Original researches

The effectiveness of the use of various techniques of amniotic membrane (AM) transplantation in the corneal degenerative processes

Received: 18 August 2020
Revised: 28 August 2020
Accepted: 07 September 2020

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Polkovnyka Potekhina St., 16, Kyiv, 03041, Ukraine

Tel.: +38-098-546-98-76
E-mail: vethouse.avs@ukr.net

Cite this article: Shupyk, O. V., Mazurkevich, A. Y., Bokotko, R. R., & Dudus, T. V. (2020). The effectiveness of the use of various techniques of amniotic membrane (AM) transplantation in the corneal degenerative processes. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 8(3), 219–225. doi: 10.32819/2020.83032

O. V. Shupyk, A. Y. Mazurkevich, R. R. Bokotko, T. V. Dudus
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Abstract. The amniotic membrane – the innermost of the three membranes, it develops from the fetal ectoderm, it is transparent, avascular and consists of an epithelial cell layer located on the basement membrane and connective tissue stroma. The application efficiency of the amniotic membrane transplantation technique in rabbits with experimental bacterial keratitis has been investigated. The animals were simulated with moderate bacterial keratitis (with preliminary exposure to long-wavelength mercury lamp beams) by the administration to each eye of the *Staphylococcus aureus* pathogenic strain. On the 14th day, the amniotic membrane was transplanted using two methods: by biological covering with episcleral fixation using simple interrupted sutures and layer-by-layer transplantation with fixation of the membrane within the damage of the cornea with simple interrupted sutures. The degree of the inflammatory process was assessed according to the author's point scale, which included eight signs. On the 7th, 14th, and 30th days, the experimental animals were euthanized and microscopic examination of the cornea was performed. It was found that on the 7th day of application, complete epithelization of the corneal surface occurred, and on the 30th day, differentiation of its cells into layers. When using the layer-by-layer technique of amniotic membrane transplantation with using simple interrupted sutures, a more pronounced inflammatory reaction was observed in comparison with the biological covering technique. During all observation periods, most experimental animals did not show clinical and morphological signs of inflammatory infiltration. The obtained effect of both methods of amniotic membrane transplantation indicates the effectiveness of using this biological material as the main or supportive in the treatment of severe eye pathologies.

Keywords: experimental keratitis; Chinchilla rabbits; mesenchymal stem cells (MSC); amniotic membrane transplantation (AMT); cornea

Ефективність застосування різних технік трансплантації амніотичної оболонки за дегенеративних процесів рогівки

О. В. Шупик, А. Й. Мазуркевич, Р. Р. Бокотько, Т. В. Дудус
Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, Україна

Анотація. Амніотична оболонка – внутрішня з трьох плодових оболонок, розвивається із фетальної ектодерми, прозора, аваскулярна, складається із шару епітеліальних клітин, розміщених на базальній мембрані та сполучнотканинної строми. Досліджено ефективність застосування техніки трансплантації амніотичної мембрани за експериментального бактеріального кератиту в кролів. Тваринам моделювали бактеріальний кератит середнього ступеня тяжкості (з попереднім впливом довгохвильових променів ртутної лампи) інсталяцією патогенного штаму *Staphylococcus aureus*. На 14-ту добу виконували трансплантацію амніотичної оболонки двома методами: біологічним покриттям з епісклеральною фіксацією вузлуватими швами та пошаровою трансплантацією з фіксацією оболонки в межах пошкодження до тканини рогівки вузлуватими швами. Оцінювали ступінь запального процесу за авторською бальною шкалою, що включала вісім ознак. На 7-му, 14-ту і 30-ту добу проводили забій дослідних тварин із мікроскопічним дослідженням рогівки. Встановили, що на 7-му добу після трансплантації амніотичної оболонки відбулася повна епітелізація поверхні рогівки, а на 30-ту – диференціація її клітин на шари. При використанні пошарової техніки трансплантації амніотичної мембрани з її фіксацією вузлуватими швами спостерігалася більш виражена, порівняно з технікою біологічного покриття, запальна реакція. На всіх термінах спостереження у більшості експериментальних тварин не виявляли клінічних і морфологічних ознак запальної інфільтрації. Отриманий ефект обох методів хірургічної трансплантації амніотичної оболонки вказує на ефективність застосування цього біологічного матеріалу, як основного або допоміжного при лікуванні тяжких патологій ока.

