

Применение амниотической мембраны в офтальмохирургии

Амниотическая мембрана является самой внутренней из трех плодных оболочек. Впервые в хирургии она была использована в 1910 г. при лечении ожогов кожи. В последующем она применялась для улучшения регенерации тканей при повреждениях кожи и слизистых оболочек. Не так давно ее эффективность была продемонстрирована при лечении заболеваний поверхности глаза. Во многих клинических случаях применение амниотической оболочки является альтернативой уже известным способам лечения. Дальнейшие исследования, безусловно, помогут понять механизм действия, определить эффективность и рациональные показания к применению в офтальмологии.

Ключевые слова: амниотическая мембрана, реконструкция поверхности глаза

Halina Sitnik, Ludmila Yachnitzkaya

The Amniotic Membrane in Ophthalmosurgery.

The amniotic membrane is the innermost of the three layers forming the fetal membranes. It was first used in surgery in 1910 in skin transplantation. Thereafter it has been used for cutaneous and mucous lesions for regeneration of tissues. In recent years its effectiveness has been demonstrated in the treatment of diseases of the ocular surface. In many clinical situations it offers an alternative to existing management options. Further studies will undoubtedly reveal the true potential of the membrane, mechanisms of its action, and the effective use of this tissue in ophthalmology.

Key words: amniotic membrane, limbus, ocular surface

Амниотическая мембрана (АМ) – прозрачная, аваскулярная плодная оболочка, развивающаяся из фетальной эктодермы и состоящая из слоя эпителиальных клеток, расположенных на основной мембране, и соединительнотканной стромы. Впервые о применении АМ для устранения кожных дефектов сообщил J.Davis в 1910 г. В 1913 г. M.Stern и N.Sabella независимо друг от друга применили АМ для лечения ожогов и изъязвлений поверхности кожи (4). Они предположили, что поскольку АМ и кожа имеют единое происхождение, то ее применение обоснованно при лечении кожных дефектов. Авторы отмечали уменьшение боли, улучшение эпителизации, отсутствие инфекционных осложнений на травмированной кожной поверхности. В дальнейшем АМ успешно применялась при лечении ожогов и трудноэпителизирующихся язв кожи, использовалась при реконструктивных операциях в гинекологии, кардиохирургии, при пластике слизистой оболочки носа, барабанной полости (4).

В офтальмохирургии АМ впервые применили A.De Roth и A.Sorsby в 40-х гг 20 века при лечении ожогов глаз. Затем амнион применялся для склероукрепляющих операций, пластики склеры при проникающих ранениях. Однако, данный способ лечения был до недавнего времени неостребованным без очевидных на то причин. Современный этап применения АМ в офтальмохирургии открыл S.Tseng с коллегами в 1997 г. Ими был разработан способ консервации АМ, который в настоящее время считается стандартным во многих офтальмологических клиниках мира. АМ успешно используется для лечения ожогов глаз, язв роговицы, буллезной кератопатии, персистирующих эрозий роговицы, синдрома Стивенса-Джонсона, пемфигоида,

рецидивирующего птеригиума, симблефарона, а также для формирования конъюнктивальной полости при анофтальмическом синдроме.

