

УДК 617.713–002.9–089.843:618.446–092.9

Влияние биологического покрытия роговицы жизнеспособной криоконсервированной амниотической мембраной на особенности течения моделированного бактериального кератита

Г. И. Дрожжина¹, Е. В. Середя¹, Т. Б. Гайдамака¹, В. В. Вит¹, В. А. Шаблий², Г. С. Лобынцева²

¹ ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им.

В. П. Филатова НАМН Украины»; Одесса (Украина)

² Институт клеточной терапии; Киев (Украина)

E-mail: cornea@te.net.ua

Вступ. Актуальність роботи визначається недостатнім вивченням особливостей протизапальної дії амніотичної мембрани при лікуванні бактеріальних кератитів.

Мета дослідження: вивчити в експерименті вплив біологічного покриття рогівки амніотичною мембраною, криоконсервованою за новою технологією, на особливості перебігу модельованого бактеріального кератиту.

Матеріал та методи. Трансплантація амніотичної мембрани, криоконсервованої за новою технологією, проведена у 30 кроликів породи шиншила (30 очей), масою 2,5–3,0 кг, на розробленій моделі бактеріального кератиту середнього ступеня тяжкості.

Використовували техніку біологічного покриття з епісклеральною фіксацією амніона через кон'юнктиву вузлуватими швами нейлон 8/00. Повіки тварин шивали двома П-подібними швами, залишаючи в медіальному куті щілину для огляду. Термін спостереження склав 1 місяць. Групу контролю склали 10 кроликів з модельованим бактеріальним кератитом, які отримували традиційну консервативну терапію.

Результати дослідження. Через 1 місяць після ТАМ у всіх тварин амніотична мембрана була відсутня, а поверхня рогівки епітелізована. Характерним було формування неінтенсивного помутніння з явищами залишкової інфільтрації у 3 кроликів (3 ока). Васкуляризація у всіх тварин була відсутня.

На гістологічних препаратах відзначалась повна епітелізація з відновленням строми рогівки. Набряк і лимфоцитарно-гістіоцитарна інфільтрація відсутні. Зберігались інвазіяції на рівні базальної мембрани (рогівкові пробки).

Висновок. На моделі бактеріального кератиту встановлено, що трансплантація АМ, криоконсервованої за розробленою технологією, у вигляді біологічного покриття, стимулює епітелізацію, сприяє усуненню набряку та ознак запальної реакції рогівки.

Ключевые слова: бактеріальний кератит, амніотическая криоконсервированная мембрана, експеримент

Ключові слова: бактеріальний кератит, амніотична криоконсервована мембрана, експеримент

Influence of the corneal biological covering with cryoconserved amniotic membrane on the peculiarities of the course of modeled bacterial keratitis

G. I. Drozhzhina¹, E. V. Sereda¹, T. B. Gaidamaka¹, V. V. Vit¹, V. A. Shablii², G. S. Lobyntseva²

¹ SI «Filatov's Institute of eye diseases and tissue therapy of NAMN of Ukraine», Odessa, Ukraine

² The Institute of Cellular Therapy, Kiev, Ukraine

Introduction. The study is important due to insufficient investigation of peculiarities of anti-inflammatory effect of the amniotic membrane in treatment of bacterial keratitis.

Objective. To investigate in experiment the influence of the corneal biological covering with the amniotic membrane cryoconserved by a new technology on the peculiarities of the course of modeled bacterial keratitis.

Material and methods. Transplantation of the amniotic membrane cryoconserved by the new technology was performed in 30 Chinchilla rabbits (30 eyes) weighing 2.5–3.0 kg on the developed model of bacterial keratitis of the moderate degree of severity.

Results. In one month all animals showed absence of the amniotic membrane and the corneal surface was epithelized. It was characterized by formation of noninvasive keratoleucoma with residual infiltration in 3 rabbits (3 eyes). There was no vascularization in all animals. The histological samples showed complete epithelization with restoratopn of the corneal stroma. Edema and lymphocyte-histocytic infiltration were absent. There were preserved invaginations at the level of basal membrane (corneal plug).