Ключові слова: експериментальний кератит; кролі породи Шиншила; мезенхімальні стовбурові клітини (МСК); трансплантація амніотичної оболонки (ТАО); рогівка ока

Вступ

Амніотична мембрана (АМ) вперше використана в офтальмології більше 70 років тому (Sorsby & Symons, 1946). Однак, широке використання трансплантації амніотичної мембрани (ТАМ) у пацієнтів з різною патологією переднього відділу ока почалося з 1995 року (Sippel et al., 2001; Kasparov & Trufanov, 2003; Seitz, 2006). Нині завдяки своїм унікальним властивостям трансплантації амніотичної мембрани зайняла важливе місце в реконструктивній хірургії очної поверхні.

У численних зарубіжних експериментальних і клінічних дослідженнях доведено ефективність трансплантації амніотичної мембрани при різних запальних, дистрофічних і дегенеративних захворюваннях рогівки (Kim & Tseng, 1995; Seitz et al., 2008; Thang et al., 2015).

У дослідженнях Chui & Tseng (2001) показали, що амніотина оболонка інгібує диференціювання кератоцитів у міофібробласти, чим сприяє підтримці прозорості рогівки (Chui & Tseng (2001)). В амніотичній мембрані людини виявлено багато протизапальних факторів: тканинні інгібітори металопротеаз, інтерлейкіни IL-I, IL-X, а також ендостатин, що прігнічує проліферацію ендотеліальних клітин, ангіогенез і пухлинний ріст (Dua et al., 2004). Епітелій амніотичної оболонки синтезує тромбоспондин-1, що являється антиангіогенним фактором, а строма амніотичної оболонки супресує два потужні прозапальні фактори – IE-1a і IE-1 (Hao et al., 2000).

Високий уміст нейротропних речовин робить амніотичну оболонку ідеальним субстратом для реконструкції епітелію поверхні ока (Schroeder et al., 2007).

Найважливіші показання до трансплантації амніотичної мембрани в реконструктивній хірургії ока – це стійкі пошкодження епітелію рогівки з виразкою різної етіології, дефекти після хірургічного видалення значної ділянки ураженої кон'юнктиви, гострих хімічних опіків, симблефарона та реконструкції склепінь кон'юнктиви, дефіцит лімбальних стовбурових клітин рогівки з одночасною пересадкою стовбурових клітин (Schlötzer-Schrehardt & Kruse, 2005; Ma et al., 2006; Gaafar et al., 2014). Клінічні дослідження показують, що трансплантація амніотичної оболонки сприяє епітелізації і диференціації епітелію поверхні ока.

Sorsby & Symons (1946) вперше використав амніотичну оболонку як біологічну пов'язку в лікуванні лужних опіків очей [14]. Застосування амніотичної оболонки в якості біопов'язки для покриття зони пошкодження чи запалення виявило не лише позитивний її вплив на процеси загоєння, але й значний анальгезуючий ефект. Крім того, амніотична оболонка володіє високою міцністю і пластичністю, не перешкоджає надходженню лікарських речовин із кон'юнктивальної порожнини.

Lee & Tseng (1997) в експерименті довели, що базальна оболонка амніона – це субстрат, що полегшує міграцію епітеліальних клітин і підсилює їх адгезію (Lee & Tseng, 1997). Також вона стимулює диференціювання клітин, що сприяє прискоренню епітелізації. Особливо слід зазначити, що морфологія епітеліальних клітин, культивованих на амніоні ідентична нормальним клітинам рогівки або кон'юнктиви (залежно від зони трансплантації).

Відомо, що фібробласти відповідають за утворення рубцевої тканини під час загоєння ран і активуються трансформуючим чинником зростання Р (TGF-р) (Dua & Azuara-Blanco, 2000). Амніотична оболонка інгібує рецептори фібробластів до TGF-р, зводячи процеси фіброзу до мінімуму. Доведено, що амніотична мембрана відіграє роль супресора TGF-р у рогівці, лімбі та кон'юнктиві.

