

Ispitivanje inovativnog pristupa u primeni liofilizata tkiva amnionske membrane kod pacijenata sa suvim okom

Uvod

Bolest suvog oka je najčešća bolest površine oka. Međunarodna radna grupa za bolest suvog oka objavila je novu definiciju suvog oka 2017. godine u okviru TFOS DEWS II izveštaja (*engl. Tear Film and Ocular Surface Society-TFOS, engl. Dry Eye Workshop-DEWS*) prema kojoj je suvo oko multifaktorska bolest površine oka, koju karakteriše gubitak homeostaze suznog filma i prisustvo očnih simptoma, kod koje nestabilnost suznog filma, hiperosmolarnost, zapaljenje površine oka i njeno oštećenje, kao i neurosenzorne abnormalnosti imaju etiološku ulogu (1).

Nedostatak bilo koje komponente suza (lipidne ili vodeno-mucinske) može dovesti do nestabilnosti suznog filma, povećane evaporacije vodene komponente suznog filma i hiperosmolarnosti, što predstavlja ključni mehanizam u patogenezi suvog oka (2, 3).

Tipična klinička slika sastoji se od manje ili više izraženog crvenila konjunktive i oštećenja površine oka sa tačkastim epitelnim erozijama, koji u kasnim stadijumima mogu progredirati i značajno zakomplikovati tok bolesti (4). Subjektivni simptomi kod suvog oka često uključuju: crvenilo, grebanje, osećaj stranog tela, bol i zamagljen vid. Tok bolesti je često hroničan, te zbog pomenutih simptoma, bolest suvog oka ima veliki uticaj na vid i kvalitet života jer simptomi često ometaju svakodnevne aktivnosti, kao što su čitanje, pisanje, gledanje televizije, vožnja automobila i rad na računaru (4).

Kao značajan faktor rizika za bolest suvog oka navodi se upotreba računara/video-displej terminala (5). S tim u vezi, studije ukazuju na značajno pojačavanje simptoma suvog oka kod korisnika računara u poređenju sa kontrolama (5). Mnoge studije su ukazale na odnos između gledanja u monitor računara i smanjenja stope treptanja, povećanog isparavanja suza, abnormalnosti površine oka, disfunkcije Meibomovih žlezda, povećanja inflamantornih citokina, povećanja osmolarnosti i smanjenja sekrecije mucina, što sve vodi u začarani krug zapaljenja kojim se održava bolest suvog oka (5). Kod pacijenata je registrovano znatno kraće vreme pucanja suznog filma usled korišćenja računara duže od 4 sata dnevno, u poređenju sa onima sa manje od 4 sata dnevnog korišćenja. Shodno tome, upotreba računara je faktor rizika koji doprinosi bolesti suvog oka. Prema podacima meta-analize, ukupna prevalencija bolesti suvog oka kod korisnika računara je oko 49,5%, dok na osnovu dijagnostičkih kriterijuma TFOS DEWS II, globalna prevalencija suvog oka iznosi 29,5%, kod žena 28,1% i kod muškaraca 24,9% (5, 6).

Savremeni koncept lečenja bolesti suvog oka uz lubrikaciju, podrazumeva i kontrolu inflamacije na površini oka uključujući pulsne doze kortikosteroida, ciklosporin A, kao i autologni serum za teže stadijume bolesti površine oka (7, 8). Kod srednje teških/teških oblika suvog oka, oštećenje površine oka je najčešće ireverzibilno, pa je cilj terapije da se ublaže subjektivne tegobe i simptomi bolesti i spreči dalja progresija epiteliopatije površine oka (9). U ovim stadijumima bolesti značajno mesto ima primena autolognog seruma koji u toku primene dovodi do smanjenja subjektivnih tegoba ograničenog trajanja, pa se često terapija ponavlja, što podrazumeva često vađenje krvi i posebne mere čuvanja seruma zbog visokog rizika od kontaminacije (9). Amnionska membrana je idealno tkivo za transplantaciju u očnoj hirurgiji zbog svojih antigenskih, imunoloških, antimikrobnih i antifibroblastičkih osobina (10). U tom smislu bi primena liofilizata tkiva amnionske membrane u obliku standardno pakovanih kapi za oči omogućila bezbedniju aplikaciju kod šire populacije pacijenata sa bolestima površine oka. Trenutno nije dostupna terapija