Анатомо-функциональные особенности АМ

АМ состоит из пяти слоев: амниотический эпителий, базальная мембрана, компактный слой, слой фибробластов, спонгиозный слой. Толщина ее варьирует от 0,02 мм до 0,5 мм. Внеплацентарная зона амниона выстлана кубическим или утолщенным эпителием, в плацентарной зоне он в основном цилиндрический. Амниотический эпителий обладает высокой метаболической активностью. Его цитоплазма богата липидами (фосфолипиды, лецитин, кефалин, триглицериды и др.), полисахаридами, протеинами, мукополисахаридами, фосфорными соединениями, имеется также богатый арсенал ферментов, в том числе ферменты синтеза простагландинов: фосфолипазы, простагландин синтазы, циклооксигеназы. Базальная мембрана расположена под амниотическим эпителием, она представляет собой сеть ретикулярных волокон. К базальной мембране прилегает компактный слой, состоящий из переплетающихся, тесно расположенных ретикулярных волокон. За ним следует слой фибробластов. Базальная мембрана состоит из большого количества протеогликанов, богатых сульфатом гепарина, которые по-видимому выполняют барьерную функцию, регулируя проницаемость АМ. Амнион содержит большое количество коллагена, гиалурона и, преимущественно малых протеогликанов, таких как бигликан и декорин. Коллаген 1, 3, 4, 5 и 7 типов, ламинин, фибронектин найдены в базальной мембране и стромальном амнионе. K.Fukuda et al. в 1999г (5) доказали схожесть структуры ламинина-1,-5, фибронектина и коллагена 7 типа в базальных мембранах конъюнктивы, роговицы и АМ, что объясняет высокую способность амниона к биоинтеграции в ткани глаза. Спонгиозный слой построен из ретикулярных волокон, между петлями которых накапливается жидкость. В этом слое встречаются фибробласты и макрофаги.

Иммунологические особенности АМ. Клетки эпителия АМ не имеют на своей поверхности HLA-A,B,C или DR-антигенов. Однако, радиологические исследования *in vitro* в среде культивированных амниотических клеток выявили, что незначительные количества данных субстанций все же синтезируются. Это было подтверждено исследованиями J.Houlihan et al. (1995), которые обнаружили экспрессию антигенов класса 1b HLA и крайне ограниченную экспрессию антигенов класса 1a. L.Sutton et al. (1986) показали, что соединительнотканый слой амниона содержит мононуклеарные фагоциты, которые вероятнее всего и отвечают за экспрессию вышеуказанных антигенов (4). Иммунологический ответ на трансплантат АМ не зарегистрирован: при исследовании на добровольцах не было выявлено ни одного случая клинического проявления острой реакции отторжения трансплантата, также не выявлено ни одного случая продукции антител против HLA-антигенов. M.Kubo et al. (2001) на модели ксенотрансплантации АМ льюисовским крысам не обнаружили значимого иммунологического ответа при трансплантации АМ в зону лимба и интракорнеально.

Цитокины АМ. Преобладающими цитокинами амниотического эпителия являются интерлейкин 6 и 8. Они обнаружены в высоких концентрациях в амниотической жидкости. J.Keelan et al. (1999) выявили эти цитокины в среде с культивированными амниотическими клетками в соотношении ИЛ6:ИЛ8=5:1 (такое же как и в амниотической жидкости). Экспрессия этих цитокинов увеличивается в присутствии ИЛ-1?, ФНО-?, бактериальных липополисахаридов и подчинена

регуляции стероидами (дексаметазон). ИЛ-1 β продуцируется клетками амниотического эпителия *in vitro* и рассматривается как один из регуляторов синтеза простогландинов. P.Cheung et al. (1990) обнаружили в АМ простогландин-дегидрогеназу и простогландин-инактивирующий фермент.

Обнаруженный в АМ человеческий амниотический интерферон- γ (АИФ- γ) не связан антигенно с человеческим ИФ- γ , - β или - α . Он проявляет схожую биологическую активность с ИФ- γ и - β , однако кроме этого обладает и значительной противовирусной активностью, которой не имеют ИФ- γ и - β .

При изучении АМ, консервированной в течение месяца при t -80 $^{\circ}$ С, были обнаружены при помощи ПЦР на мРНК и при помощи ELISA многочисленные факторы роста: TGF- β , TGF- β 1, - β 2 и - β 3, EGF, KGF, HGF, bFGF. Более высокий уровень факторов роста был найден в АМ с сохраненным эпителием, что свидетельствует об их эпителиальном происхождении. В настоящее время именно с наличием этих факторов в АМ связывают ее способность активировать процесс эпителизации поверхности глаза. В АМ обнаружена также группа ферментов, называемая тканевыми ингибиторами протеаз, которые вызывают апоптоз воспалительных клеток, ответственных за лизис стромы роговицы. Они также опосредованно влияют на синтез биологически активных веществ в кератоцитах в ответ на действие медиаторов воспаления.

