajo štiri plasti: urotelij, submukoza, mišična plast in adventicija (95). Urotelij sestavlja tri do sedem plasti celic, ki jih glede na lego razdelimo na površinske, vmesne in bazalne celice. Površinske urotelijske celice, imenovane tudi dežnikaste celice, so specializirane in dosežejo visoko raven diferenciacije, ki bistveno prispeva k vzdrževanju krvno-urinske pregrade (95-97). Bazalna lamina ločuje urotelij od spodaj ležeče submukoze, ki jo sestavlja lamina proprija in rahlo vezivno tkivo (98,99).

Različna bolezenska stanja, kot so npr. kongenitalne anomalije, travme, vnetna stanja ali malignosti, zahtevajo rekonstrukcijo sečnega mehurja (100,101). Leta 2013 so v Sloveniji ugotovili 344 novih primerov raka sečnega mehurja. Zdravljenje mišično neinvazivnega raka sečnega mehurja poteka s transureterno resekcijo (delna ali popolna odstranitev tumorja skozi sečnico), medtem ko pri invazivnem raku sečnega mehurja ali obsežnih, ponavljajočih se neinvazivnih tumorjih ali tumorjih, neodzivnih na zdravljenje, opravijo cistektomijo (odstranitev dela sečnega mehurja ali celotnega organa) (102). Da bi povečali preživetje bolnikov z rakom sečnega mehurja, strokovnjaki razvijajo nove načine zdravljenja. Eden od njih je tudi

tkivnoinženirski pristop. V eni bolj odmevnih študij, ki so jo izvedli Atala s sodelavci leta 2006 (98), so opisali pripravo konstrukta sečnega mehurja, ki so ga za rekonstrukcijo sečnega mehurja uporabili pri 7 bolnikih z mielomeningokelo. Natančneje, najprej so na bolnikih izvedli biopsije sečnega mehurja, gojili urotelijske in mišične celice v pogojih *in vitro* in jih nasadili na kolagenski nosilec ali kolagenski nosilec v kombinaciji s poliglikolno kislino. Po 7 tednih gojenja so konstrukte ovili v omentum in vsadili bolnikom. Bolnike so nato spremljali 22–61 tednov po operaciji. Izkazalo se je, da so konstrukti avtolognih celic, nasajenih na nosilec iz kolagena in poliglikolne kisline, ki jih pred vsaditvijo ovijemo še v omentum, primerni za uporabo pri bolnikih, ki potrebujejo cistoplastiko (98).

Za rekonstrukcijo sečnega mehurja so bili uporabljeni različni biološki materiali, vendar le z omejenim uspehom. Na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete v Ljubljani so Jerman in sod. leta 2014 uporabili nosilce iz AM za namnoževanje urotelijskih celic (64). Normalne prašičje urotelijske celice (NPU) so nasadili na a) epitel AM (eAM), b) bazalno lamino AM, t. i. golo AM (gAM), ali na c) vezivno tkivo (stromo) AM (sAM). Rast celic NPU so spremljali 3 tedne. Ugotovili so, da so celice NPU dosegle najmanjšo preraščenost na nosilcu eAM, kjer so AEC služile kot fizična prepreka, zato se celice NPU niso mogle pritrčiti na podlago. Slednje so na eAM najprej tvorile majhne otočke, sčasoma pa so se AEC odluščile, celice NPU so se potem lahko pritrčile na bazalno lamino ter se šele nato hitreje razrastle po podlagi. Celice NPU so na nosilcu gAM tvorile urotelij z delno diferenciranimi dežnikastimi celicami. Dokazali so tudi, da se celice NPU najbolj razraščajo in so tudi najbolj diferencirane na nosilcu sAM. Na sAM so



Slika 4: A) Faze zdravljenja rane. B) Med zdravljenjem so v rani prisotne celice različnih tipov (povzeto po Rožman in sod., 2011 (104)).

raastle dežnikaste celice z molekularnimi in ultrastrukturnimi lastnostmi (izražanje uroplakinov, okludina in tvorba urotelijskih plakov, dobro razvitih tesnih stikov ter mikrogrebenov), primerljive z nativnim urotelijem. Celice NPU so na nosilcu sAM tvorile novo bazalno lamino. Ta je vsebovala le kolagen tipa IV, a ne tudi kolagen a) tipa VII, kar kaže na to, da se bazalna lamina ni popolnoma razvila. Kljub temu so celice NPU na sAM dosegle visoko raven diferenciacije, kar poudarja pomen *de novo* nastale bazalne lamine pri nastanku urotelija z visoko stopnjo diferenciacije (64). Predvidevamo, da je za vzpostavitev takega urotelija pomembna tako parakrina vloga amnijske membrane kot tudi topografija in sestava zunajceličnega matriksa amnijske membrane.