Conclusion. It was established on the model of bacterial keratitis that amniotic membrane transplantation, cryoconserved by the developed technology stimulated epithelization being a biological covering and contributes to elimination of edema and signs of inflammatory reaction of the cornea.

Key words. Bacterial keratitis, amniotic cryoconserved membrane, experiment

Введение. Тяжелые воспалительные заболевания роговицы, травмы и ожоги глаза приводят к развитию язв и перфораций роговицы, заканчиваются формированием бельма, грубых рубцовых изменений роговицы и конъюнктивы и существенным снижением зрения. Бактериальный кератит продолжает представлять угрозу для зрения, несмотря на развитие новых мощных антибактериальных средств. Даже при интенсивном лечении антибиотиками, повреждение роговицы может происходить в результате кератолитических и воспалительных процессов, вызванных инфекцией или вследствие рубцевания и неоваскуляризации, связанных с процессом репарации [16, 18].

Для хирургического лечения тяжелой воспалительной патологии роговицы в офтальмологии традиционно используют местные ткани глаза (конъюнктиву, склеру), донорскую роговицу и другие материалы. В связи с огромным дефицитом донорских тканей для трансплантации и, в частности, роговицы идет постоянный поиск альтернативных материалов, в том числе биологических тканей организма, которые можно использовать с лечебной и оптической целью. К числу таких тканей относится амниотическая мембрана (АМ) человека, которая сегодня, благодаря своим уникальным свойствам, заняла прочное место в реконструктивной хирургии глазной поверхности [4, 5, 6, 12, 22]. Так, в 2008 году только в Германии было выполнено 2308 трансплантаций амниотической мембраны (ТАМ) [17].

В многочисленных зарубежных экспериментальных и клинических исследованиях доказана эффективность трансплантации амниотической мембраны (ТАМ) при различных воспалительных, дистрофических и дегенеративных заболеваниях роговицы [8, 11, 19, 20, 21, 24]. Однако эффективность ТАМ при бактериальных кератитах остается наименее изученной [7, 10, 13]. АМ человека обладает антибактериальными [14, 23] антиангио-

генными, противовоспалительными [9] и антифибробластными свойствами [26]. Благодаря таким свойствам АМ человека может играть важную роль в лечении инфекционного кератита.

Согласно клиническому протоколу № 117 от 15.03.2007 «Об утверждении протоколов предоставления медпомощи по специальности «Офтальмология», в Украине ТАМ утверждена как хирургический метод лечения только при ожогах глаз. Однако в настоящее время производителя, изготавливающего амниотическую мембрану для офтальмологии, в Украине нет. Учитывая огромный дефицит донорского материала для пересадки роговицы в Украине, а также наличие значительного количества пациентов, нуждающихся в кератопластике с лечебной целью (более 1\3 пациентов, которым показана кератопластика), наличие отечественного препарата амниотической мембраны явится альтернативным материалом для лечебной кератопластики и позволит существенно повысить качество хирургической помощи больным с патологией роговицы.

В настоящее время в офтальмологии применяется как нативная, так и консервированная АМ. Однако нативная АМ обладает рядом недостатков: короткие сроки хранения, невозможность проведения микробиологического исследования. Известно более 10 методов консервации АМ. Наиболее распространены следующие: сохранение в растворах антибиотиков, высушивание над силикогелем, замораживание при -70°C и -196°C , консервация в глицерине, диметилсульфоксиде (ДМСО), стерилизация гамма-излучением и др. [1, 12, 15, 25]. Нужно отметить, что единого мнения относительно предпочтительного метода консервации АМ не существует.

В связи с этим, проведение исследований по изучению свойств и возможности использования в офтальмологии криоконсервированной АМ с жизнеспособными стромально-эпителиальными

клетками представляет большой научный и практический интерес. Криоконсервирование АМ с 5 % ДМСО, обеспечивающим сохранность жизнедеятельности клеток АМ, может способствовать повышению эффективности данной методики [2]. Сущность метода заключается в криоконсервации АМ при -196°C под защитой 5 % ДМСО по четырехэтапной программе медленного замораживания с контролируемым кристаллообразованием. Данная технология криоконсервации предусматривает сохранность жизнедеятельности клеток АМ после ее размораживания, что сводит потерю свойств АМ к минимуму. Критерием жизнедеятельности служила способность клеток к пролиферации при культивировании.