Эффекты, возникающие при трансплантации амниотической мембраны: предотвращение эпителиального апоптоза, улучшение миграции эпителиальных клеток, улучшение дифференцировки эпителиальных клеток, снижение процессов фиброобразования, угнетение неоваскуляризации. Для объяснения благотворного терапевтического эффекта трансплантации АМ были предложены различные механизмы. В настоящее время доказанным является тот факт, что консервированная АМ, в отличие от «свежей», представляет собой инертную ткань, не содержащую живых клеток (1). Способности консервированной АМ влиять на процессы репарации обусловлены, главным образом, изменением локальной среды при помощи факторов роста и цитокинов, локализующихся в эпителиальных клетках, поэтому при консервации амниона особое внимание уделяют сохранению морфологии эпителия. Таким образом, имеются некоторые различия в степени выраженности тех или иных терапевтических эффектов при применении консервированного и «свежего» амниона, что дает хирургу возможность выбора в зависимости от потребностей конкретного клинического случая (таблица 1).

Таблица 1

Сравнительная оценка эффективности применения «свежего» и консервированного амниона

Тип амниона	Купирование воспалительного синдрома	Эпителизация	Васкуляризация и фиброз	Рассасывание АМ
«свежий»	На 1-3 сутки после операции	Начинается в первые часы после операции	Встречаются реже	Через 1-3 месяца после операции
Консервированный	На 5-7 сутки после операции	На 2-3 недели после операции	Встречаются чаще	Через 2-8 месяцев после операции

Механизмы терапевтического действия АМ.

1. Эффект биологической повязки. A.Sorsby (1947) впервые использовал АМ как биологическую повязку в лечении щелочных ожогов глаз. Y.Hao (2000) продемонстрировал наличие мРНК в антиангиогенном и противовоспалительном факторах АМ. Он обосновал, необходимость применения АМ, ориентированной эпителиальной поверхностью к поврежденной поверхности глаза для достижения наивысшей концентрации вышеуказанных факторов в зоне повреждения. При данной методике для использования больше подходит свежая АМ, чем консервированная. Применение АМ в качестве биоповязки для покрытия зоны повреждения или воспаления выявило не только ее благотворное влияние на процессы заживления, но и значительный анальгезирующий эффект.

2. Активация эпителизации. S.Lee и S.Tseng в эксперименте доказали, что базальная мембрана амниона является субстратом, облегчающим миграцию эпителиальных клеток, усиливающим их адгезию. Также она стимулирует дифференцировку клеток, что способствует ускорению процесса эпителизации. Особо следует отметить, что морфология выросших на амнионе эпителиальных клеток идентична нормальным клеткам роговицы или конъюнктивы (в зависимости от зоны трансплантации). S.Tseng и P.Prabhasawat (1997) продемонстрировали увеличение количества бокаловидных клеток в зоне трансплантата при использовании амниона для пластики конъюнктивальных сводов (13). N.Koizumi и J.Shimazaki (2000) на основании данных своих исследований полагают, что эффект активации эпителизации во многом определяется наличием факторов роста в АМ (9).

3. Супрессия воспаления и рубцевания. В настоящее время угнетение процесса рубцевания при трансплантации АМ объясняют блокированием механизма превращения фибробластов в миофибробласты. Противовоспалительный эффект связывают с тем, что АМ предотвращает инфильтрацию подлежащих тканей полиморфноядерными лейкоцитами, а также с наличием в стромальном матриксе АМ цитокинов-ингибиторов воспаления и тканевых ингибиторов металлопротеаз (4).