7 Amnijske in amnijsko-horionske membrane za zdravljenje kroničnih ran

Celjenje ran je kompleksen proces, sestavljen iz več faz: vnetne faze, proliferativne faze in faze preoblikovanja (Slika 4A) (104). Proces vključuje sinhronizirano delovanje več tipov celic. Najbolj dinamični procesi celjenja rane potekajo v prvih dneh po poškodbi, ko imunske celice in trombociti migrirajo v smeri poškodbe, kjer povzročijo koagulacijo ter vnetne procese: takoj po nastanku rane se na mestu poškodbe poveča število trombocitov, v nadaljnjih 24 urah pa tudi nevtrofilcev. V naslednjih dneh se poveča tudi število makrofagov, fibroblastov in limfocitov (Slika 4B) (104). Če se vne-

tni procesi ne zaključijo okvirno v enem tednu, ampak se nadaljujejo, govorimo o kronični rani, ki se tudi po približno dveh mesecih ne zaceli (105). Kljub obsežnim raziskavam so molekularno-biološki mehanizmi nastanka kroničnih ran še vedno malo znani (106). Proces celjenja ran se pri zarodku močno razlikuje od celjenja pri odrasli osebi: vnetje je po poškodbi zarodka manjše, zato tudi nastane manjša brazgotina in tkivo se bolje zaceli.

V pomoč pri pospeševanju celjenja ran se uporablja AM ali amnijsko-horionska membrana (AHM), ki poleg AM vsebuje tudi horion. Ta je debelejši, močnejši in vsebuje večje količine rastnih dejavnikov, kar je za površinsko uporabo tega tkiva še posebej pomembno. AM oz. AHM za terapevtske namene uporabljamo svežo ali zamrznjeno. Svežo AM uporabljajo predvsem v nerazvitih državah, saj je tam ovira nabava in uporaba dragih in velikih zamrzovalnikov, v katerih se tkivo shranjuje pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (107,108). Pri zdravljenju kroničnih ran podoben učinek kot z uporabo sveže ali zamrznjene AM oz. AHM dosežemo tudi z uporabo komercialno dostopne dehidrirane AM (Purion®, MiMedx, USA) ali AHM (Epifix®, MiMedx, USA).

AM in AHM se večinoma uporabljajo za zdravljenje diabetičnih stopal, venskih in arterijskih ulkusov ter drugih kroničnih ran (109,110). Uporaba AM in AHM izboljša proces celjenja rane: proces se uspešno zaključi v večini primerov (v 92 % v 6 tednih v randomizirani kontrolni študiji zdravljenja diabetičnega stopala) (106). Visok odstotek uspešnosti so pokazale tudi druge študije (111-113).

Na Kliničnem oddelku za kirurške okužbe UKC Ljubljana so se zdravili štirje bolniki, pri katerih je bilo

zdravljenje kroničnih ran neučinkovito (najprej kirurško, nato z uporabo modernih materialov za oskrbo ran). Pri obravnavanih bolnikih sta imela dva sladkorno bolezen in kronično rano na gležnju oz. na stopalu. Tretja bolnica je imela kronično rano neznanega vzroka nad prsnico, četrti bolnik pa je bil otrok s kronično opeklinsko rano na sprednji strani prsnega koša. Pri vseh bolnikih so na 7 dni trikrat dali dehidrirane AHM (Epifix®). Velik napredek se je pokazal že po 14 dneh oz. po drugem dajanju AHM, ko se je površina ran zmanjšala za več kot 30 %. Po treh dajanjih AHM so se rane popolnoma zacelile, recidivov pa ni bilo (114,115).

8 Zaključek

Z razvojem regenerativne medicine so prišle do izraza tudi mehanske lastnosti AM, kot so stabilnost, elastičnost in plastičnost. Te lastnosti so predvsem posledica molekul zunajceličnega matriksa, ki tvorijo bazalno lamino in zunajcelični matriks strome. Zaradi teh lastnosti je AM dober nosilec za uporabo v tkivnem inženirstvu in regenerativni medicini. V ortopediji se mikronizirana AM uporablja za zmanjševanje ali preprečevanje vnetij mehkih tkiv (npr. fasciitisa) ali pa osteoartroz (116). AM v Sloveniji od leta 2009 uporabljamo v oftalmologiji bodisi kot presadek, obliž ali polnilo za zdravljenje različnih poškodb očesa (25). Ker lahko v glicerolu zamrznjeno AM uspešno uporabljamo kot nosilec za gojenje LEMC, je Očesna klinika v sodelovanju z Zavodom RS za transfuzijsko medicino začela razvijati postopek, ki bo v prihodnjih letih omogočil pripravo klinično ustreznih, na AM gojenih LEMC za zdravljenje spektra različno napredovanih boleznih pomanjkanja LEMC (118).