Цель работы: изучить влияние биологического покрытия роговицы амниотической мембраной, криоконсервированной по новой технологии, на особенности течения моделированного бактериального кератита.

Материал и методы

Экспериментальное исследование проводилось на 30 глазах 30 кроликов породы Шиншилла массой 2,5–3,0 кг, которых содержали при комнатной температуре на обычном лабораторном рационе. Оперативные вмешательства выполняли на базе вивария ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины» в условиях асептики и антисептики. Эксперимент проводили с выполнением этических норм, предусмотренных международными принципами Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и в других научных целях» (Страсбург, 1986) и норм биомедицинской этики, одобренных первым национальным конгрессом Украины по биоэтике (2001 г.), а также закона Украины № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Київ, 2006).

Моделирование бактериального кератита. Моделирование бактериального кератита средней степени тяжести проводили по предложенному нами способу [3]. Под внутривенным тиопенталовым наркозом (в разведении с 10 мл физ. раствора из расчета 1 мл/кг массы тела животного) и местной анестезией (инстилляцией в конъюнктивальную полость 0,5 % Sol. Alcaini) всем экспериментальным животным в оптической зоне выполняли послойную трепанацию роговицы трепаном диаметром 6,0 мм до 2/3 толщины стромы. Далее проводили инфицирование роговицы путем двукратной инстилляцией в конъюнктивальную полость 1 мл бактериальной суспензии патогенного штамма *Staphylococcus aureus* (10^9 клеток/мл), выделенного от больного. В конце оперативного вмешательства выполнялась субконъюнктивальная инъекция 0,2 мл дипреспана. В течение следующих 14 дней проводили ежедневные трехкратные инстилляцией 0,1 % раствора дексаметазона. Через 24 часа после инфицирования бактериальной культурой у всех экспериментальных животных диагностировали бактериальный кератит средней степени тяжести. Наблюдали обильное слизисто-гнойное отделяемое из конъюнктивальной полости, язву роговицы $d=5,0-6,0$ мм, окрашивающуюся флуоресцеином, выраженный отек с интенсивной инфильтрацией в строме роговицы. На 14 сутки у 93,4 % кроликов (28

глаз) характерным было наличие дефекта роговицы 2,0–4,0 мм в диаметре, отек с явлениями очаговой инфильтрации в передних слоях стромы роговицы. Животных выводили из экспериментального исследования на 7, 14 и 30 сутки (по 10 животных на каждый срок) путем введения в ушную вену 1,0 см³ воздуха, с последующим забором роговой оболочки для морфологического исследования (окраска гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизон).

Трансплантация амниотической мембраны. Через 2 недели после моделирования бактериального кератита у 15 животных (15 глаз) проводили ТАМ. Для размораживания АМ криопробирку извлекали из сосуда Дюара с жидким азотом и погружали в водяную баню, нагретую до температуры $+38-+40^{\circ}\text{C}$. Использовали технику биологического покрытия с эписклеральной фиксацией амниона через конъюнктиву узловатыми швами нейлон 8/00. Веки животных сшивали двумя П-образными швами, оставляя в медиальном углу щель для осмотра. Срок наблюдения составил 1 месяц. Группу контроля составили 10 кроликов с моделированным бактериальным кератитом, получавших традиционную консервативную терапию.

Для определения жизнеспособности криоконсервированной амниотической мембраны проводили культивирование ее клеток.

Культивирование клеток амниотической мембраны. Криоконсервированную АМ размораживали в водяной бане при $+38-+40^{\circ}\text{C}$ до появления жидкой фазы, с последующим оттаиванием при комнатной температуре. К АМ в растворе криопротектора медленно, по каплям, добавляли раствор Хенкса в соотношении 1:10 с постоянным помешиванием. После этого АМ извлекали из раствора, который содержит ДМСО, и переносили в раствор Хенкса.

