

АЛГОРИТМИ ЗА ТРАНСПЛАНТАЦИЯ НА АМНИОТИЧНА МЕМБРАНА – 7 ГОДИШНИ РЕЗУЛТАТИ

Манолова Я. Групчева Х

Катедра Очни болести и зрителни науки, Медицински университет – Варна

Amniotic membrane transplantation algorithms – outcomes within a period of 7 years

Manolova Y., Grupcheva H

Department of Ophthalmology and Visual Science, Medical University of Varna

Резюме

Трансплантацията на амниотична мембрана (АМТ) през последните години се превърна в една от най-често извършваните оперативни процедури при тежки, неподаващи се на медикаментозното лечение заболявания на предния очен сегмент. Познаването на оперативните техники е изключително важно с оглед постигането на добър постоперативен резултат.

Цел: Целта на настоящото проучване е да се направи обзор на трансплантациите на амниотична мембрана за периода от 2001 до 2016г. и да се създадат алгоритми за оперативно лечение с цел трайно възстановяване увредената предна очна повърхност.

Материали и методи: В проучването са включени 420 пациента, преминали и оперирани в СБОБАЛ за 7 годишен период. На всички пациенти е извършена трансплантация на криосъхранена АМ. Пациентите са разделени в седем групи по диагнози. В зависимост от тежестта на обективната симптоматика (големина и дълбочина на дефекта) и вида на заболяването е извършена трансплантация тип покритие и/или пълнител в един, два или повече слоя. Оценка на големината и дълбочината на дефекта е извършена по тристепенна скала (големина- 1- до 4mm, 2- 4-7mm, 3- >7mm от диаметъра на роговицата; дълбочина: 1 - < 20 %; 2 – 20-50 %; 3 - > 50 % от дебелината).

Резултати: При 74% от болните е извършена трансплантация тип покритие, а при 26% - техника тип пълнител. Доказана е сигнификантна разлика във вида на трансплантацията при отделните групи диагнози. Повлияване на големината на язвата се наблюдава при всички видове трансплантации, като значително намаляване на размера има при трансплантациите тип – покритие, тип-пълнител (еднослоен) и тип-пълнител (двуслоен) ($p < 0,001$). При 98% пациентите на които е извършена трансплантация тип покритие на 25тия постоперативен ден се наблюдава възстановяване на роговичния дефект под 2mm. Същият ефект (92%) се наблюдава и при пациентите с еднослойна комбинирана трансплантация. При многослоен тип пълнител положително повлиявяне се наблюдава при 71%. Повлияването на дълбочината на язвата показва резултати подобни на тези свързани с големината.

Заклучение: Амниотичната мембрана е доказано средство на избор при труднолечими, рецидивиращи и тежки патологични състояния, засягащи предния очен сегмент. Използването на подходящата оперативна техника в зависимост от вида на заболяването и тежестта на обективната симптоматика води до значително подобряване на постоперативния резултат.

Адрес за кореспонденция:

д-р Яна Манолова,
Медицински университет, СБОБАЛ,
Катедра по очни болести,
ул. Дойран 15, Варна 9002

For correspondance:

Dr. Yana Manolova,
Medical university, Department of ophthalmology,
15, Doyran Str.,
Varna 9002, Bulgaria

Abstract

The amniotic membrane transplantation (AMT) has become one of the most commonly performed operative procedures in severe, refractory diseases of the anterior ocular segment in recent years. Knowledge of surgical techniques is extremely essential in order to achieve good postoperative results.

Aim: The aim of the present study is to present an overview of amniotic membrane transplantations in the period from 2001 to 2016 and to develop algorithms for surgical treatment in order to permanently restore damaged anterior ocular surface.

Materials and Methods: The study enrolls 420 patients, hospitalized and operated in the Specialized Eye Hospital for a period of 7 years. All patients were transplanted a cryopreserved AM. The patients were divided in seven cohorts according to their diagnosis. Depending on the severity of the objective symptomatology (size and depth of the defect) and the type of the disease, an onlay and/or inlay technique of transplantation in single, dual or multi layers was used. Assessment of the size and depth of the defect was made using a three-stage scale (size - 1 to 4mm, 2- 4-7mm, 3-> 7mm diameter of the cornea, depth (1 - <20%; 2 - 20-50%; 3 -> 50% of the thickness of the cornea).