9 Zahvala

Avtorji se iskreno zahvaljujemo Ginekološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani in vsem porodnicam, ki so darovale amnijsko membrano v raziskovalne ali klinične namene. Najlepša hvala tudi Cvetani

Tavzes za lektoriranje. Delo je nastalo v okviru raziskovalnih programov št. P3-0108 in P3-0371, projekta št. J4-7494 in projekta mladi raziskovalec, ki jih je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna.

Literatura

- Méhats C, Schmitz T, Marcellin L, Breuiller-Fouché M. [Biochemistry of fetal membranes rupture]. *Gynécol Obstét Fertil*. 2011 Jun;39(6):365–9.
- Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2004 Jan-Feb;49(1):51–77.
- Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2008 Apr;15:88–99.
- Ockleford C, Malak T, Hubbard A, Bracken K, Burton SA, Bright N, et al. Confocal and conventional immunofluorescence and ultrastructural localisation of intracellular strength-giving components of human amniochorion. *J Anat*. 1993 Dec;183(Pt 3):483–505.
- Kobayashi K, Miwa H, Yasui M. Inflammatory mediators weaken the amniotic membrane barrier through disruption of tight junctions. *J Physiol*. 2010 Dec;588(Pt 24):4859–69.
- Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea*. 1999 Jan;18(1):73–9.
- Meinert M, Eriksen GV, Petersen AC, Helmig RB, Laurent C, Ulbjerg N, et al. Proteoglycans and hyaluronan in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Mar;184(4):679–85.
- Wolf HJ, Schmidt W, Drenckhahn D. Immunocytochemical analysis of the cytoskeleton of the human amniotic epithelium. *Cell Tissue Res*. 1991 Nov;266(2):385–9.
- Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalgleish R, Bright N, Macvicar J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta*. 1993 Jul-Aug;14(4):385–406.
- Kolega J, Manabe M, Sun TT. Basement membrane heterogeneity and variation in corneal epithelial differentiation. *Differentiation*. 1989 Oct;42(1):54–63.
- Gipson IK, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS. Anchoring fibrils form a complex network in human and rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1987 Feb;28(2):212–20.
- Endo K, Nakamura T, Kawasaki S, Kinoshita S. Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the alpha5 chain of type IV collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Jun;45(6):1771–4.
- Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2010 Jan;31(2):216–25.
- Meller D, Tseng SC. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 Apr;40(5):878–86.
- Velez I, Parker WB, Siegel MA, Hernandez M. Cryopreserved amniotic membrane for modulation of periodontal soft tissue healing: a pilot study. *J Periodontol*. 2010 Dec;81(12):1797–804.
- Choi JA, Jin HJ, Jung S, Yang E, Choi JS, Chung SH, et al. Effects of amniotic membrane suspension in human corneal wound healing in vitro. *Mol Vis*. 2009 Nov;15:2230–8.
- Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol*. 1999 Jun;83(6):748–52.
- Ohshima M, Tokunaga K, Sato S, Maeno M, Otsuka K. Laminin- and fibronectin-like molecules produced by periodontal ligament fibroblasts under serum-free culture are potent chemoattractants for gingival epithelial cells. *J Periodontol Res*. 2003 Apr;38(2):175–81.
- Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*. 2000 Mar;20(3):173–7.
- Li J, Koike-Soko C, Sugimoto J, Yoshida T, Okabe M, Nikaido T. Human Amnion-Derived Stem Cells Have Immunosuppressive Properties on NK Cells and Monocytes. *Cell Transplant*. 2015;24(10):2065–76.
- Li H, Niederkorn JY, Neelam S, Mayhew E, Word RA, McCulley JP, et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Mar;46(3):900–7.
- Gicquel JJ, Dua HS, Brodie A, Mohammed I, Suleman H, Lazutina E, et al. Epidermal growth factor variations in amniotic membrane used for ex vivo tissue constructs. *Tissue Eng Part A*. 2009 Aug;15(8):1919–27.

23. Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Aug;41(9):2506–13.
24. Russo A, Bonci P, Bonci P. The effects of different preservation processes on the total protein and growth factor content in a new biological product developed from human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank.* 2012 Jun;13(2):353–61.
25. Cirman T, Beltram M, Schollmayer P, Rožman P, Kreft ME. Amniotic membrane properties and current practice of amniotic membrane use in ophthalmology in Slovenia. *Cell Tissue Bank.* 2014 Jun;15(2):177–92.
26. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea.* 2000 May;19(3):348–52.
27. Fidel PL Jr, Romero R, Ramirez M, Cutright J, Edwin SS, LaMarche S, et al. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) production by human amnion, chorion, and decidua. *Am J Reprod Immunol.* 1994 Aug;32(1):1–7.
28. Dragin U, Kreft ME. Amniotic membrane in tissue engineering and regenerative medicine. *Zdravn vestn.* 2010;79(10):8707–715.
29. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1 α and interleukin 1 β in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol.* 2001 Apr;85(4):444–9.
30. Heiligenhaus A, Bauer D, Meller D, Steuhl KP, Tseng SC. Improvement of HSV-1 necrotizing keratitis with amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001 Aug;42(9):1969–74.
31. Sippel KC, Ma JJ, Foster CS. Amniotic membrane surgery. *Curr Opin Ophthalmol.* 2001 Aug;12(4):269–81.
32. He H, Li W, Chen SY, Zhang S, Chen YT, Hayashida Y, et al. Suppression of activation and induction of apoptosis in RAW264.7 cells by amniotic membrane extract. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(10):4468v75.
33. Kim HS, Cho JH, Park HW, Yoon H, Kim MS, Kim SC. Endotoxin-neutralizing antimicrobial proteins of the human placenta. *J Immunol.* 2002;168(5):2356v64.
34. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Nov;191(5):1678–87.
35. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta.* 2007 Feb-Mar;28(2-3):161–9.
36. Ni J, Abrahamson M, Zhang M, Fernandez MA, Grubb A, Su J, et al. Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *J Biol Chem.* 1997 Apr;272(16):10853–8.
37. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet.* 1981 Nov;2(8254):1003–5.
38. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001 Jun;42(7):1539–46.
39. Hammer A, Hutter H, Blaschitz A, Mahnert W, Hartmann M, Uchanska-Ziegler B, et al. Amnion epithelial cells, in contrast to trophoblast cells, express all classical HLA class I molecules together with HLA-G. *Am J Reprod Immunol.* 1997 Feb;37(2):161–71.
40. Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg.* 2016 Jan;51(1):8–12.
41. Mungadi IA. Bioengineering tissue for organ repair, regeneration, and renewal. *J Surg Tech Case Rep.* 2012 Jul;4(2):77–8.
42. Nakanishi Y, Chen G, Komuro H, Ushida T, Kaneko S, Tateishi T, et al. Tissue-engineered urinary bladder wall using PLGA mesh-collagen hybrid scaffolds: a comparison study of collagen sponge and gel as a scaffold. *J Pediatr Surg.* 2003 Dec;38(12):1781–4.
43. Heidary Rouchi A, Mahdavi-Mazdeh M. Regenerative Medicine in Organ and Tissue Transplantation: Shortly and Practically Achievable? *Int J Organ Transplant Med.* 2015;6(3):93–8.
44. Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J R Soc Interface.* 2007 Dec;4(17):999–1030.
45. O'Brien FJ. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Mater Today.* 2011;14(3):88–95.
46. Vunjak-Novakovic G. The fundamentals of tissue engineering: scaffolds and bioreactors. *Novartis Found Symp.* 2003;249:34–46; discussion-51, 170–4, 239–41. <https://doi.org/10.1002/0470867973.ch4>.
47. Hsiao YC, Lee HW, Chen YT, Young TH, Yang TL. The impact of compositional topography of amniotic membrane scaffold on tissue morphogenesis of salivary gland. *Biomaterials.* 2011 Jul;32(19):4424–32.
48. Feng Y, Borrelli M, Reichl S, Schrader S, Geerling G. Review of alternative carrier materials for ocular surface reconstruction. *Curr Eye Res.* 2014 Jun;39(6):541–52.
49. Ramuta TZ, Kreft ME. Human Amniotic Membrane and Amniotic Membrane-Derived Cells: How Far Are We from Their Use in Regenerative and Reconstructive Urology? *Cell Transplant.* 2018 Jan;27(1):77–92.
50. Madhavan HN, Priya K, Malathi J, Joseph PR. Preparation of amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Indian J Ophthalmol.* 2002 Sep;50(3):227–31.
51. Adds PJ, Hunt CJ, Dart JK. Amniotic membrane grafts, “fresh” or frozen? A clinical and *in vitro* comparison. *Br J Ophthalmol.* 2001 Aug;85(8):905–7.
52. Adds PJ, Hunt C, Hartley S. Bacterial contamination of amniotic membrane. *Br J Ophthalmol.* 2001 Feb;85(2):228–30.
53. Thomasen H, Pauklin M, Steuhl KP, Meller D. Comparison of cryopreserved and air-dried human amniotic membrane for ophthalmologic applications. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009 Dec;247(12):1691–700.