Амніотична мембрана має антимікробну активність проти ряду мікроорганізмів, що забезпечується формуванням фізичного бар'єра за рахунок базальної мембрани, а також наявністю в ній лізоциму, трансферину, 7Ь-імуноглобуліну, лактоферину. Амніотична мембрана може знизити ризик виникнення інфек-

ції завдяки антибактеріальним властивостям. Амніотична оболонка містить цистатин Е, аналог інгібітора протеїназ цистеїну, що володіє противірусними властивостями (Shimazaki et al., 1998; Solomon et al., 2002).

У зв'язку з цим проведення досліджень із вивчення властивостей і можливості використання в офтальмології препарату кріоконсервованої амніотичної оболонки тварин, представляє великий науковий і практичний інтерес.

Метою і завданням дослідження було на експериментальній моделі бактеріального кератиту середньої тяжкості, за допомогою візуальних методів оцінювання міри пошкодження рогівки ока з гістологічним дослідженням, порівняти ефективність двох технік трансплантації амніотичної оболонки на прискорення епітелізації, зменшення болю та зниження запального процесу тканинах ока.

Матеріал і методи досліджень

Процедури, передбачені протоколом дослідження одобрені локальним етичним комітетом (НУБіП України, м. Київ), виконані у відповідності до вимог Європейської конвенції про захист домашніх та лабораторних тварин, (конвенцію ратифіковано Законом України, N 578-VII (578-18) від 18.09.2013). Експериментальне дослідження проведено на обох очах 20 кроликів породи Шиншила вагою 2,5–3,0 кг., яких утримували в умовах віварію на звичайному раціоні. Оперативні втручання виконували на базі клініки Немішаївського Агротехнічного коледжу.

Моделювання бактеріального кератиту середнього ступеня тяжкості проводили під внутрішньом'язевим змішаним наркозом (у розведенні 1 : 1 Ксилазин із кетаміном 0,15 мл/кг маси тіла тварини) і місцевою анестезією (інстиляції в кон'юнктивальну порожнину 0,5% *Sol. alcaini*). Кролів клали під ртутну лампу ДРТ-240 (використовується в медичних установах як апарат для стерилізації приміщень і інструментів та при лікуванні захворювань шкіри) і тримали під довгохвильовим променем (UVA довжина 320 нм) протягом 3 хв. Зараження пошкодженої поверхні рогівки та кон'юнктиви проводили методом інсталяції патогенного штаму *Staphylococcus aureus* 10⁵ КУО в 1 мл, який отримали виділенням чистої культури.

На 14-ту добу на обидва ока 10 кроликам виконували трансплантацію амніотичної оболонки у вигляді біологічного покриття з епісклеральною фіксацією вузлуватими швами 8/00; та на обидва ока 10 кроликам – у вигляді поширового трансплантату з фіксацією оболонки в межах ушкодження до тканини рогівки вузлуватими швами.

На етапі забору матеріалу (7-ма, 14-та та 30-та доба) тварин виводили з експерименту шляхом введення у серцевий м'яз розчину тіопенату, з послідовним забором рогівки. Енуклеовані очні яблука фіксували в 10% нейтральному розчині формаліну, заливали в парафін, з послідовним виготовленням тонких гістопрізів за загальноприйнятими методиками (Horalskiy et al., 2019). Зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином, досліджували під мікроскопом.

Для оцінювання ступеня запального процесу використовували авторську бальну шкалу, що включає вісім ознак:

I. Виділення в кон'юнктивальній порожнині: 0 – відсутні, 1 – незначні слизові, 2 – виражені слизові;

II. Ступінь гіперемії кон'юнктиви очного яблука: 0 – блідо-рожева, відповідає фізіологічній нормі, 1 – слабка гіперемія кон'юнктиви, 2 – помірно-виражена гіперемія кон'юнктиви, 3 – виражена гіперемія кон'юнктиви очного яблука;

III. Набряк рогівки: 0 – набряк відсутній, 1 – помірно-виражений локальний набряк у зоні запалення, 2 – середнього ступеня вираження локальний набряк рогівки в зоні запалення, 3 – дифузний набряк у зоні запалення з переходом на навколишню рогівку;

IV. Запальна інфільтрація: 0 – відсутня, 1 – крапкові поодинокі (не більше трьох) субепітеліальні інфільтрати, 2 – точкові множинні (більше трьох) субепітеліальні інфільтрати, 3 – локальна зливна інфільтрація рогівки;