Results: 74% of patients received an onlay technique transplantation, and 26% - an inlay one. The result analyses show that there is a significant difference in the type of transplantation in the different groups of diagnoses. With all types of transplantations the size of the ulcer was influenced; a significant reduction in its size was observed in onlay type of transplantations, inlay ones (single layer) and inlay type (dual layer) ($p < 0.001$). On the 25th postoperative day in 98% of the patients who have received an onlay type of transplantation a recovery of corneal defects below 2mm was observed. The same effect (92%) was observed in patients with single-layer combined transplantation. With multi-type inlay transplantation positive influence was observed in 71%. The outcomes that show how much the depth of the ulcer was influenced are similar to the ones associated with size.

Conclusion: The amniotic membrane proved to be the tool of choice for refractory, recurrent and severe pathological conditions affecting the anterior segment. The use of appropriate surgical technik according to the type and severity of the objective symptomatology leads to a significant improvement in the post-operative result.

Увод

След откритието на амниотичната мембрана в началото на XX- ти век като тъкан за лечение на кожни рани интересът към предимствата ѝ и възможностите за лечение на други рани постепенно нарастна. От края на 1990 г. използването на АМ в реконструкцията на очната повърхност се увеличи бързо, както по отношение на обхвата, така и по отношение на обема на хирургията. Предимствата и недостатъците от приложение-

то на АМ вече са по-ясни, и се натрупаха повече литературни данни. Използването на АМ в хирургията на очната повърхност може да бъде разделено в две големи категории: АМ като временно покритие или постоянен трансплантат. Има известно припокриване на двете техники, но категориите са базирани на терапевтичните цели на лечението. Като временно покритие АМ се използва като "биологична превръзка" за покритие и защита на дефектния роговичен

или конюнктивален епител. По този начин тъканта под мембраната се лекува при минимално възпаление, минимално образуване на белези и потискане на ангиогенезата. При техниката постояннен трансплантат целта е новообразуваният епител да расте над АМ, а не под нея. След това АМ става част от субепителната тъкан. Основните клинични цели са подпомагане на епителизацията, намаляване на болката и възпалението на очната повърхност. Тези цели се постигат с помощта на различни хирургични процедури. (1) При техниката покритие след отстраняване на некротична тъкан и хлабавия епител от роговичния дефект, АМ се разстила върху цялата повърхност на роговицата, включително лимба и се зашива перилимбално, еписклерално с непрекъснат 10-0 найлон/8-0 викрилен шев като се внимава да не се допуска проникването на кръв или течност отдолу. АМ действа от една страна като терапевтична контактна леща и създава бариера срещу проникването на възпалителни клетки, протеини на слъзния филм, или други външни въздействия, а от друга осигурява биологичните фактори, потискащи възпалението и подпомагащи епителизацията. За разлика от техниката тип пълнител, където АМ остава перманентно, при тази техника АМ се отделя след около 5-10 дни от роговицата. Класическите индикации за трансплантацията тип покритие са от остри изгаряния до остър херпетичен кератит и остър стадий на Stevens-Johnson синдром. (2), (3), (4), (5), (1) При тези индикации се използват противовъзпалителните свойства на АМ, въпреки, че това трае по-кратко време. (6), (7) При техниката пълнител амниотичната мембрана замества липсващия стромален матрикс и осигурява базална мембрана за миграция и растеж на реципиентните епителни клетки върху АМ. (8), (1) АМ се поставя в язвата или в дефект на стромата с епитела нагоре като размерът трябва се съобрази с размера на дефекта след абразия на епитела 1-2mm извън дефекта, така че новият епител да мигрира върху раната. След това се