koja bi značajno poboljšala nalaz na rožnjači kod pacijenata sa umerenom i teškom formom suvog oka i koja bi dovela do potpunog izlečenja, pa su sasvim opravdani napor da se terapijski protokoli unaprede i međusobno uporede.

Dosadašnje studije o primeni kapi ekstrakta amnionske membrane su pokazale da se osećaj nelagodnosti kod ovih pacijenata značajno smanjio, ali da i dalje perzistira određeni stepen oštećenja površine oka (10). Studija sprovedena u Italiji na 21 pacijentu sa različitim oštećenjima na rožnjači pokazala je da je kod svih pacijenata nakon 15 do 30 dana rožnjača postala negativna na test bojenja fluoresceinom i da je epitel izgledao pravilniji, a pacijenti su prijavili poboljšanje simptoma (11). Rezultati retrospektivne studije sprovedene u Španiji koja je uključila 36 pacijenata sa suvim okom i trofičkim ulkusima na rožnjači pokazali su simptomatsko poboljšanje u obe grupe. Što se tiče pacijenata koji su prethodno koristili autologni serum nisu nađene statistički značajne razlike u objektivnom ili subjektivnom poboljšanju (12). Prospektivna studija sprovedena takođe u Španiji na 25 pacijenata sa teškom formom suvog oka i neurotrofičkim ulkusima, koji su dobijali kapi u trajanju od najmanje 4 nedelje, pokazala je da se funkcija vida nije značajno promenila nakon tretmana, ali je postojalo statistički značajno poboljšanje simptoma kao što su osećaj stranog tela, svrab i peckanje, kao i kliničke slike u smislu potpunog zarastanja defekta kod ulkusa rožnjače (13).

Za sada postoje ograničeni publikovani podaci o efikasnosti ekstrakta amnionske membrane u vidu kapi za oči. Međutim, istraživanja ukazuju na prednosti kada se uporedi ova formulacija ekstrakta amnionske membrane sa drugim poznatim komercijalnim preparatima u lečenju bolesti suvog oka (10). Potrebna su dodatna istraživanja da bi se odredila precizna uloga i značaj ovog leka. U našoj zemlji do sada nije rađeno istraživanje uticaja liofilizata tkiva amnionske membrane u lečenju bolesti suvog oka, kao i uticaja primene ovog liofilizata na kvalitet života obolelih.

Radna hipoteza:

Očekuje se dobar terapijski odgovor kao i njegovo održavanje u vidu smanjenja simptoma i znakova bolesti suvog oka kod ispitanika lečenih liofilizatom tkiva amnionske membrane u vidu kapi za oči. Pored toga, očekuje se poboljšanje kvaliteta života, kao i identifikacija socijalno-demografskih i kliničkih prediktivnih faktora promene kvaliteta života ispitanika tokom perioda praćenja. Nisu očekivani neželjeni događaji primene liofilizata tkiva amnionske membrane.

Ciljevi:

1. Ispitati simptome i znakove bolesti suvog oka kod ispitanika lečenih kapima za oči sa liofilizatom tkiva amnionske membrane tokom 6 meseci praćenja.
2. Ispitati kvalitet života osoba sa suvim okom, na inicijalnom pregledu i nakon 6 meseci lečenja liofilizatom tkiva amnionske membrane.
3. Ispitati socijalno-demografske i kliničke prediktivne faktore promene kvaliteta života osoba sa suvim okom tokom 6 meseci praćenja.
4. Praćenje pojave neželjenih efekata tokom primene liofilizata tkiva amnionske membrane tokom 6 meseci praćenja.
5. Proceniti simptome i znakove kod osoba sa suvim okom 3 meseca nakon prestanka terapije u vidu kapi za oči sa liofilizatom tkiva amnionske membrane.