54. Rahman I, Said DG, Maharajan VS, Dua HS. Amniotic membrane in ophthalmology: indications and limitations. *Eye (Lond)*. 2009 Oct;23(10):1954–61.
55. von Versen-Höynck F, Syring C, Bachmann S, Möller DE. The influence of different preservation and sterilisation steps on the histological properties of amnion allografts—light and scanning electron microscopic studies. *Cell Tissue Bank*. 2004;5(1):45–56.
56. Hennerbichler S, Reichl B, Pleiner D, Gabriel C, Eibl J, Redl H. The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. *Cell Tissue Bank*. 2007;8(1):1–8.
57. Ricci E, Vanosi G, Lindenmair A, Hennerbichler S, Peterbauer-Scherb A, Wolbank S, et al. Anti-fibrotic effects of fresh and cryopreserved human amniotic membrane in a rat liver fibrosis model. *Cell Tissue Bank*. 2013 Sep;14(3):475–88.
58. Kruse FE, Jousen AM, Rohrschneider K, You L, Sinn B, Baumann J, et al. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2000 Jan;238(1):68–75.
59. Wolbank S, Hildner F, Redl H, van Griensven M, Gabriel C, Hennerbichler S. Impact of human amniotic membrane preparation on release of angiogenic factors. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009 Dec;3(8):651–4.
60. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, et al. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials*. 2009 Feb;30(6):1056–65.
61. Niknejad H, Deihim T, Solati-Hashjin M, Peirovi H. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. *Cryobiology*. 2011 Dec;63(3):145–51.
62. Rodríguez-Ares MT, López-Valladares MJ, Touriño R, Vieites B, Gude F, Silva MT, et al. Effects of lyophilization on human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol*. 2009 Jun;87(4):396–403.
63. Hopkinson A, Shanmuganathan VA, Gray T, Yeung AM, Lowe J, James DK, et al. Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2008 Dec;14(4):371–81.
64. Jerman UD, Veranič P, Kreft ME. Amniotic membrane scaffolds enable the development of tissue-engineered urothelium with molecular and ultrastructural properties comparable to that of native urothelium. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014 Apr;20(4):317–27.
65. Chau DY, Brown SV, Mather ML, Hutter V, Tint NL, Dua HS, et al. Tissue transglutaminase (TG-2) modified amniotic membrane: a novel scaffold for biomedical applications. *Biomed Mater*. 2012 Aug;7(4):045011.
66. Adamowicz J, Pokrywczyńska M, Tworkiewicz J, Kowalczyk T, van Breda SV, Tyloch D, et al. New Amniotic Membrane Based Biocomposite for Future Application in Reconstructive Urology. *PLoS One*. 2016 Jan;11(1):e0146012.
67. Ma DH, Lai JY, Cheng HY, Tsai CC, Yeh LK. Carbodiimide cross-linked amniotic membranes for cultivation of limbal epithelial cells. *Biomaterials*. 2010 Sep;31(25):6647–58.
68. Lai JY, Wang PR, Luo LJ, Chen ST. Stabilization of collagen nanofibers with L-lysine improves the ability of carbodiimide cross-linked amniotic membranes to preserve limbal epithelial progenitor cells. *Int J Nanomedicine*. 2014 Nov;9:5117–30.
69. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005 Nov-Dec;23(10):1549–59.
70. Kang NH, Hwang KA, Kim SU, Kim YB, Hyun SH, Jeung EB, et al. Potential antitumor therapeutic strategies of human amniotic membrane and amniotic fluid-derived stem cells. *Cancer Gene Ther*. 2012 Aug;19(8):517–22.
71. Simerman AA, Perone MJ, Gimeno ML, Dumesic DA, Chazenbalk GD. A mystery unraveled: nontumorigenic pluripotent stem cells in human adult tissues. *Expert Opin Biol Ther*. 2014 Jul;14(7):917–29.
72. Parolini O, Soncini M, Evangelista M, Schmidt D. Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine? *Regen Med*. 2009 Mar;4(2):275–91.
73. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008 Feb;26(2):300–11.
74. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod*. 2007 Sep;77(3):577–88.
75. Pianta S, Bonassi Signoroni P, Muradore I, Rodrigues MF, Rossi D, Silini A, et al. Amniotic membrane mesenchymal cells-derived factors skew T cell polarization toward Treg and downregulate Th1 and Th17 cells subsets. *Stem Cell Rev*. 2015 Jun;11(3):394–407.
76. Silini AR, Cargnoni A, Magatti M, Pianta S, Parolini O. The Long Path of Human Placenta, and Its Derivatives, in Regenerative Medicine. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015 Oct;3:162.
77. Zaslavsky A, Baek KH, Lynch RC, Short S, Grillo J, Folkman J, et al. Platelet-derived thrombospondin-1 is a critical negative regulator and potential biomarker of angiogenesis. *Blood*. 2010 Jun;115(22):4605–13.
78. Niknejad H, Paeini-Vayghan G, Tehrani FA, Khayat-Khoie M, Peirovi H. Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. *Placenta*. 2013 Apr;34(4):340–5.
79. De D, Kmiecik G, Cargnoni A, Parolini O. Placenta-Derived Cells and Their Therapeutic Applications. V: Templeton NS, ur. *Gene and Cell Therapy*. Združene države Amerike: CRC Press; 2015. p. 773–94.
80. Puangsricharern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 1995 Oct;102(10):1476–85.
81. Bakhtiari P, Djalilian A. Update on limbal stem cell transplantation. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2010 Jan;17(1):9–14.