зашива към роговицата с 10.0 Nylon. Главните индикации за тази техника са персистиращи епителни дефекти, роговични улцерации, или покритие на дефекти след ексцизия на конюнктивални тумори. (9) В края на процедурата се поставя шев - за роговица - нерезорбируем 10-0 найлон, за еписклера / конюнктива - 8-0 викрил. Пълнителят може да бъде моно- или мултислой. Мултислой се използва при дълбоки дефекти - чрез нарязване на АМ на множество парчета или чрез повтарящи се нагъвания. Подреждането на слоевете не е важно с изключение на най-горния слой, който трябва да бъде поставен с епитела нагоре, за да позволи покритие от роговичните епителни клетки. Когато трябва да се запълват дълбоки дефекти, напр. роговични язви може да се използва комбинирана, мултислой техника. (10) Подреждането на слоевете не е важно с изключение на най-горния слой, който трябва да бъде поставен с епитела нагоре. Тази техника наречена още „сандвич“ е комбинация от описаните по-горе две техники и се използва главно при тежки заболявания на очната повърхност, като дълбоки и големи роговични язви или при хирургични ревизии. Главната цел на покритието е да протектира, а на пълнителя да осигури епителизацията. Този метод е един от най-желаните поради високия процент на успеваемост (65-80%) и ниската честота на рецидиви (приблизително 20-30%). (2), (8), (5) При техниката на Ханада слоевете, запълващи дефекта се подреждат така, че всеки надлежащ трансплантат да е с по-голям диаметър от предходния. (11)

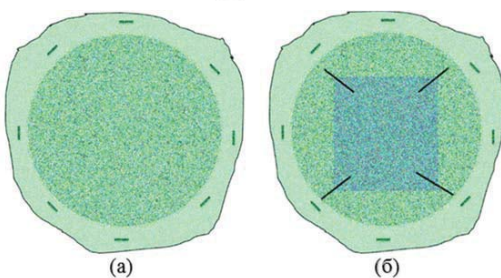
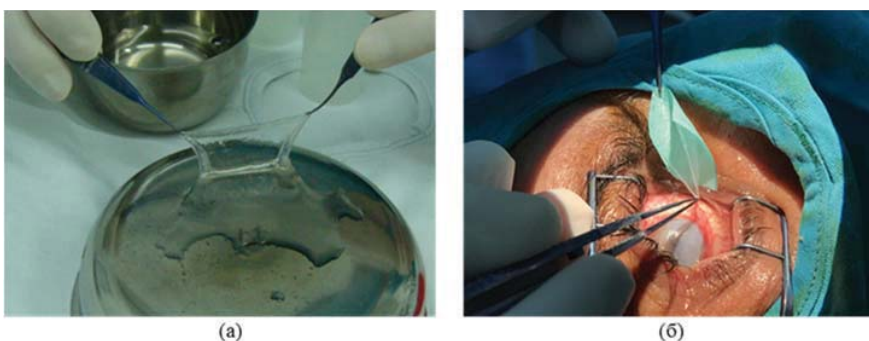
Материали и методи

На всички пациенти е извършена трансплантация на криосъхранена амниотична мембрана. В периода от 2010г. до 2013г. е използвана свободна АМ на тъканна банка Пирогов, от 2014г. до 2016г. - АМ фиксирана върху нитроцелулозна хартия на тъканна банка Биорегенерация и от 09.2016г.- АМ (АлоАМ) на Центъра за транспланционна медицина и клетъчна терапия към

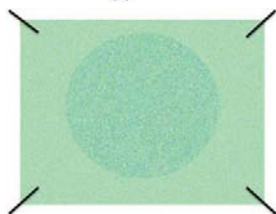
МУ-Варна. Пациентите са разделени в седем групи по диагнози. А) роговични, рецидивиращи и персистиращи дефекти (n = 66), Б) травми и изгаряния (n = 72), В) вирусни кератити (n = 51), Г) бактериални кератити (n = 30), Д) постоперативни кератити (n = 30), Е) невротрофични язви (n = 14) и Ж) други (некротизиращ скерит, симблефарон, след Tu на конюнктивата, Steven-Johnson, токсична епидермална некролиза) (n = 19). В зависимост от тежестта на обективната симптоматика (големина и дълбочина на дефекта) и вида на заболяването е извършена трансплантация тип покритие и/или пълнител в един, два или повече слоя. Оценката за големината и дълбочината на дефекта е извършена по тристепенна скала (големина- 1- до 4mm от диаметъра на роговицата, 2- от 4-7mm от диаметъра на роговицата, 3- >7mm; дълбочина (1 - <