Materijal i metode:

Tip studije: Prospektivna kohortna studija.

Mesto i period istraživanja: Istraživanje će biti sprovedeno na Klinici za očne bolesti, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (UKCS), u periodu od oktobra 2024. do jula 2025. godine.

Selekcija ispitanika: U istraživanje će biti uključeno 40 ispitanika (80 očiju) starosti preko 18 godina, koji imaju postavljenu dijagnozu suvog oka i leče se na Klinici za očne bolesti UKCS.

Veličina uzorka je formirana na osnovu količine kapi koju je moguće napraviti iz jedne amnionske membrane namenjene za sve ispitanike prilikom jedne posete, a u tehnički vrlo složenom postupku. Potrebna minimalna veličina uzorka za detekciju veličine efekta od 0,33 u analizi varijanse 7 ponovljenih merenja za NEI VFQ-25 za nivo statističke značajnosti pacijenta od 0,05, statističku snagu od 0,95, pretpostavljene korelacije ponovljenih merenja od 0,3 i korekcije za narušavanje sferičnosti iznosiće od 33. Veličina efekta biće dobijena na osnovu pretpostavljenih odnosa vrednosti objašnjenja i rezidualne varijante od 0,1 prema 0,9. Izračunati minimalni broj ispitanika (33) biće povećan za 20% zbog očekivanog gubitka podataka tokom trajanja studije (nedostajući ili neprimenljivi podaci) pa će konačan minimalan broj planiranih ispitanika biti 40.

Razvijen je protokol za obradu amnionske membrane kao ekstrakta koji će se rehidrirati i mešati sa sterilnim injekcionim rastvorom i potom primenjivati lokalno kao kapi za oči. Odlukom Republičke stručne komisije za ćelije i tkiva Ministarstva zdravlja RS, doneta je pozitivna odluka u vezi sa korišćenjem amnionskih membrana u svrhu lečenja oftalmoloških pacijenata (broj: 2763/2). Amnionske membrane će biti uzete posle elektivnog carskog reza obavljenog u Ginekološko-akušerskoj klinici „Narodni front“, uz prethodnu saglasnost pacijentkinja. Kod svih donora biće urađeno testiranje uzoraka krvi na viruse hepatitis B, C i HIV. Tkivo amnionske membrane će se potom transportovati u sterilnoj kesi predviđenoj za transport solidnih organa i tkiva za transplantaciju. Prevoz tkiva amnionske membrane do Klinike za očne bolesti će se obavljati namenskim vozilom UKCS. Poslovno tehnička saradnja između dve ustanove regulisana je ugovorom kojim je ujedno regulisan i proces preuzimanja tkiva amnionskih membrana na bezbedan i primenljiv način (broj: 03001/22).

Po pristizanju tkiva na Kliniku za očne bolesti, biće započet postupak obrade amnionske membrane u Očnoj banci. Očna banka UKCS je osnovana od strane Ministarstva zdravlja RS sa dozvolom za rad i ispunjava sve uslove potrebne za program konzervacije, prezervacije i obrade tkiva. Nakon uzimanja tkiva pod sterilnim uslovima, 24 časa će se vršiti čuvanje sa koktelom antibiotika i antimikotika, koji pokrivaju većinu gram-pozitivnih, gram-negativnih bakterija i najčešćih gljivica u sterilnom fiziološkom rastvoru. Nakon toga će se vršiti drugo ispiranje u sterilnom fiziološkom rastvoru sa antibioticima, a potom će se vršiti odvajanje od horiona u sterilnoj jedinici (laminar Flow). Ručno će se odvajati delovi da bi se otklonili ostaci tkiva posteljice i iseći na veličinu od 5 do 10 cm i ti delovi amnionske membrane će se stavljati u flašice kako bi se izvršila njihova liofilizacija.