82. Meller D, Pires RT, Tseng SC. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *Br J Ophthalmol*. 2002 Apr;86(4):463–71.
83. Li W, Hayashida Y, He H, Kuo CL, Tseng SC. The fate of limbal epithelial progenitor cells during explant culture on intact amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Feb;48(2):605–13.
84. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 1997 Apr;349(9057):990–3.
85. Grueterich M, Tseng SC. Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane ex vivo. *Arch Ophthalmol*. 2002 Jun;120(6):783–90.
86. Zakaria N, Koppen C, Van Tendeloo V, Berneman Z, Hopkinson A, Tassignon MJ. Standardized limbal epithelial stem cell graft generation and transplantation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010 Oct;16(5):921–7.
87. Lužnik Z, Hawlina M, Maličev E, Bertolin M, Kopitar AN, Ihan A, et al. Effect of Cryopreserved Amniotic Membrane Orientation on the Expression of Limbal Mesenchymal and Epithelial Stem Cell Markers in Prolonged Limbal Explant Cultures. *PLoS One*. 2016 Oct;11(10):e0164408.
88. Baylis O, Figueiredo F, Henein C, Lako M, Ahmad S. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes. *J Cell Biochem*. 2011 Apr;112(4):993–1002.
89. Ahmad S, Osei-Bempong C, Dana R, Jurkunas U. The culture and transplantation of human limbal stem cells. *J Cell Physiol*. 2010 Oct;225(1):15–9.
90. Koizumi N, Rigby H, Fullwood NJ, Kawasaki S, Tanioka H, Koizumi K, et al. Comparison of intact and de-identified amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007 Jan;245(1):123–34.
91. Mikek K, Pfeifer V, Drnovšek-Olup B. Amniotic Membrane Transplantation in the Ocular Surgery. *Zdrav Vestn*. 2004;73:4.
92. Di Iorio E, Ferrari S, Fasolo A, Böhm E, Ponzin D, Barbaro V. Techniques for culture and assessment of limbal stem cell grafts. *Ocul Surf*. 2010 Jul;8(3):146–53.
93. Burman S, Sangwan V. Cultivated limbal stem cell transplantation for ocular surface reconstruction. *Clin Ophthalmol*. 2008 Sep;2(3):489–502.
94. Szabó DJ, Noer A, Nagymihály R, Josifovska N, Andjelic S, Veréb Z, et al. Long-Term Cultures of Human Cornea Limbal Explants Form 3D Structures Ex Vivo - Implications for Tissue Engineering and Clinical Applications. *PLoS One*. 2015 Nov;10(11):e0143053.
95. Birder L, Andersson KE. Urothelial signaling. *Physiol Rev*. 2013 Apr;93(2):653–80.
96. Acharya P, Beckel J, Ruiz WG, Wang E, Rojas R, Birder L, et al. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Aug;287(2):F305–18.
97. Hicks RM. The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1975 May;50(2):215–46.
98. Paner GP, Ro JY, Wojcik EM, Venkataraman G, Datta MW, Amin MB. Further characterization of the muscle layers and lamina propria of the urinary bladder by systematic histologic mapping: implications for pathologic staging of invasive urothelial carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2007 Sep;31(9):1420–9.
99. Romih R, Korošec P, de Mello W Jr, Jezernik K. Differentiation of epithelial cells in the urinary tract. *Cell Tissue Res*. 2005 May;320(2):259–68.
100. Mahfouz W, Elsalmy S, Corcos J, Fayed AS. Fundamentals of bladder tissue engineering. *Afr J Urol*. 2013;19(2):51–7.
101. El-Taji OM, Khattak AQ, Hussain SA. Bladder reconstruction: the past, present and future. *Oncol Lett*. 2015 Jul;10(1):3–10.
102. Onkološki inštitut Ljubljana. Rak sečnega mehurja, ledvičnega meha in sečevoda. Onkološki inštitut; 2016 [cited 2017 Dec 2]. Available from: https://www.onko-i.si/za_javnost_in_bolnike/vrste_raka/urogenitalni_raki/#c23082016
103. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*. 2006 Apr;367(9518):1241–6.
104. Rožman P, Semenič D, Smrke DM. The Role of Platelet Gel in Regenerative Medicine. V: Wislet-Gendebien S, ed. *Advances in Regenerative Medicine: InTech*. 2011. 105.
105. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg*. 2004 May;187(5 5A):11S–6S.
106. Koob TJ, Rennert R, Zabek N, Massee M, Lim JJ, Temenoff JS, et al. Biological properties of dehydrated human amnion/chorion composite graft: implications for chronic wound healing. *Int Wound J*. 2013 Oct;10(5):493–500.
107. Uçakhan OO, Köklü G, Firat E. Nonpreserved human amniotic membrane transplantation in acute and chronic chemical eye injuries. *Cornea*. 2002 Mar;21(2):169–72.
108. Mejía LF, Acosta C, Santamaría JP. Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. *Cornea*. 2000 May;19(3):288–91.
109. Forbes J, Fetterolf DE. Dehydrated amniotic membrane allografts for the treatment of chronic wounds: a case series. *J Wound Care*. 2012 Jun;21(6):290–6.
110. Sheikh ES, Sheikh ES, Fetterolf DE. Use of dehydrated human amniotic membrane allografts to promote healing in patients with refractory non healing wounds. *Int Wound J*. 2014 Dec;11(6):711–7.