V. Васкуляризація рогівки: 0 – відсутня, 1 – у межах одного квадранта, 2 – у межах двох квадрантів;

VI. Стан навколишньої рогівки: 0 – прозора, набряк відсутній, 1 – прозора, помірно виражений набряк, 2 – зниження прозорості, дифузний набряк рогівки;

VII. Стан амніотичної мембрани: 0 – мембрана повністю лізована, 1 – мембрана частково лізована, 2 – мембрана збережена;

VIII. Ступінь помутніння рогівки: 0 – відсутня, 1 – ніжне хмаровидне, 2 – значне помутніння, з втратою прозорості.

Достовірність різниці між двома вибірками визначали за U-критерієм Манна-Уїтні.

Результати

Через 24 години після інфікування клітинною культурою у 100% кроликів діагностували бактеріальний кератит середнього ступеня тяжкості. На 14-ту добу в 93,4% кроликів відмітили, нерівномірне помутніння з явищами вогнищевої інфільтрації та набряк стромы з вираженим запальним процесом; у 52% чітко виражену ерозію рогівки 2–4 мм у діаметрі, у деяких – коагуляційний некроз тканин рогівки.

На 7-у добу після трансплантації амніотичної оболонки (ТАО) методом біологічного покриття при розкритті повік спостерігали відсутність кон'юнктивальної ін'єкції, гіперемовану кон'юнктиву та збереження амніотичної оболонки на поверхні рогівки у п'яти кролів (10 очей). У чотирьох кролів (4 очей) виявили виражений набряк у стромі рогівки під мембраною (Рис. 1а).

При мікроскопічному дослідженні в усіх випадках виявляли значний набряк стромы рогівки. У стромі кератоцити розподілені нерівномірно. Місцями відмічали фокальний мукоїдний набряк колагенових стромальних пластин, ознаки запальної інфільтрації в центральних ділянках рогівки та поблизу лімба. На 7-му добу відбулася повна епітелізація поверхні рани. Шар епітелію нерівномірної товщини, складався з 2–3 шарів епітеліальних клітин, цитоплазма частини з них набрякла. Порушення диференціації епітеліоцитів по шарам, передня погранична пластинка розміщена під покривним епітелієм не мала чітких меж зі стромою, місцями були ознаки розшарування сіток колагенових фібрил, що вказує на гострий запальний процес в товщі шарів рогівки ока (Рис. 1б).

На 14-ту добу після трансплантації амніотичної оболонки відмітили блідо-рожеву кон'юнктиву, відсутність виділень із кон'юнктивальної порожнини. Виявлено частковий лізис амніотичної оболонки в оптичній зоні рогівки зі збереженням її в області лімба та швів у трьох кроликів (три ока). Амніотична оболонка відсутня у одного кроля (одне око), у двох кроликів

Рис. 1. 7-ма доба після трансплантації амніотичної мембрани технікою біологічного покриття: А – загальний вигляд; Б – гісто-препарат рогівки ока кролика, гематоксилін і еозин, $\times 40$.

Рис. 2. 14-та доба після трансплантації амніотичної мембрани технікою біологічного покриття: А – загальний вигляд; Б – гісто-препарат рогівки ока кролика, гематоксилін і еозин, $\times 40$.

Рис. 3. 30-та доба після трансплантації амніотичної мембрани технікою біологічного покриття: А – загальний вигляд; Б – гісто-препарат рогівки ока кролика, гематоксилін і еозин, $\times 40$.

(два ока) вона знаходилася в просвіті очної щілини у вигляді тяжа. При цьому в усіх випадках (п'ять кроликів) поверхня рогівки епітелізована. Помірно виражений набряк у стромі рогівки спостерігали у чотирьох кроликів (чотири ока) (Рис. 2а).

Мікроскопічно через два тижні після операції зберігається фокальний набряк стромі рогівки та мукоїдний набряк її колагенових пластин. Поверхня рогової оболонки повністю епітелізована, але місцями зберігається витончення епітеліального покриву. В інших місцях відмічали збільшення кількості клітин епітелію до 5–6 шарів. Тут виявляли їх диференціацію по шарам і наближення епітеліального шару до нормального вигляду (Рис. 2б). Ознак запальної інфільтрації рогової оболонки не виявлено.