Amnionske membrane će se potom liofilizovati u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (Lyovac GT 2), tako što će se bočice sa tkivom veličine do 10 cm stavljati u liofilizator nakon čega će se dobiti prah liofilizovane amnionske mebrane. Poslovno-tehnička saradnja između dve ustanove regulisana je odobrenjem od strane Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (broj:01-1232). Pod sterilnim uslovima, liofilizirane membrane će biti rastvorene u

sterilnom injekcionom rastvoru prema sledećoj proceduri: 5g liofilizovanog praha amnionske membrane (LAM) će se mešati sa 10 ml sterilne injekcione vode, koja će se potom filtrirati pomoću membranskog injekcionog filtera (*Versapor membrane, PALL Medical*) u Očnoj banci, Klinike za očne bolesti. Dobijena tečnost za aplikovanje u vidu kapi za oči čuvaće se u frižideru na temperaturi od 5 stepeni, najduže 14 dana od dana rastvaranja liofilizovanog praha amnionske membrane.

Kriterijumi za uključenje u studiju će biti: uzrast iznad 18 godina, potvrđena dijagnoza suvog oka, korišćenje kapi ciklosporin A u poslednja 3 meseca pre uključjenja u studiju, provođenje ≥ 1 sata gledajući u monitor računara i informisani pristanak za uključenje u studiju.

Kriterijumi za isključenje iz studije će biti: bilo koja oftalmološka hirurška procedura u poslednjih 6 meseci, preosetljivost na kapi za oči, korišćenje kortikosteroidnih kapi u proteklih mesec dana, infekcija oka, trudnoća, laktacija, imunodeficijencija i nosioci kontaktnih sočiva.

Svi ispitanici će potpisati informisani pristanak o lečenju liofilizatom tkiva amnionske membrane, kao i o učešću u istraživanju u sklopu izrade doktorske disertacije i dobiće detaljna uputstva o načinu čuvanja kapi. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora UKCS (broj: 341/16, dopuna odluke broj: 1051/23).

Instrumenti merenja:

Uz pomoć opšteg standardnog upitnika biće prikupljeni socijalno-demografski (uzrast, pol, bračni status, stepen obrazovanja, vreme provođenja ispred računara i drugo) i klinički podaci (simptomi bolesti suvog oka, dužina trajanja bolesti, težina bolesti, prethodna terapija, vremenski okvir od pojave prvih simptoma do prvog pregleda, vidna oština, vreme prekida prekornealnog suznog filma, stepen bojenja rožnjače i vežnjače, ekspresibilnost Meibomovih žlezda i kvalitet meibuma, količina lučenja suza, osetljivost rožnjače, intraokularni pritisak, nalaz na prednjem i zadnjem segmentu oka).

U cilju dobijanja navedenih kliničkih podataka, na osnovu kojih bi se procenio uticaj kapi na tok bolesti suvog oka, biće sprovedeni sledeći pregledi:

1. Određivanje vidne oštine (optotip po *Snellenu*), nekorigovane, korigovane i kroz stenopeični otvor.

2. Određivanje vremena prekida prekornealnog suznog filma (engl. *tear break up time*, TBUT). Granična vrednost je 10 sekundi.

3. Nakon merenja TBUT/a, procenjivaće se stepen bojenja površine rožnjače i vežnjače fluoresceinom pomoću skale po Oxfordu, prebrojavanjem broja tačkastih erozija na površini rožnjace: 0: 0-1 punktififormnih erozija epitela (PEE), 1: do 10 PEE, 2: do 32 PEE, 3: do 100 PEE, 4: preko 100 PEE, konfluentno bojenje i prisustvo filamenata.