20 %; 2 – 20-50 %; 3 - > 50 % от дебелината на роговицата). Спазени са основните принципи за съхранение и използване на АМ след доставка. Преди използването АМ се затопля 10 мин. на стайна температура. Извършва се предварителна подготовка на болния като подписва информирано съгласие за трансплантация на амнион. Основно е използвана топикална анестезия (Alcaine 0,5%), но при случаи с изразен болков синдром допълнително е добавена и субконюнктивална анестезия. На втори етап е извършвана подготовка на реципиентното ложе. Епитела на роговицата се почиства, полира се Баумановата мембрана и АМ се измива обилно от глицерина с физиологичен серум. Определя се епителната и стромалната страна, ако мембраната е в свободен вид. Ако е върху нитроцелулозна хартия АМ е поставена с епителната страна нагоре, а стромалната в контакт с хартията (фигура 1).

Фигура 1 (а) АМ в свободно състояние, епителната страна е лъскава и гладка, а стромалната страна е с груба, лепкава, гелоподобна консистенция. (б) АМ върху нитроцелулозна хартия- стромалната страна е в контакт с хартията.



Фигура 2 Графично представяне на техниките тип - покритие и тип - пълнител. (а) Перилимбална конюнктивоеписклерална фиксация с 8-0 викрилен шев (б) Поставяне на пълнителя (моно, дву или мултислой) в дефекта и зашиване с прекъснати шевове 10-0 найлон за роговицата. Перилимбална конюнктивоеписклерална фиксация на покритието с 8-0 викрилен непрекъснат шев.



Фигура 3 Графично представяне на техниката тип – покритие при изгаряне. Трансплантация на АМ 4/4 в зоната на роговицата, лимба и склерата в изгорения участък, адаптиране с четири прекъснати 8-0 викрилни шевове

Според дълбочината и вида на дефекта се извърши трансплантация тип-покрытие (фигура 1а), тип-пълнител (еднослоен, двуслоен, многослоен) (фигура 1б), тип-покрытие при изгаряне (фигура 2).

На всички пациенти след трансплантацията на амниотична мембрана се постави терапевтична контактна леща от силикон – хидрогелен материал.

Ако клинично се наблюдава забавено заздравяване на раните е препоръчително да се подменя ежеседмично АМ с нова такава докато раната се затвори. Ориентацията на АМ играе само второстепенна роля при тази хирургична процедура: в повечето случаи се счита за достатъчно хлабавото поставяне на АМ в еписклералното пространство или булбовата конюнктивата с помощта на 8-0 монофилamenti викрилни конци. На всички пациенти в зависимост от нозологичната единица е изписана постоперативната терапия, включваща лубриканти, антибиотици, кортикостероиди, нестероидни, други. Постоперативният възстановителен период включва прегледи съ-

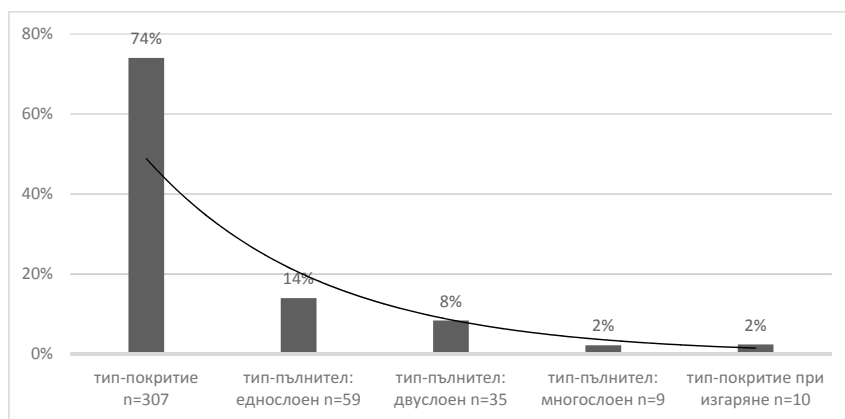
те се извърши между 1-3 седмица.

Резултати

За период от 7 години (2010-2016г.) в Очна болница – Варна са оперирани 420 пациента, като общия брой на извършени трансплантации е 660. Средната възраст на оперираните болни е 55, при минимална възраст 1г. и максимална - 95г. Анализът на броя извършени трансплантации показва, че преобладават пациентите, при които еднократна трансплантация е била достатъчна за овладяване на проблема (260 или 62% от пациентите). При останалите 38% се е наложило извършването на повторна и повече на брой трансплантации. При 74% от болните е извършена трансплантация тип-покрытие, а при 26% - техника тип-пълнител (еднослоен, двуслоен, многослоен) (фигура 4).