4. Ингибция ангиогенеза. Y.Hao et al (2000) установили, что в эпителиальных и мезенхимальных клетках АМ содержатся мощные антиангиогенные факторы: эндостатин, тромбоспондин-1, тканевые ингибиторы металлопротеаз (TIMP-1,-2,-3,-4). Кроме того, АМ образует физический барьер, препятствующий проникновению воспалительных медиаторов и активаторов ангиогенеза в патологический очаг.

5. Антимикробный эффект. АМ обладает антимикробным эффектом против ряда микроорганизмов, что обеспечивается формированием физического барьера за счет наличия базальной мембраны, а также присутствием в АМ лизоцима, АИФ-?, трансферрина, 7S-иммуноглобулина, лактоферрина, специфических антител (появляющихся в 3 триместре беременности). Прогестерон, как известно, также обладает бактериостатическим эффектом против стафилококков и других грамположительных микроорганизмов.

6. Субстрат для выращивания стволовых и эпителиальных клеток. Амниотическая базальная мембрана успешно используется как субстрат для культивирования стволовых лимбальных клеток, взятых при помощи биопсии контралатерального глаза, что позволяет добиваться эпителизации поверхности даже в случаях выраженной лимбальной недостаточности (9).

Консервация амниотической мембраны

В настоящее время известно более 10 методов консервации АМ. К ним предъявляются следующие требования: обеспечение должного уровня сохранности

материала и, соответственно, реализация ожидаемого терапевтического эффекта; безопасность применения АМ (отсутствие микробного обсеменения). Наиболее распространены следующие методы: сохранение в растворах антибиотиков, высушивание, замораживание при $t -70^{\circ}\text{C}$, консервация в глицерине, диметилсульфоксиде, стерилизация γ -излучением. Несмотря на определенные различия в методах, общими для них являются требования, предъявляемые к донорскому материалу. Донорами АМ могут являться женщины, имеющие отрицательные результаты серологических тестов на ВИЧ, гепатиты В и С, сифилис. Забор материала производится в стерильных условиях операционной после родоразрешения путем кесарева сечения и при отсутствии визуальных признаков инфицирования околоплодных вод и оболочек. Наиболее часто используется метод, разработанный J.Kim и S.Tseng (1997) (8). Плацента очищается от кровяных сгустков, несколько раз промывается в стерильном физиологическом растворе, затем в растворе антибиотиков, содержащем 100 мг/мл неомидина, 50 мг/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина и 2,5 мг/мл амфотерицина В. Затем АМ отделяется от подлежащего хориона тупым способом, укладывается на нитроцеллюлозную бумагу эпителием/базальной мембраной кверху. Бумагу с наклеенной АМ разрезают на диски удобного размера и хранят в растворе, содержащем по 50% глицерина и среды Игла при $t -70^{\circ}\text{C}$. Сохраненная по данной методике АМ может использоваться в течение 2 лет.

При консервации в растворе 98% глицерина и хранении при $t + 4^{\circ}\text{C}$ срок использования материала составляет 1 год. Причем, P.Cameron et al (1999) показали, что глицерин обладает противовирусной активностью: вирус гепатита В полностью инактивируется в течении 5 дней при хранении образца инфицированной кожи в 98% глицерине. Кроме того, по своим терапевтическим эффектам консервированная таким способом АМ приближается к «свежей».

W.Gannaway (1984) доказал, что так называемая «свежая» АМ, консервированная в растворе антибиотиков, может безопасно применяться в течении 48 часов, когда микробная контаминация материала исключена (6). F. von Versen-Нцунк (2004) исследовал сохранность АМ при различных способах консервации: замораживание при $t -70^{\circ}\text{C}$, консервация в глицерине, γ -облучении, лиофилизации и других. Изучалась толщина АМ, сохранность эпителия и коллагена. Было доказано, что наибольшие повреждения эпителия и соединительнотканного матрикса происходят при γ -облучении. Целостность базальной мембраны сохраняется во всех образцах. Лучшая сохранность морфологии эпителия выявлена при замораживании при $t -70^{\circ}\text{C}$ и консервации в глицерине. Толщина АМ составляла 20-30 μm при лиофилизации, тогда как при консервации в глицерине 45-50 μm (14).