4. Bojenje vežnjače vitalnim bojama (fluorescein, lizamin zelena i bengal roze) sa gradiranjem prema Oxford skali. Posebno će se gradirati eksponirane zone temporalne i nazalne bulbarne vežnjače na sledeći način: 0: 0-1 obojena tačkica, 1: do 10 PEE, 2: do 32 PEE, 3: do 100 PEE, 4: preko 100 PEE, konfluentno bojenje.

5. Procena ekspresibilnosti Meibomovih žlezda i kvaliteta meibuma.

6. Nakon pauze od desetak minuta izvodiće se Širmerov test I. Širmer I će se izvoditi bez anestezije, u trajanju od 5 minuta. Vrednost veća od 10 mm je normalna; 6 do 10 mm, blago do umereno; i 0 do 5 mm, teško hiposekretorno suvo oko.

7. Biomikroskopski pregled prednjeg i zadnjeg segmenta oka.
8. Merenje osetljivosti rožnjače pomoću *Cochet/Bonne*-ovog esteziometra.
9. Merenje intraokularnog pritiska aplanacionom metodom po Goldamanu.

Za procenu vida i očnih simptoma koristiće se i Indeks bolesti površine oka (engl. *Ocular Surface Disease Index*, OSDI-6) (14), a za merenje kvaliteta života osoba sa suvim okom koristiće se Upitnik o vizuelnom funkcionisanju Nacionalnog očnog instituta (engl. *National Eye Institute Visual Functioning Questionnaire*, NEI VFQ-25) (15).

OSDI-6 je upitnik koji meri simptome bolesti i efekte bolesti suvog oka na vid u poslednjih mesec dana. Upitnik ima 3 podskale sa po 2 pitanja: očni simptomi (osetljivost očiju na svetlo i zamagljen vid), funkcije vezane za vid (problemi u toku vožnje, pri gledanju televizije) i faktori spoljašnje sredine (nelagodnost pri vetru, nelagodnost pri niskoj vlažnosti vazduha) (14). Ispitanici ocenjuju svoje odgovore na skali od 0 do 4, pri čemu 0 odgovara „nikada“, a 4 odgovara „sve vreme“. Izračunava se ukupni skor koji se kreće u rasponu od 0 do 24, a vrednost < 4 označava normalan nalaz, dok rezultat ≥ 4 označava suvo oko (14). OSDI-6 upitnik je preveden na srpski jezik uz dozvolu autora originalne verzije.

NEI VFQ-25 je jedan od najčešće korišćenih upitnika za procenu vidne funkcije i kvaliteta života osoba sa oboljenjima oka, a koji je preveden i validiran na srpski jezik (15). Sastoji se od 25 pitanja usmerenih na vidnu funkciju, plus jedno dodatno pitanje koje se odnosi na opšte zdravlje. Pitanja su svrstana u 11 podskala: opšti vid, bol u oku, aktivnosti na blizinu, aktivnosti na daljinu, društveno funkcionisanje vezano za vid, mentalno zdravlje vezano za vid, poteškoće u specifičnim situacijama vezano za vid, zavisnost od vida u specifičnim situacijama, u vožnji, u raspoznavanju boja i u perifernom vidu. Svaka stavka je kodirana i skorovi se kreću u rasponu od 0 do 100. Viši skorovi ukazuju na lošiji kvalitet života specifičan za vid (15).

Praćenje ispitanika:

Prilikom uključivanja ispitanika u studiju (inicijalni pregled), biće prikupljeni socijalno-demografski (uzrast, pol, stepen obrazovanja, vreme provođenja ispred računara) i klinički podaci (simptomi bolesti suvog oka, dužina trajanja bolesti, težina bolesti, prethodna terapija). Dijagnostički testovi biće ponovljeni nakon 14 dana, a potom jednom mesečno do isteka 6 meseci od inicijalnog pregleda. Potom će se obaviti još jedan kontrolni pregled 3 meseca po isteku primene terapije, što podrazumeva ukupno 7 ponovljenih merenja. Kvalitet života obolelih od suvog oka biće utvrđivan na inicijalnom pregledu i nakon šestomesečnog praćenja.