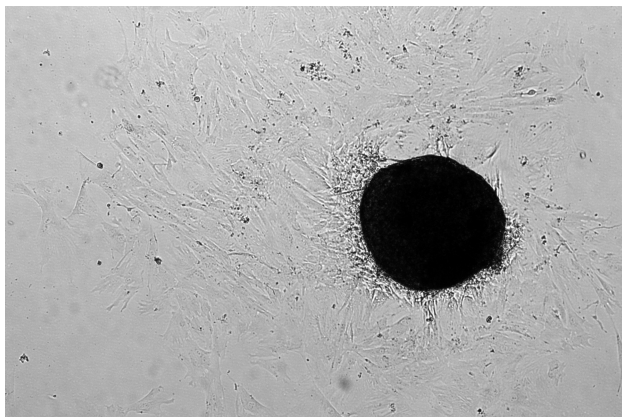
Амниотическую мембрану измельчали в растворе Хенкса ножницами до фрагментов 3×3 мм и погружали в ростовую среду альфа-МЕМ (HyClone), содержащую 10 % фетальной бычьей сыворотки (HyClone), 1% раствор аминокислот RPMI (Sigma), раствор стрептомицина 50 мкг/мл и пенициллина 100 ЕД/мл (Sigma). Культивирование проводили в условиях повышенной влажности, 5 % CO_2 при 37°C .

Результаты и их обсуждение

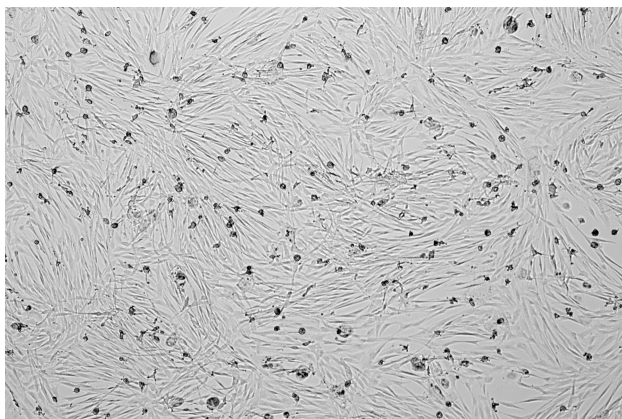
При культивировании эксплантов АМ на 14 сутки наблюдали формирование клонов адгезивных клеток различной морфологии с преобладанием полигональных и фибробластоподобных клеток. На 20 сутки клоны увеличивались и конфлюэнт клеток достигал 70–80 %. Таким образом, способность клеток криоконсервированной АМ к миграции на культуральную поверхность, а также к адгезии и пролиферации свидетельствует об их жизнеспособности (рис. 1а и 1б).

При проведении трансплантации отмечены хорошие эластические и прочностные свойства размороженной амниотической мембраны. Ни в одном случае не наблюдалось разрывов АМ либо осложнений во время трансплантации.

На 7-е сутки после ТАМ при раскрытии век наблюдали отсутствие конъюнктивального отделяемого, бледно-розовую конъюнктиву и сохранность АМ на поверхности роговицы у всех 10 кроликов (10 глаз), выводимых из эксперимента. У 8 кроли-



а



б

Рис. 1. Культура клеток криоконсервированной АМ на 14 (а) и 20 (б) сутки культивирования, световая микроскопия, $\times 50$.

ков (8 глаз) характерным было наличие выраженного отека в строме роговицы под АМ.

При микроскопическом исследовании во всех случаях выявляется незначительный отёк стромы роговой оболочки. В строме кератоциты распределены неравномерно. Местами отмечается фокальный мукоидный отёк коллагеновых стромальных пластин. Признаков воспалительной инфильтрации в центральных участках роговицы и вблизи лимба не определяется.

Уже на 7-е сутки отмечали полную эпителизацию раневой поверхности. Слой эпителия неравномерной толщины и состоит из 2–3 слоёв эпителиальных клеток, цитоплазма части которых отёчна. Нарушена дифференциация эпителиоцитов по слоям (рис. 2).