На 30-у добу після трансплантації амніотичної мембрани технікою біологічного покриття відмітили блідо-рожеву кон'юнктиву та відсутність виділень із кон'юнктивальної порожнини (Рис. 3а). В усіх експериментальних тварин (п'ять очей) амніотична оболонка відсутня, поверхня рогівки епітелізована, флюоресцеїном не забарвлювалася. У одному випадку (одне око) спостерігали формування неінтенсивного помутніння з явищами залишкової інфільтрації. Васкуляризація рогівки в усіх тварин відсутня (Рис. 3б). Через місяць після проведення оперативного втручання мікроскопічно виявляли повну диференціацію епітеліальних клітин по шарам, хоча місцями залишався потовщеним епітелій з незначним акантозом.

На 7-му добу після пошарової трансплантації амніотичної мембрани при розкритті повік були відсутні виділення в усіх випадках (п'ять очей), помірна гіперемія кон'юнктиви у чотирьох кроликів (три ока) (Рис. 4а). Мембрана збережена на поверхні рогівки в одній тварини (одне око), і в одній (одне око) – повністю лізована, у чотирьох (чотири ока) – частково лізована. Реєстрували епітелізацію поверхні рогівки, помірно виражений набряк стромі рогівки у чотирьох випадках (чотири ока) і сильно виражений – у двох (два ока).

Гістологічно в усіх випадках виявляли набряк стромі рогівки, найбільш виражений у поверхневих шарах, що проявлявся формуванням сітчастої структури (Рис. 4б). У цих місцях кератоцити практично відсутні. Запальні інфільтрати виявляли поблизу лімба та навколо шовного матеріалу.

Через два тижні після пошарової трансплантації амніотичної оболонки спостерігали помірну гіперемію кон'юнктиви у двох кроликів (два ока) і відсутність кон'юнктивального вмісту в усіх випадках. У двох кроликів (два ока) мембрана була повністю збережена на поверхні рогівки, у чотирьох (чотири ока) – частково лізована. Рогівка епітелізована у всіх випадках. У трьох кроликів (три ока) реєстрували помірно виражений набряк у стромі рогівки (Рис. 5а). У двох випадках (два ока) спостерігали васкуляризацію.

Через два тижні після операції гістологічно у меншій кількості тварин виявляли ознак набряку стромі рогівки і вони

Рис. 4. 7-ма доба після пошарової трансплантації амніотичної мембрани: А – загальний вигляд; Б – гісто-препарат рогівки ока кролика, гематоксилін і еозин, $\times 40$.

Рис. 5. 14-та доба після пошарової трансплантації амніотичної мембрани: А – загальний вигляд; Б – гістопрепарат рогівки ока кролика, гематоксилін і еозин, $\times 40$.

Рис. 6. 30-та доба після пошарової трансплантації амніотичної мембрани: А – загальний вигляд; Б – гістопрепарат рогівки ока кролика, гематоксилін і еозин, $\times 40$.

були менш інтенсивні (Рис. 5б). Поверхня рогової оболонки повністю вкрита шаром епітеліальних клітин.

Через місяць після пошарової трансплантації амніотичної мембрани у шести кроликів (шість очей) спостерігали блідо-рожеву кон'юнктиву, у двох кроликів (чотири ока) – слабку її гіперемію. У двох кроликів (чотири ока) мембрана залишалася

збереженою на поверхні рогівки, у двох кроликів (чотири ока) частково лізована, в одного (одне око) – повністю лізована. У двох випадках (два ока) набряк стромі рогівки відсутній, у двох (два ока) – дифузний, у чотирьох (чотири ока) – слабо виражений. У двох кроликів (два ока) спостерігали крапкову інфільтрацію, наявність васкуляризації в межах одного квадрату (Рис. 6а).

Таблиця. Порівняльна оцінка вираженості запальної реакції очей експериментальних тварин залежно від хірургічної техніки трансплантації амніотичної оболонки (критерій Манна-Уїтні).