Резултатите от проведенния анализ показват разлика във вида на трансплантацията при отделните групи диагнози, като трансплантацията тип – покрытие се използва предимно при вирусни кератити, травми и изгаряния, дока-

Фигура 4
Разпределение според използваната техника



бразени с конкретния случай: предопертивно, на 8ми ден, на 25 ден, на 2 месец, на 6 месец. При пациенти с тежко увредена очна повърхност - ежеседмично проследяване в рамките на хоспитализацията. Отстраняването на конци-

то трансплантацията тип – пълнител (еднослоен или двуслоен) се прилага при роговични рецидивиращи и персистиращи дефекти. Трансплантациите тип-многослоен пълнител се прилагат предимно при бактериални кера-

тити, травми и изгаряния и невротрофични язви (таблица I). Трансплантацията на АМ, която се прилага при изгаряния се характеризира с определена специфика (фигура 3).

Таблица I. Честота на видовете трансплантации на АМ при отделните диагнози

	Вид трансплантационна техника				
	Тип - покритие	Тип – пълнител: еднослоен	Тип – пълнител: двуслоен	Тип – пълнител: многослоен	Тип – покритие при изгаряне
Роговични рецидивиращи и персистиращи дефекти	36/ 16%	15/ 37 %	14/ 54%	1/ 14 %	-
Травми и изгаряния	44/ 20%	8/ 19%	10/ 38%	2/ 29 %	8/ 100 %
Вирусни кератити	48/ 21%	3/ 7%	-	-	-
Бактериални кератити	22/ 10%	6/ 15 %	-	2/ 29 %	-
Постоперативни кератити	30/ 13%	-	-	-	-
Невротрофични язви	5/ 13 %	5/ 12%	2/ 2 %	2 / 2%	-
Други	15/ 7 %	4/ 10 %	-	-	-

Повлияване на големината на язвата се наблюдава при всички видове трансплантации, като значително намаляване на размера има при трансплантациите тип – покритие, тип-пълнител (еднослоен) и тип-пълнител (двуслоен) ($p < 0,001$). При 98% от пациентите на които е извършена трансплантация тип покритие на 25тия постоперативен ден

се наблюдава възстановяване на роговичния дефект – от пълна реепителизация до степен 1 от оценката за големина на роговичния дефект. Същият ефект (92%) се наблюдава и при пациентите с еднослойна комбинирана трансплантация. При многослоен тип - пълнител повлияването е в 71%, а при изгарянето е в 62% от случаите.

Повлияването на дълбочината на язвата показва резултати подобни на тези свързани с големината. Повлияването е значително поизразено ($p < 0,001$), като варира от 93,70 % при трансплантация тип-покрытие, до 57,70 % за тип-пълнител (двуслоен) на 25-ти ден от постоперативния период. При най-тежките форми с изходен дефект над 50% са 71% от случаите. При тях е извършена трансплантация тип пълнител многослоен. На 8мия ден 15% от пациентите са със под 50% дълбочина на дефекта, а на 25тия ден наблюдаваме повлияване на дълбочината между 20-50% в 68%. При пациентите с изгаряния едва на 25тия ден наблюдаваме повлияване на дефекта при 63% от случаите.

На тази база беше създаден следния „универсален алгоритъм“ за трансплантация на АМ:

1. Подбор на подходящ размер АМ.
2. Подготовка на очната повърхност.
3. Подготовка на АМ.
4. Определяне на хирургичния подход и ориентацията на АМ.
5. Извършване на техника покритие или пълнител в зависимост от дълбочината на дефекта.
6. Измиване на кръвните съсиреци под мембраната.
7. Поставяне на терапевтична контактна леща.