На 14 сутки после ТАМ отмечали бледно-розовую конъюнктиву и отсутствие отделяемого в конъюнктивальной полости. Выявлен частичный лизис АМ в оптической зоне роговицы с ее сохранностью в области лимба и швов у 5 кроликов (5 глаз). АМ отсутствовала у 2 кроликов (2 глаза) и у 3 кроликов (3 глаза) она располагалась в просвете глазной щели в виде тяжа. При этом во всех случаях

(10 кроликов (10 глаз) поверхность роговицы была эпителизирована и флуоресцеином не окрашивалась. Умеренно выраженный отёк в строме роговицы наблюдали у 6 кроликов (6 глаз).

Микроскопически, спустя две недели после операции, сохраняется фокальный отёк стромы роговой оболочки и мукоидный отёк её коллагеновых пластин. Поверхность роговой оболочки полностью эпителизирована. При этом местами сохраняется истончение эпителиального покрова. В других местах отмечается увеличение количества слоев клеток эпителия до 5–6. В этих местах отмечается их дифференциация по слоям и приближение эпителиального слоя к нормальной гистоархитектонике (рис. 3). Признаков воспалительной инфильтрации роговой оболочки не выявлено.

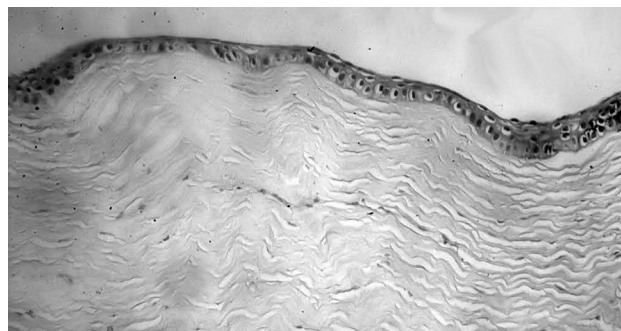


Рис. 2. Гистопрепарат роговой оболочки глаза на седьмые сутки после ТАМ. Эпителизация поверхности роговой оболочки. Эпителий истончен и складывается из 2–3 слоёв эпителиальных клеток. Неравномерное распределение кератоцитов в строме роговицы и фокальный отек коллагеновых пластин. Воспалительные изменения отсутствуют (окраска гематоксилин-эозин, $\times 40$)

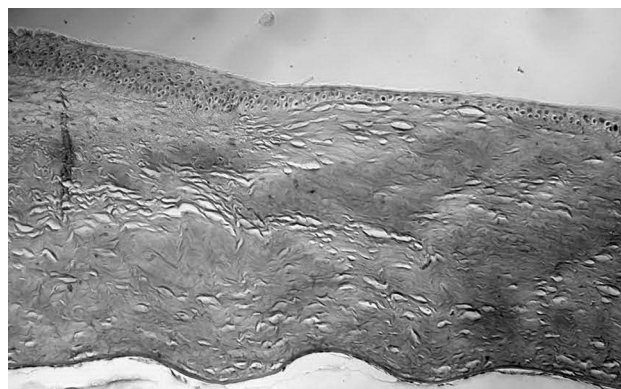


Рис. 3. Гистопрепарат роговой оболочки глаза на четырнадцатые сутки после ТАМ. Пролиферация эпителиоцитов, приводящая к увеличению количества слоёв эпителиальных клеток и частичной дифференциации их по слоям. Фокальный мукоидный отёк стромы роговицы. Воспалительные изменения отсутствуют (окраска пикрофуксином по Ван-Гизон, $\times 40$)

На 30-е сутки после ТАМ отмечали бледно-розовую конъюнктиву и отсутствие отделяемого в конъюнктивальной полости. У всех экспериментальных животных (10 глаз) амниотическая мембрана отсутствовала, поверхность роговицы была эпителизирована, флюоресцеином не окрашивалась. В некоторых случаях (3 глаза) наблюдали формирование неинтенсивного помутнения с явлениями остаточной инфильтрации. Васкуляризация роговицы у всех животных отсутствовала.