Критерії	7-доба			14-доба			30-доба		
	Біологічне покриття	Пошарова трансплантація	P	Біологічне покриття	Пошарова трансплантація	P	Біологічне покриття	Пошарова трансплантація	P
Стан кон'юнктиви	825	1005	0,09	390	430	0,47	85	125	0,03
Виділення в кон'юнктивальній порожнині	795	1035	0,03	390	430	0,47	–	–	–
Набряк стромі рогівки	765	1065	0,01	406	414	0,90	105	105	1,00
Запальна інфільтрація	915	915	0	370	450	0,12	85	125	0,03
Флуоресцеїновий тест	915	915	1,00	370	450	0,12	85	125	0,03
Стан навколишньої рогівки	729	1101	0,002	370	450	0,17	–	–	–
Стан амніотичної мембрани	867	963	0,44	362	458	0,15	77	133	0,02
Помутніння рогівки	915	915	0	410	410	0	93	117	0,33
Васкуляризація рогівки	915	915	0	410	410	0	85	125	0,03

На тридцяті добу після операції реестрували повну епітелізацію поверхні рани, але при цьому диференціація по шарах наявна лише в центральних ділянках рогівки. Навколо шовного матеріалу епітеліальний шар витончений, а епітеліоцити – дегенеративно змінені. У цих місцях зберігався набряк строми рогової оболонки. Слід відмітити, що дегенеративні зміни локалізовані вздовж шовного матеріалу, що проходив крізь строми (Рис. 66).

На 7-му добу після трансплантації амніотичної мембрани вираженість запального процесу в рогівці експериментальних тварин достовірно нижча в групі з біологічним покриттям амніотичної оболонки, ніж у групі з пошаровою трансплантацією за наступними показниками: кількість виділень у кон'юнктивальній порожнині ($P = 0,03$), ступінь набряку строми рогівки ($P = 0,01$) і стан навколишньої рогівки ($P = 0,002$) (таблиця).

На 14-ту добу після трансплантації амніотичної мембрани статистично достовірних відмінностей між двома експериментальними групами за критерієм Манна-Уїтні не відмітили ($P > 0,05$) (див. табл.).

На 30-ту добу в групах із різною технікою трансплантації амніотичної оболонки прояв запального процесу в рогівці достовірно нижча в тварин із застосуванням техніки біологічного покриття за критеріями: ступінь гіперемії кон'юнктиви ($P = 0,03$), запальна інфільтрація строми рогівки ($P = 0,03$), ступінь фарбування рогівки флюоресцеїном ($P = 0,03$), збереження амніотичної оболонки ($P = 0,02$), васкуляризація рогівки ($P = 0,03$).

Обговорення

Як показали численні експериментальні та клінічні зарубіжні дослідження, існує великий спектр запальних, дегенеративних і дистрофічних захворювань рогівки, при яких трансплантацію амніотичної оболонки можна успішно застосовувати (Fukuda et al., 1999; Zhang et al., 2015; Shortt et al., 2007).

У нашому дослідженні при використанні пошарової техніки трансплантації амніотичної мембрани з її фіксацією вузлуватими швами до поверхні рогівки спостерігалася більш виражена, порівняно з технікою біологічного покриття, запальна реакція. Про це свідчить наявність на 30-ту добу після пошарової трансплантації помірно вираженого набряку строми рогівки в центрі у шести тварин і дифузного набряку у двох тварин. У чотирьох випадках характерним була наявність точкової інфільтрації в навколишній рогівці. Еластичність і міцність амніотичної мембрани, її виражені протизапальні, епітелізуючі, антиангіогенні та антифіброblastні властивості в умовах дефіциту донорського матеріалу та з етичних міркувань, дозволяють використовувати амніотичну оболонку в якості альтернативи донорській рогівці та вимагають подальшого клінічного дослідження (Mazurkevych et al., 2014).

Ми вважаємо, що отриманий позитивний ефект пов'язаний з бактеріостатичними і протизапальними властивостями амніотичної мембрани, а також зі збереженням життєздатності її клітин, здатних до проліферації, що підтверджено результатами й інших дослідників. Показано, що саме амніотичні мезенхімальні стовбурові клітини (hAM-MSC), покращують клінічні та гістопатологічні прояви пошкодження на моделі лугового опіку рогівки завдяки своїм протизапальним та антифібротичним властивостям. У цьому контексті мезенхімальні стовбурові клітини, отримані з амніотичної оболонки людини, раніше використовували як потенційний терапевтичний засіб при серцево-судинних, печінкових і кістково-суглобових захворюваннях (Tsuji et al., 2010; Zhang et al., 2011; Muñoz-López et al., 2017).