Дискусия

Хирургичните интервенции за лечение на предна очна повърхност се използват при неуспех от медикаментозното лечение. АМ може да се използва като единичен слой или многослоен трансплантат (пълнител/inlay) в зависимост от дълбочината на лезията, осигурявайки субстрат за синтеза на колаген, както и за адхеренция и миграция на епителните клетки към базалната мембрана. Пълнителят

може да се комбинира и с техника покритие, трансплантирано с епителната страна надолу, особено ако има значително възпаление на очната повърхност като стромалната повърхност на покритието подпомага „отмиването“ на възпалителните клетки и медиатори от очната повърхност. Процентът на успех от използването АМ при повърхностни епителни дефекти варира от 64% до 91%, според публикацията на Lee и Tseng от 1997г. (12), което е близко като резултат до нашите данни. До резултати сходни на нашите достига и Abraham Solomon и сътр., които в ретроспективно проучване от 2002 върху 33 очи с нетравматични роговични перфорации или десцеметоцеле. Придружаващите аутоимунни заболявания включвали ревматоиден артрит, Stevens-Johnson синдром, цикатрициален пемфигоид, SLE, също така и едно око с язва на Mooren, невроторфична и експозиционна кератопатия, постинфекциозна, невъзстановяваща се язва и постоперативно. При всички накрая е поставена АМ тип покритие и е адаптирана с 10-0 найлон прекъснат или непрекъснат шев. Авторите описват успех в 82,3% за период от 2-23 месеца проследяване - задълбочване на ПК, епителизация върху амниона и стабилност на роговичната дебелина. (11), (13), (14), (15), (16), (17)

АМТ възстановява перфорирани участъци на роговицата за продължителен период от време. При дълбоки роговични язви, десцеметоцеле, и малки роговични перфорации се използва мултислойната техника. Така Solomon и сътр. в ретроспективен анализ съобщават за стабилно затваряне на раните в подобни ситуации при 28-34 очи (82%). (18) Kruse и сътр. също постигат стабилизация на роговичната повърхност при 9-11 пациента с дълбока улцерация на роговицата, при проследяване за 12 месеца.(14) Множество са описаните до този момент техники на АМТ

при перфорация - Letko и сътр. (15), Lee и сътр.,(19) Duchesne и сътр., и Chan и сътр., (20), които запълват дефекта чрез навиване на парче амнион като руло и адаптиране с 10-0 Nylon. (21) През 2014г. Hiroyuki Namba и сътр. описват "Pleats fold" техника или техниката нагъване като плисета. (20) В ретроспективното проучване от 2016г на Junhua Fan и сътр. върху 46 очи с роговични перфорации $\leq 3\text{ mm}$ в диаметър,е описана технка, при която е постигната 100 % реконструкция на перфорацията при проследяване между 3-36 месеца. Описана е техника-пълнител като руло („roll in filling“) в комбинация с мултислойна АМ и 20% СЗФ8 mixed газ за предната камера. Проследяваните показатели : са дълбочината на предната камера, изтичането от перфорацията, времето на задържане на газовия мехур и морфологията на роговицата.

При дълбоки дефекти в нашето проучване успешно е използвана комбинирана техника тип пълнител и покритие, като най-често използвания метод е „сандвич“ техниката. Порядко е извършвана техниката с нагъната на плисета АМ. Смятаме, че успоредното поставяне на ламелите амнион към роговичната повърхност води до по-добра интеграция и възстановяване на засегнатия участък от една страна, а от друга по-дълготрайно стабилизиране на роговичната дебелина. Ние ясно демонстрираме, че приложението на АМ има положителен ефект върху процесите на зарастване на увредената очна повърхност и използването ѝ е необходимо за намаляване както на обективната, така и на субективната симптоматика. (22)

Заклучение

Амниотичната мембрана е доказана методика при труднолечими, рецидивиращи и тежки патологични състояния, засягащи предния

очен сегмент. Използването на подходящата оперативна техника в зависимост от вида на заболяването и тежестта на обективната симптоматика води до значително подобряване на постоперативния резултат. Всеки хирургически екип трябва да изработи собствен алгоритъм, който гарантира подбор, адекватна хирургическа техника и дългосрочно проследяване на трансплантираната очна повърхност.

Книгопис

1. Sippel KC, Ma JJ, Foster CS. Amniotic membrane surgery. *Curr Opin Ophthalmol*. 2001 Aug;12(4):269–81.

2. Fuchsluger T, Tuerkeli E, Westekemper H, Esser J, Steuhl K-P, Meller D. Rate of epithelialisation and re-operations in corneal ulcers treated with amniotic membrane transplantation combined with botulinum toxin-induced ptosis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Für Klin Exp Ophthalmol*. 2007 Jul;245(7):955–64.