Спустя месяц после проведения оперативного вмешательства микроскопически отмечается полная дифференциация эпителиальных клеток по слоям, хотя местами наблюдается утолщение эпителия и незначительный его акантоз. Группы клеток, погружающихся в строму, несколько больших размеров, их цитоплазма интенсивно эозинофильная. Незначительное количество подобных клеток подверглось вакуольной дегенерации. Этот процесс сопровождается уменьшением или полным отсутствием отека стромы роговицы (рис. 4). Признаков воспалительной инфильтрации роговой оболочки иммунокомпетентными клетками не было обнаружено.

Заключение. Использование покрытия роговицы криоконсервированной амниотической мембраной эффективно в лечении экспериментального бактериального кератита. Об этом свидетельствует полная эпителизация поверхности роговицы экспериментальных животных на седьмые сутки по-

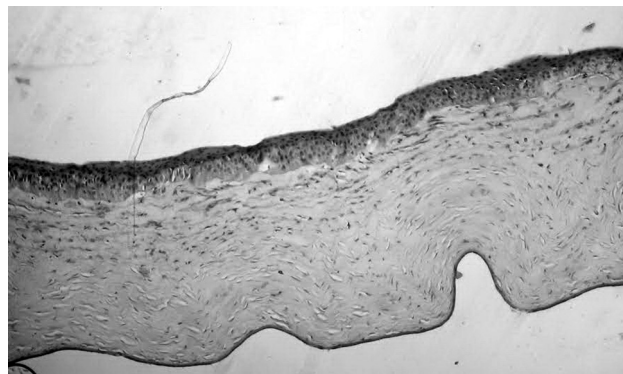


Рис. 4. Гистопрепарат роговой оболочки глаза на тридцатые сутки после ТАМ. Эпителизация роговой оболочки с дифференциацией клеток по слоям. Незначительный акантоз базальных слоёв эпителиоцитов с их вакуольной дегенерацией. Уменьшение степени отека стромы и восстановление численности кератоцитов. Воспалительные изменения отсутствуют (окраска гематоксилин-эозин, × 40)

сле операции с дифференциацией клеток по слоям, наступающей к 30 суткам. При этом на всех этапах наблюдения у большинства экспериментальных животных не выявляли клинических и морфологических признаков воспалительной инфильтрации. Полученный положительный эффект обусловлен бактериостатическими и противовоспалительными свойствами амниотической мембраны, а также сохранением жизнеспособности её клеток, способных к пролиферации.

Литература

1. Каспаров А. А. Использование консервированной амниотической мембраны для реконструкции поверхности переднего отрезка глаза / А. А. Каспаров, С. В. Труфанов // Вестн. офтальмол. — 2003. — № 3. — С. 45–47.
2. Патент Украины № 49759 «Спосіб здійснення роботи низькотемпературного банку біологічних об'єктів». — Опубл. Бюл. № 11. 15.11.2004. Г. С. Лобынцева и соавт.
3. Патент Украины № 87119 «Спосіб моделювання бактеріального кератиту середнього ступеня тяжкості». — Опубл. Бюл № 2. 27.01.2014. Г. И. Дрожжина, Е. В. Вансович, Т. Б. Гайдамака.
4. Труфанов С. В. Использование консервированной амниотической оболочки человека в реконструктивно-восстановительной хирургии глаза : автореф. дис.... канд. мед. наук : спец. 14.00.08 «Глазные болезни» / М., 2004. — 24 с.
5. Федорова Е. А. Применение лиофилизированной амниотической оболочки в лечении воспалительных заболеваний роговицы глаза : автореф. дис.... канд. мед. наук : спец. 14.00.08 «Глазные болезни» / М., 2004. — 24 с.
6. De Rotth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane / A. de Rotth // Arch. Ophthalmol. — 1940. — V.23. — P. 522–525.
7. Gicquel J. J., Bejjani R. A., Ellies P. et al. Amniotic membrane transplantation in severe bacterial keratitis // Cornea. — 2007. — V. 26. — P.27–33.
8. Gris O., Del Campo Z., Wolley-Dod C. et al. Amniotic membrane implantation as a therapeutic contact lens for the treatment of epithelial disorders // Cornea. — 2002. — V.21. — P.22–27.
9. Hao Y., Ma D. H., Hwang D. G. et al. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. // Cornea. — 2000. — V.19. — P.348–352.
10. Irina S. Barequet, Zohar Habot-Wilner, Nathan Keller et al. Effect of Amniotic Membrane Transplantation on the Healing of Bacterial Keratitis // IOVS. — 2007. — V.23. — P.124–130
11. Khokhar S., Natung T., Sony P. et al. Amniotic membrane transplantation in refractory neurotrophic corneal ulcers: a randomized, controlled clinical trial // Cornea. — 2005. — V.24. — P.654–660.
12. Kim J. C. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas / J. C. Kim, S. C. Tseng // Cornea. — 1995. — V.14. — P.473–484.
13. Kim J. S., Kim J. C., Hahn T. W., Park W. C. Amniotic membrane transplantation in infectious corneal ulcer // Cornea. — 2001. — V.20. — P.720–726.
14. Kjaergaard N., Hein M., Hyttel L. et al. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. — 2001. — V.94. — P.224–229.