Na inicijalnom pregledu i prilikom svake naredne posete, svi ispitanici će dobiti liofilizat tkiva amnionske membrane u vidu kapi za oči, koji će ukapavati u oba oka 6 puta dnevno u narednih 6 meseci, kako bi bila omogućena kontinuirana terapija tokom dana i kako se inače koristi već postojeća terapija autolognim serumom.

U periodu trajanja studije, svi uključeni ispitanici će nastaviti da koriste oftalmološku terapiju za suvo oko koju su dobijali u prethodna 3 meseca (kapi ciklosporin A). Najmanje 6 sati pre planiranog pregleda, ispitanici neće ukapavati kapi.

Nakon završetka primene liofilizata tkiva amnionske membrane, pacijenti će nastaviti da koriste svoju uobičajenu terapiju za suvo oko, a po kriterijumima TFOS DEWS II.

Statistička analiza:

U analizi podataka biće korišćene deskriptivne i analitičke statističke metode. Kategorijalni i numerički podaci biće prikazani grafički i tabelarno. Dobijeni podaci statistički će biti analizirani sledećim parametrima: aritmetička sredina, medijana, standardna devijacija, minimum, maksimum, 95% interval poverenja. Za utvrđivanje normalnosti distribucije varijabli biće korišćeni *Kolmogorov-Smirnov* i *Shapiro-Wilk* testovi. Varijable čije testiranje ne zadovolji normalnost distribucije, obrađivaće se neparametarskim statističkim testovima. Od analitičkih statističkih metoda biće korišćeni parametarski testovi za analiziranje razlike između grupa (t- test, ANOVA) i neparametarski (Hi-kvadrat test, *Wilcoxon Signed Ranks* test). ANOVA test će se koristiti za ponovljena merenja, kao i neparametarski test (*Kruskal-Wallis*) za situacije sa ponovljenim merenjima i heterogenim podacima. Za ispitivanje povezanosti i modelovanje odnosa zavisne sa jednom ili više nezavisnih varijabli biće korišćena linearna regresiona analiza. U analizi podataka korišće se kondicionalna logistička regresija kao i robusna ili kvantilna regresija. Podaci će se zatim podvrgnuti statističkoj analizi u SPSS-u, ver.20.0, a razlika će se smatrati značajnom ako je nivo značajnosti (p) < 0,05.

Potencijalni naučni doprinos:

Značaj istraživanja bolesti suvog oka proizilazi pre svega iz činjenice da je reč o oboljenju koje remeti svakodnevne aktivnosti pacijenta, a za koje još uvek ne postoji konkretna terapija koja bi dovela do izlečenja. Kapi za oči ekstrakta amnionske membrane imaju delotvoran uticaj na oštećen epitel rožnjače. Primena ovih kapi bi omogućila bezbedniju aplikaciju kod šire populacije pacijenata sa bolestima površine oka, s obzirom da je dosadašnja terapija autolognim serumom podrazumevala često vađenje krvi i posebne mere čuvanja seruma zbog visokog rizika od kontaminacije. Stoga su sasvim opravdani naponi brojnih istraživača da se unapredi terapija, tj. da se pronade što efektivniji i bezbedniji lek u lečenju bolesti suvog oka. Kada se uzmu u obzir dosadašnja saznanja o lečenju, dolazi se do zaključka da bi lek koji bi smanjio tegobe pacijenata sa suvim okom i pospešio kliničku sliku, ublažio komplikacije i skratio vreme trajanja bolesti, bio od ogromnog značaja. U teorijskom smislu, ova tema daje svoj doprinos kroz sistematizaciju postojećih saznanja u lečenju suvog oka, kao i postavljanju osnova za dalje istraživanje u ovom pravcu. Praktičan doprinos ove teme je da na osnovu dobijenih rezultata, očekujemo dodatne preporuke u lečenju u cilju što bržeg izlečenja, bez komplikacija i sa minimalnim znacima bolesti na površini oka. S obzirom na to da bolest suvog oka može da izazove značajnu nelagodu u očima obolelih osoba, kao i zamagljen vid i da zbog toga utiče na njihov svakodnevni život, vrlo je važno ispitati kvalitet života osoba sa suvim okom. Prema našim saznanjima, do sada nije publikovano istraživanje koje je ispitivalo uticaj kapi za oči ekstrakta amnionske membrane na tok bolesti kod pacijenata sa suvim okom, kao i na njihov kvalitet života.