3. Kheirkhah A, Johnson DA, Paranjpe DR, Raju VK, Casas V, Tseng SCG. Temporary sutureless amniotic membrane patch for acute alkaline burns. *Arch Ophthalmol Chic Ill* 1960. 2008 Aug;126(8):1059–66.

4. Meller D, Tseng SC. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 Apr;40(5):878–86.

5. Seitz B, Resch MD, Schlötzer-Schrehardt U, Hofmann-Rummelt C, Sauer R, Kruse FE. Histopathology and ultrastructure of human corneas after amniotic membrane transplantation. *Arch Ophthalmol Chic Ill* 1960. 2006 Oct;124(10):1487–90.

6. 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.

7. Tseng SCG, Espana EM, Kawakita T, Di Pascuale MA, Li W, He H, et al. How does amniotic membrane work? *Ocul Surf. 2004 Jul;2(3):177-87.*

8. Seitz B. [Amniotic membrane transplantation. An indispensable therapy option for persistent corneal epithelial defects]. *Ophthalmol Z Dtsch Ophthalmol Ges. 2007 Dec;104(12):1075-9.*

9. Espana EM, Grueterich M, Ti SE, Tseng SCG. Phenotypic study of a case receiving a keratolimbal allograft and amniotic membrane for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology. 2003 Mar;110(3):481-6.*

10. Mohan S, Budhiraja I, Saxena A, Khan P, Sachan SK. Role of multilayered amniotic membrane transplantation for the treatment of resistant corneal ulcers in North India. *Int Ophthalmol. 2014 Jun;34(3):485-91.*

11. Lee SB, Li DQ, Tan DT, Meller DC, Tseng SC. Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res. 2000 Apr;20(4):325-34.*

12. Ferreira De Souza R, Hofmann-Rummelt C, Kruse FE, Seitz B. [Multilayer amniotic membrane transplantation for corneal ulcers not treatable by conventional therapy - a prospective study of the status of cornea and graft during follow-up]. *Klin Monatsbl Augenheilkd. 2001 Aug;218(8):528-34.*

13. Gris O, Wolley-Dod C, Güell JL, Tresserra F, Lerma E, Corcostegui B, et al. Histologic findings after amniotic membrane graft in the human cornea. *Ophthalmology. 2002 Mar;109(3):508-12.*

14. Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers.

Ophthalmology. 1999 Aug;106(8):1504-1510; discussion 1511.

15. Letko E, Stechschulte SU, Kenyon KR, Sadeq N, Romero TR, Samson CM, et al. Amniotic membrane inlay and overlay grafting for corneal epithelial defects and stromal ulcers. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960. 2001 May;119(5):659-63.*

16. Solomon A, Meller D, Prabhasawat P, John T, Espana EM, Steuhl K-P, et al. Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocelles, and deep ulcers. *Ophthalmology. 2002 Apr;109(4):694-703.*

17. Stoiber J, Muss WH, Pohla-Gubo G, Ruckhofer J, Grabner G. Histopathology of human corneas after amniotic membrane and limbal stem cell transplantation for severe chemical burn. *Cornea. 2002 Jul;21(5):482-9.*

18. Solomon A, Meller D, Prabhasawat P, John T, Espana EM, Steuhl K-P, et al. Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocelles, and deep ulcers. *Ophthalmology. 2002 Apr;109(4):694-703.*

19. Lee SH, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol. 1997 Mar;123(3):303-12.*

20. Namba H, Narumi M, Nishi K, Goto S, Hayashi S, Yamashita H. "Pleats fold" technique of amniotic membrane transplantation for management of corneal perforations. *Cornea. 2014 Jun;33(6):653-7.*

21. Chan E, Shah AN, O'Brart DPS. "Swiss roll" amniotic membrane technique for the management of corneal perforations. *Cornea. 2011 Jul;30(7):838-41.*

22. Манолова Я., Дисертация на тема Трансплантация на амниотична мембрана - логистика, хирургични техники и микроструктурен анализ на резултатите. 2017г.