Клиническое применение АМ

Для более полного представления о возможностях применения АМ в офтальмохирургии необходимо остановиться на некоторых анатомических и патофизиологических особенностях эпителиального покрова глаза.

Поверхность переднего отрезка глаза покрыта эпителием 2 видов: роговичным, зона распространения которого ограничена лимбом, и конъюнктивальным. Как известно, лимб представляет собой уникальную зону, содержащую стволовые клетки, способные дифференцироваться в клетки роговичного эпителия. Стволовые конъюнктивальные клетки в основном содержатся в области сводов, там же находится наибольшее количество бокаловидных клеток, которые являются своеобразными

маркерами функционального состояния конъюнктивы. Поверхность глаза, как интегративная структура, обеспечивает следующие функции: поддержание прозрачности роговицы и постоянства преломляющей способности ее передней поверхности, служит первым противомикробным барьером, обеспечивает зрительный комфорт в нормальных физиологических условиях. Функциональная недостаточность поверхности глаза связана с дисфункцией эпителиального покрова разной степени выраженности, которая морфологически проявляется метаплазией клеток.

Выделяют 2 синдрома: сквамозная эпителиальная метаплазия и конъюнктивальная метаплазия роговицы, или лимбальная недостаточность. Первый тип, характеризующийся патологической трансформацией неороговевающего конъюнктивального эпителия в ороговевающий, сопровождается уменьшением количества бокаловидных клеток и, соответственно, уменьшением количества секретируемых поверхностных мукополисахаридов, что приводит к постепенной кератинизации эпителия. Причины разнообразны: генетическая предрасположенность, дефицит витамина А, ожоги глаз, синдром Стивенса-Джонсона, рубцовый пемфигус, тяжелые хронические кератоконъюнктивиты и т.д. Вторым синдромом ? лимбальная недостаточность ? был описан S.Tseng в 1995 году. Он включает в себя следующие признаки: хроническое воспаление, помутнение роговицы различной степени выраженности, неоваскуляризация, хронические или рецидивирующие язвы роговицы и патогномичный симптом – наличие конъюнктивального паннуса. Данное состояние в литературе обозначают также как конъюнктивализация роговицы. Патогенез синдрома обусловлен дефицитом стволовых лимбальных клеток и постепенным заселением роговицы конъюнктивальным эпителием. Обнаружение даже единичных бокаловидных клеток на поверхности роговицы является несомненным фактом, подтверждающим лимбальную недостаточность. Для диагностики субклинических и начальных клинических стадий применяют метод цитологического исследования, называемый в англоязычной литературе *impression cytology* и являющийся более информативной и достоверной разновидностью мазка-отпечатка. Выделяют 2 типа синдрома лимбальной недостаточности. Первый включает патологические состояния, обусловленные прямым разрушением клеток лимба. Это химические и термические ожоги, синдром Стивенса-Джонсона, пемфигоид, острая тяжелая микробная инфекция, длительное бесконтрольное ношение контактных линз, ятрогенные повреждения лимба при повторных синустрабекулоэктомиях, криотерапии. Вторым типом данного синдрома не связан с травматическим повреждением и протекает по типу медленно прогрессирующего заболевания: нейротрофический кератит, эндокринная офтальмопатия, хронический кератит и лимбит, птериgium, псевдоптериgium.

Таким образом, при выборе наиболее адекватного метода лечения необходимо учитывать следующие факторы: изменение морфологии эпителия, частичное или полное исчезновение стволовых клеток, деструктивные и воспалительные изменения подлежащих структур (базальная мембрана и строма роговицы, тенонова оболочка), а также сопутствующие заболевания слезных органов, мейбомиевых желез, расстройства иннервации, деформацию век. Доказано, что трансплантация амниотической мембраны является эффективным способом лечения патологических состояний, сопровождающихся сквамозной метаплазией конъюнктивы и начальных проявлениях синдрома лимбальной недостаточности. Однако, пересадка АМ не может компенсировать лимбальную недостаточность при вовлечении в патологический

процесс более 1/2 окружности лимба. В этих случаях высоко эффективными зарекомендовали себя два метода: трансплантация лимбального ауто/аллографта в комбинации с пересадкой амниотической мембраны и трансплантация базальной амниотической мембраны с культивированными на ней стволовыми клетками.