Reference:

1. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, et al. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf.* 2017; 15(3):276-283.
2. Stevenson W, Chauhan SK, Dana R. Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder. *Arch Ophthalmol.* 2012; 130(1):90-100.

3. Bron AJ, de Paiva CS, Chauhan SK, Bonini S, Gabison EE, Jain S, et al. TFOS DEWS II pathophysiology report. *Ocul Surf*. 2017; 15(3):438-510.
4. Messmer EM. *Dtsch Arztebl Int*. 11 The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. 2015; 112(5):71-81.
5. Talens-Estarellles C, García-Marqu'es JV, Cervino A, García-L'azaro S. Use of digital displays and ocular surface alterations: A review. *Ocul Surf*. 2021; 19:252-265.
6. Papas E. The global prevalence of dry eye disease: A Bayesian view. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2021; 41(6):1254-1266.
7. De Paiva CS, Corrales RM, Villarreal AL, Farley WJ, Li DQ, Stern ME, et al. Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye. *Exp Eye Res* 2006; 83:526-35.
8. Boboridis KG, Konstas AG. Evaluating the novel application of cyclosporine 0.1% in ocular surface disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2018; 19(9):1027-1039.
9. Urzua CA, Vasquez DH, Huidobro A, Hernandez H, Alfaro J. Randomized Double-Blind Clinical Trial of Autologous Serum Versus Artificial Tears in Dry Eye Syndrome. *Curr Eye Res*. 2012; 37(8):684-8.
10. Murri M, Moshirfar M, Birdsong O, Ronquillo Y, Ding Y, Hoopes P. Amniotic membrane extract and eye drops: a review of literature and clinical application. *Clin Ophthalmol*. 2018; 12:1105-1112.
11. P Bonci, P Bonci, A Lia: Suspension made with amniotic membrane: clinical trial. *Eur J Ophthalmol*. 2005; 15(4):441-5.
12. Sabater-Cruz N, Figueras-Roca M, Ferrán-Fuertes M, Agustí E, Martínez-Conesa E, Pérez-Rodríguez M, Vilarrodona A, Casaroli-Marano R. Amniotic membrane extract eye drops for ocular surface diseases: use and clinical outcome in real- world practice. *Int Ophthalmol* 2021; 41(9):2973-2979.
13. Pérez ML, Barreales S, Sabater-Cruz N, Martinez-Conesa EM, Vilarrodona A, Casaroli-Marano RP. Amniotic membrane extract eye drops: a new approach to severe ocular surface pathologies. *Cell Tissue Bank*. 2022; 23(3):473-481.
14. Pult H, Wolffsohn JS. The development and evaluation of the new Ocular Surface Disease Index-6. *Ocul Surf*. 2019; 17(4):817-821.
15. Kovac B, Vukosavljevic M, Kovac J, Resan M, Trajkovic G, Jankovic J, Smiljanic M, Grgurevic A. Validation and cross-cultural adaptation of the National Eye Institute Visual Function Questionnaire (NEI VFQ-25) in Serbian patients, *Health Qual Life Outcomes* 2015; 15:13:142.