15. **Kruse F. E.** Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers / F. E. Kruse, K. Rohrschneider, H. E. Volcker // *Ophthalmology*. — 1999. — V.106. — P.1504–1510.
16. **Leibowitz H. M.** Bacterial keratitis. Leibowitz H. M. eds. *Corneal Disorders: Clinical Diagnosis and Management*. 1984. — P.353. WB Saunders Philadelphia.
17. **Meller D.** Amniotic Membrane Transplantation in the Human Eye / D. Meller // *Dtsch. Arztebl. Int.* — 2011. — V.108. — № 14. — P.243–248.
18. **Nordlund M. L., Pepose J. S.** Corneal response to infection / Krachmer J. H., Mannis M. J., Holland E. J. eds. *Cornea, Fundamentals, Diagnosis and Management*. 2005. — P.95–114. Elsevier Mosby Philadelphia.
19. **Prabhasawat P., Tesavibul N., Komolsuradej W.** Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation // *Br. J. Ophthalmol.* — 2001. — V.85. — P.1455–1463.
20. **Seitz B.** Amniotic membrane transplantation. An indispensable therapy option for persistent corneal epithelial defects / B. Seitz // *Ophthalmologie*. — 2007. — V.104. — P.1075–1079.
21. **Solomon A.** Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocelles, and deep ulcers / A. Solomon, D. Meller, P. Prabhasawat, T. John, E. M. Espana, K. P. Steuhl, S. C. Tseng // *Ophthalmology*. — 2002. — V.109. — № 4. — P.694–703.
22. **Sorsby A.** Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye: (Burns of the second degree) / A. Sorsby, H. M. Symons // *Br. J. Ophthalmol.* — 1946. — V.30. — P. 337–345.
23. **Talmi W. P., Sigler L., Inge E.** et al. Antibacterial properties of human amniotic membranes // *Placenta*. — 1991. — V.12. — P.285–288.
24. **Thatte S.** Amniotic membrane transplantation: An option for ocular surface disorders / S. Thatte // *Oman. J. Ophthalmol.* — 2011. — V.4. — № 2. — P.67–72.
25. **Tseng S.** Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction / S. Tseng, P. Prabhasawat, S. Lee // *Am. J. Ophthalmol.* — 1997. — Vol. 124. — P.7650–774.
26. **Tseng S. C., Li D. Q., Ma X.** Suppression of transforming growth factor- β isoforms, TGF- β receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix // *J. Cell Physiol.* — 1999. — V.179. — P.325–335.