Результаты применения амниотической мембраны при различных заболеваниях

Ожоги глаз остаются актуальной проблемой современной офтальмологии.

Покрытие роговицы АМ в остром периоде ожога оказывает значительный анальгезирующий эффект, снижает выраженность воспалительного процесса, позволяет достичь быстрой эпителизации ожогового дефекта и снизить степень неоваскуляризации роговицы, что устраняет необходимость в последующих кератопластических операциях (при высокой остроте зрения), либо, при необходимости, дает возможность выполнить их в более благоприятных условиях (2, 4, 12).

Лечение заболеваний глаз, сопровождающихся резким истончением стромы роговицы либо ее перфорацией связано с немалыми трудностями. В настоящее время применяются следующие методы: кератопластика, ношение бандажной контактной линзы, пломбирование биоклеями, покрытие аутоконъюнктивой, трансплантация АМ. Каждый из перечисленных методов имеет как преимущества, так и недостатки, что стимулирует офтальмологов к поиску наиболее оптимальных решений в каждом конкретном случае. F.Kruse (1999) предложил метод многослойной трансплантации АМ при лечении хронических язв роговицы, нейротрофических и герпетических кератитов. M.Rodriguez-Ares (2004) доказал, что трансплантация АМ при лечении нейротрофических и аутоиммунных язв роговицы, протекающих с перфорацией до 1,5 мм, дает уникальную возможность избежать кератопластики, сопряженной с высоким риском отторжения трансплантата (10). K.Hanada (2001) на основании данных своих исследований сделал вывод, что применение трансплантации АМ эффективно при лечении кератитов и глубоких язв роговицы, однако, при сочетании с выраженной лимбальной недостаточностью либо при аутоиммунном характере процесса для достижения положительного результата требуется одновременная пересадка стволовых лимбальных клеток (7).

Буллезная кератопатия, развивающаяся как осложнение хирургии катаракты, причиняет пациентам немало страданий. К сожалению, выполнение кератопластики не всегда возможно и обоснованно, учитывая общее состояние больного, часто сомнительный прогноз по зрению, а также относительно высокий риск повторного развития кератопатии. В случаях, когда с помощью консервативного лечения невозможно достичь желаемого эффекта, оптимальные результаты дает применение метода покрытия роговицы АМ. По данным разных авторов уже на 1-2 сутки после операции наблюдается значительное уменьшение боли, светобоязни, слезотечения. Постепенно повышается острота зрения за счет уменьшения отека роговицы и количества булл. Период ремиссии продолжается 8-12 месяцев до момента рассасывания трансплантата, после чего, при необходимости, возможно проведение повторной операции (4).

Хорошие результаты получены при использовании АМ в качестве пластического материала для реконструктивных операций на конъюнктиве. Показаниями к таким вмешательствам являются: симблефарон, птериgium и псевдоптериgium, рубцовый пемфигус, синдром Стивенса-Джонсона, сокращение конъюнктивальной полости, затрудняющее ношение косметического протеза при анофтальмическом синдроме,

восстановление конъюнктивальных сводов после удаления неоплазм конъюнктивы (3, 4, 11). Трансплантация АМ способствует быстрой эпителизации поверхности, причем, в отличие от широко применяемого способа пластики аутослизистой ротовой полости, сохраняется нормальная морфология конъюнктивального эпителия. По данным A.Solomon (2003) при пластике конъюнктивальных сводов с использованием АМ достигается хороший косметический и функциональный эффект (11). D.Ma et al. (2000) сравнили частоту рецидивов после устранения птеригиума в 2 группах: в первой производилась пересадка АМ после иссечения птеригиума, во второй для пластики использовали аутоконъюнктиву. Было доказано, что частота рецидивов одинакова, а следовательно, применение АМ ввиду меньшей травматичности в данном случае является предпочтительным.