111. Zelen CM, Serena TE, Denozieri G, Fetterolf DE. A prospective randomised comparative parallel study of amniotic membrane wound graft in the management of diabetic foot ulcers. *Int Wound J*. 2013 Oct;10(5):502–7.
112. Zelen CM. An evaluation of dehydrated human amniotic membrane allografts in patients with DFUs. *J Wound Care*. 2013;22(7):347–8, 50–1.
113. Zelen CM, Serena TE, Snyder RJ. A prospective, randomised comparative study of weekly versus biweekly application of dehydrated human amnion/chorion membrane allograft in the management of diabetic foot ulcers. *Int Wound J*. 2014 Apr;11(2):122–8.
114. Ciringier M, Frangež I, Smrke D. Najnovejša metoda zdravljenja ran z alograftom amnijske membrane. In: Smrke D, Nikolič J, ur. *Sodobni pristopi za učinkovito zdravljenje okuženih kirurških in kroničnih ran*; 2014 Apr 24–25; Portorož, Slovenija. Klinični oddelek za kirurške okužbe, Kirurška klinika, Univerzitetni klinični center; 2014. p. 48–51.
115. Frangež I, Smrke D. Amniotic membrane allograft, new technology in chronic wound treatment. *Wound management*. Sarajevo: Doktor Magazin; 2014. p. 23.
116. Willett NJ, Thote T, Lin AS, Moran S, Raji Y, Sridaran S, et al. Intra-articular injection of micronized dehydrated human amnion/chorion membrane attenuates osteoarthritis development. *Arthritis Res Ther*. 2014 Feb;16(1):R47.
117. Patel VR, Samavedi S, Bates AS, Kumar A, Coelho R, Rocco B, et al. Dehydrated Human Amnion/Chorion Membrane Allograft Nerve Wrap Around the Prostatic Neurovascular Bundle Accelerates Early Return to Continence and Potency Following Robot-assisted Radical Prostatectomy: Propensity Score-matched Analysis. *Eur Urol*. 2015 Jun;67(6):977–80.
118. Lužnik Z. Vzgoja in opredelitev človeških limbalnih epiteljskih matičnih celic (PhD Thesis). Ljubljana: Z. Lužnik; 2017.
119. 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 Nov-Dec;48(6):631–46.
120. Shortt AJ, Secker GA, Notara MD, Limb GA, Khaw PT, Tuft SJ, et al. Transplantation of ex vivo cultured epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Surv Ophthalmol*. 2007 Sep-Oct;52(5):483–502.
121. Tsai RJ, Li L, Chen J. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells(1). *Am J Ophthalmol*. 2000 Oct;130(4):543.
122. Sharma S, Tandon R, Mohanty S, Sharma N, M V, Sen S, et al. Culture of corneal limbal epithelial stem cells: experience from benchtop to bedside in a tertiary care hospital in India. *Cornea*. 2011 Nov;30(11):1223–32.
123. Mariappan I, Maddileti S, Savy S, Tiwari S, Gaddipati S, Fatima A, et al. *In vitro* culture and expansion of human limbal epithelial cells. *Nat Protoc*. 2010 Aug;5(8):1470–9.
124. Ang LP, Tanioka H, Kawasaki S, Ang LP, Yamasaki K, Do TP, et al. Cultivated human conjunctival epithelial transplantation for total limbal stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Feb;51(2):758–64.
125. Pathak M, Olstad OK, Drolsum L, Moe MC, Smorodinova N, Kalasova S, et al. The effect of culture medium and carrier on explant culture of human limbal epithelium: A comparison of ultrastructure, keratin profile and gene expression. *Exp Eye Res*. 2016 Dec;153:122–32.
126. Zakaria N, Possemiers T, Dhuhghail SN, Leysen I, Rozema J, Koppen C, et al. Results of a phase I/II clinical trial: standardized, non-xenogenic, cultivated limbal stem cell transplantation. *J Transl Med*. 2014 Mar;12(1):58.
127. Vazirani J, Basu S, Kenia H, Ali MH, Kacham S, Mariappan I, et al. Unilateral partial limbal stem cell deficiency: contralateral versus ipsilateral autologous cultivated limbal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol*. 2014;157(3):584–90.e1–2. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2013.11.011>.
128. Krishnamurthy G, Shilpa PN, Ahmad RE, Sulaiman S, Ng CL, Kamarul T. Human amniotic membrane as a chondrocyte carrier vehicle/substrate: *in vitro* study. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Dec;99(3):500–6.
129. Díaz-Prado S, Rendal-Vázquez ME, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Rodríguez-Cabarcos M, Fuentes-Boquete I, et al. Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair. *Cell Tissue Bank*. 2010 May;11(2):183–95.
130. Jin CZ, Park SR, Choi BH, Lee KY, Kang CK, Min BH. Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tissue Eng*. 2007 Apr;13(4):693–702.
131. Mahmoudi-Rad M, Abolhasani E, Moravvej H, Mahmoudi-Rad N, Mirdamadi Y. Acellular amniotic membrane: an appropriate scaffold for fibroblast proliferation. *Clin Exp Dermatol*. 2013 Aug;38(6):646–51.
132. Huang G, Ji S, Luo P, Liu H, Zhu S, Wang G, et al. Accelerated expansion of epidermal keratinocyte and improved dermal reconstruction achieved by engineered amniotic membrane. *Cell Transplant*. 2013;22(10):1831–44.
133. Redondo P, Giménez de Azcarate A, Marqués L, García-Guzman M, Andreu E, Prósper F. Amniotic membrane as a scaffold for melanocyte transplantation in patients with stable vitiligo. *Dermatol Res Pract*. 2011;2011:532139.
134. Sharifiaghdas F, Hamzehiesfahani N, Moghadasali R, Ghaemimanesh F, Baharvand H. Human amniotic membrane as a suitable matrix for growth of mouse urothelial cells in comparison with human peritoneal and omentum membranes. *Urol J*. 2007;4(2):71–8.
135. Wilshaw SP, Kearney J, Fisher J, Ingham E. Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells. *Tissue Eng Part A*. 2008 Apr;14(4):463–72.