Посылана 17.11.2014

References

1. **Kasparov AA, Trufanov SV.** Using preserved amniotic membrane for reconstruction of anterior segment surface. *Vestn Oftalmol.* 2003;3:45–7. In Russian.
2. Patent of Ukraine № 49759 «Activity of bank for storing cryopreserved biological objects». *Bul.* № 11. 15.11.2004. Lobyntseva G. S. Et al.
3. Patent of Ukraine № 87119 «A method of modeling bacterial keratitis of moderate severity». *Bul* № 2. 27.01.2014. Drozhzhina GI, Vansovich EV, Gaidamaka TB.
4. **Trufanov SV.** Using preserved amniotic membrane in human reconstructive eye surgery: Author's thesis for Cand. Of Med. Science. 14.00.08 Eye Diseases. M., 2004. 24 p.
5. **Fedorova EA.** Application of lyophilized amniotic membrane in the treatment of inflammatory diseases of the cornea: Author's thesis for Cand. Of Med. Science. 14.00.08 Eye Diseases. M., 2004. 24 p.
6. **De Roth A.** Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch. Ophthalmol.* 1940;23:522–5.
7. **Gicquel JJ, Bejjani RA, Ellies P** et al. Amniotic membrane transplantation in severe bacterial keratitis. *Cornea.* 2007;26:27–33.
8. **Gris O, Del Campo Z, Wolley-Dod C** et al. Amniotic membrane implantation as a therapeutic contact lens for the treatment of epithelial disorders. *Cornea.* 2002;21:22–7.
9. **Hao Y, Ma DH, Hwang DG** et al. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea.* 2000;19:348–52.
10. **Irina S Barequet, Zohar Habot-Wilner, Nathan Keller** et al. Effect of Amniotic Membrane Transplantation on the Healing of Bacterial Keratitis. *IOVS.* 2007;23:124–30
11. **Khokhar S, Natung T, Sony P** et al. Amniotic membrane transplantation in refractory neurotrophic corneal ulcers: a randomized, controlled clinical trial. *Cornea.* 2005;24:654–60.
12. **Kim JC, Tseng SC.** Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea.* 1995;14:473–84.
13. **Kim JS, Kim JC, Hahn TW, Park WC.** Amniotic membrane transplantation in infectious corneal ulcer. *Cornea.* 2001;20:720–6.
14. **Kjaergaard N, Hein M, Hyttel L** et al. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001;94:224–9.
15. **Kruse FE, Rohrschneider K, Volcker HE.** Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology.* 1999;106:1504–10.
16. **Leibowitz HM.** Bacterial keratitis. Leibowitz HM eds. *Corneal Disorders: Clinical Diagnosis and Management*. 1984.353. WB Saunders Philadelphia.
17. **Meller D.** Amniotic Membrane Transplantation in the Human Eye. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2011;108(14):243–8.
18. **Nordlund ML, Pepose JS.** Corneal response to infection. Krachmer JH Mannis MJ Holland EJ eds. *Cornea, Fundamentals, Diagnosis and Management*. 2005;95–114. Elsevier Mosby Philadelphia.
19. **Prabhasawat P, Tesavibul N, Komolsuradej W.** Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. *Br. J. Ophthalmol.* 2001;85:1455–63.
20. **Seitz B.** Amniotic membrane transplantation. An indispensable therapy option for persistent corneal epithelial defects. *Ophthalmologie.* 2007;104:1075–9.
21. **Solomon A, Meller D, Prabhasawat P, John T, Espana EM, Steuhl KP, Tseng SC.** Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocelles, and deep ulcers. *Ophthalmology.* 2002;109(4):694–703.
22. **Sorsby A, Symons HM.** Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye: (Burns of the second degree). *Br. J. Ophthalmol.* 1946;30:337–45.

23. **Talmi WP, Sigler L, Inge E** et al. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta*. 1991;12:285–8.
24. **Thatte S**. Amniotic membrane transplantation: An option for ocular surface disorders. *Oman. J. Ophthalmol*. 2011;4(2):67–72.
25. **Tseng S, Prabhasawat P, Lee S**. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am. J. Ophthalmol*. 1997;124:765–74.
26. **Tseng SC, Li DQ, Ma X**. Suppression of transforming growth factor–beta isoforms, TGF–beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J. Cell Physiol*. 1999;179:325–35.