Относительно недавно появились сообщения о применении АМ в хирургии глаукомы, для уменьшения корнеальной туманности после эксимерлазерных операций.

В заключение хотелось бы отметить, что применение амниотической оболочки в офтальмохирургии, безусловно, не является панацеей, а лишь альтернативой уже известным методам, имеющей свои преимущества: низкая иммуногенность и отсутствие реакций отторжения; значительное ускорение эпителизации, угнетение ангиогенеза, фиброза и воспаления; восстановление морфологии эпителиального покрова; возможность длительного хранения материала и использования по экстренным показаниям; нет необходимости в дополнительных затратах средств и времени на проведение серологических исследований доноров (роженицы уже обследованы на ВИЧ, сифилис, гепатит В и С). Необходимы дальнейшие исследования, которые помогут более точно выяснить возможности данного метода и определить показания к его применению.

1. Батманов Ю. Е., Егорова К. С., Колесникова Л. Н. Применение свежего амниона в лечении заболеваний роговицы. // Вестн. Офтальмол. – 1990 - № 5. – С. 17 – 19.

2. Новицкий И. Я. Место трансплантации амниотической оболочки в лечении заболеваний роговицы, сопровождающихся ее неоваскуляризацией // Вестн. Офтальмол. – 2003. - № 6. – С. 9 – 11.

3. Каспаров А.А., Труфанов С.В. Использование консервированной амниотической мембраны для реконструкции поверхности переднего отрезка глаза // Вестн. Офтальмол. – 2003. - № 3. – С. 45 - 47.

4. Dua H.S, Gomes G., King A. The amniotic membrane in ophthalmology // Surv. Ophthalmol. – 2004. – Vol. 49(1). – P. 51 -77.

5. Fukuda K., Chikama T., Nakamura M. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva // Cornea. – 1999. – Vol. 18, P.73-79.

6. Gannaway W., Barry A., Trefold J. // Preparation of amniotic membranes for surgical use with antibiotic solutions // Surgery. – 1984. – Vol. 95 (5). – P. 580 – 584.

7. Hanada K., Shimazaki J., Shimmura S., Tsubota K. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. // Am. J. Ophthalmol. – 2001. – Vol. 131(3). – P. 324 - 330.

8. Kim J.C., Tseng S.C.G. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas // Cornea. – 1995 – Vol. 14, P. 473-484.

9. Koizumi N., Inatomi T., Suzuki T. Cultivated epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. // *Ophthalmology* – 2001. – Vol. 108 (9). – P.1569-1574.
10. Rodriguez-Ares M., Tourino R., Lopes-Valladares M., Gude F. Multilayered amniotic membrane transplantation in the treatment of corneal perforations // *Cornea*. – 2004. – Vol. 3 (6). – P. 577 – 583.
11. Solomon A., Espana E., Tseng S. Amniotic membrane transplantation for reconstruction of the conjunctival fornices. // *Ophthalmology* – 2003. – Vol. 110 (1). – P. 93 – 100.
12. Sridar M., Bansal A., Sangwan V., Rao G. Amniotic membrane transplantation in acute chemical and thermal injury // *Am. J. Ophthalmol.* – 2000. – Vol. 130 (1). – P.134 – 137.
13. Tseng S., Prabhasawat P., Lee S. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction // *Am. J. Ophthalmol.* – 1997. – Vol. 124, P. 765 – 774.
14. Von Versen-Hoyneck F., Hesselbarth U., Moller D.. Application of sterilised human amnion for reconstruction of the ocular surface // *Cell and Tissue Banking*. – 2004. – V5, P. 57 – 65.