136. Gholipourmalekabadi M, Sameni M, Radenkovic D, Mozafari M, Mossahebi-Mohammadi M, Seifalian A. Decellularized human amniotic membrane: how viable is it as a delivery system for human adipose tissue-derived stromal cells? *Cell Prolif.* 2016 Feb;49(1):115–21.
137. Chehelcheraghi F, Eimani H, Homayoonsadraie S, Torkaman G, Amini A, Alavi Majd H, et al. Effects of Acellular Amniotic Membrane Matrix and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Improving Random Skin Flap Survival in Rats. *Iran Red Crescent Med J.* 2016 Jun;18(6):e25588.
138. Tan SL, Sulaiman S, Pinguan-Murphy B, Selvaratnam L, Tai CC, Kamarul T. Human amnion as a novel cell delivery vehicle for chondrogenic mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank.* 2011 Feb;12(1):59–70.
139. Dobrowolski D, Orzechowska-Wylegala B, Wowra B, Wroblewska-Czajka E, Grolik M, Szczubialka K, et al. Cultivated Oral Mucosa Epithelium in Ocular Surface Reconstruction in Aniridia Patients. *BioMed Res Int.* 2015;2015:281870.
140. Amemiya T, Nakamura T, Yamamoto T, Kinoshita S, Kanamura N. Autologous transplantation of oral mucosal epithelial cell sheets cultured on an amniotic membrane substrate for intraoral mucosal defects. *PLoS One.* 2015 Apr;10(4):e0125391.
141. Tiwari S, Ali MJ, Balla MM, Naik MN, Honavar SG, Reddy VA, et al. Establishing human lacrimal gland cultures with secretory function. *PLoS One.* 2012;7(1):e29458.
142. Schrader S, Wedel T, Kremling C, Laqua H, Geerling G. Amniotic membrane as a carrier for lacrimal gland acinar cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007 Nov;245(11):1699–704.
143. Sanluis-Verdes A, Sanluis-Verdes N, Manso-Revilla MJ, Castro-Castro AM, Pombo-Otero J, Fraga-Mariño M, et al. Tissue engineering for neurodegenerative diseases using human amniotic membrane and umbilical cord. *Cell Tissue Bank.* 2017 Mar;18(1):1–15.
144. Mayer WJ, Grüterich M, Kook D, Sigg W, Kernt M, Messmer EM, et al. Modification of amniotic membrane as a depot carrier for bevacizumab - an *in-vitro* model for a slow release mechanism. *Curr Eye Res.* 2013 Apr;38(4):445–50.