Відомо, що запалення рогівки та неоваскуляризація відбувається через важкий дефіцит лейкоцитних стовбурових клітин (LSC) у рогівці. Повідомляється, що молекулярні механізми,

включаючи основні проангіогенні та антиангіогенні фактори, зокрема, фактор росту судинного ендотелію (VEGF) відіграють певну роль у розвитку неоваскуляризації. При лікуванні пошкодження поверхні ока амніотична оболонка використовується у якості зовнішньої опори. У LSC-дефіцитних очах мембрана діє як базальна, перешкоджаючи клітинній міграції та прилипанню до місця пошкодження (Schlötzer-Schrehardt & Kruse, 2005; Ma et al., 2006). Загальновідомо, що трансплантація стовбурових клітин викликає ангіогенез (Hosseini & Nejabat, 2007). Часткове або повне знищення LSC призводить до хронічного запалення, поверхневої васкуляризації, виразки та перфорації рогівки (Dua, 1998; Dua & Azuara-Blanco, 2000; Schlötzer-Schrehardt & Kruse, 2005; Li et al., 2007). Коли на поверхні рогівки з'являються келихоподібні клітини кон'юнктиви то можна побачити фіброзні розростання (Dua, 1998).

Амніотичну оболонку можна використовувати як джерело мезенхімальних стовбурових клітин, що походять від новонароджених. У дослідженнях клітин амніонної рідини другого та третього триместру вагітності у людини підтвердили кількість потенційних донорів цього матеріалу. Стовбурові клітини з амніотичної оболонки людини (hAFSC) можна отримати неінвазивно. Ці клітини мають високу швидкість проліферації, індукують імунологічну толерантність, мають властивості ембріональних стовбурових клітин і здатні диференціюватися у трьох напрямках та давати кілька клітинних ліній (адипоцити, остеобласти, хондроцити, клітини нирок, гепатоцити та кардіоміоцити). Тому стовбурові клітини з амніотичної оболонки (hAFSC) можуть бути ідеальним джерелом застосування для терапії стовбуровими клітинами, у тому числі при лікуванні ушкоджень очей (Kim et al., 2012; Moraghebi et al., 2017).

Висновки

Покриття рогівки амніотичною оболонкою ефективно в лікуванні експериментального бактеріального кератиту. Повна епітелізація поверхні рогівки експериментальних тварин відбувається на 7-му добу після операції з диференціацією клітин по шарах – до 30-ої доби. На всіх етапах спостереження у більшості експериментальних тварин не виявляли клінічних і морфологічних ознак запальної інфільтрації. Отриманий ефект обох методів хірургічної трансплантації амніотичної оболонки, вказує на ефективність застосування цього біологічного матеріалу, як основного чи допоміжного при лікуванні важких патологій ока і потребує детальнішого дослідження для подальшого використання цих методик у клінічних випадках із патологією очей.

References

- Choi, T. H., & Tseng, S. C. G. (2001). In Vivo and In Vitro Demonstration of Epithelial Cell-induced Myofibroblast Differentiation of Keratocytes and an Inhibitory Effect by Amniotic Membrane. *Cornea*, 20(2), 197–204.
- Dua, H. S., Gomes, J. A., King, A. J., & Maharajan, V. S. (2004). The amniotic membrane in ophthalmology. *Survey of Ophthalmology*, 49(1), 51–77.
- Dua, H. S. (1998). The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. *British Journal of Ophthalmology*, 82(12), 1407–1411.
- Dua, H. S., & Azuara-Blanco, A. (1999). Allo-limbal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. *British Journal of Ophthalmology*, 83(4), 414–419.
- Dua, H. S., & Azuara-Blanco, A. (2000). Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Survey of Ophthalmology*, 44(5), 415–425.
- Fukuda, K., Chikama, T., Nakamura, M., & Nishida, T. (1999). Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea*, 18(1), 73–79.

- Gaafar, T. M., El Hawary, R., Osman, A., Attia, W., Hamza, H., Brockmeier, K., & Osman, O. M. (2014). Comparative characteristics of amniotic membrane, endometrium and ovarian derived mesenchymal stem cells: A role for amniotic membrane in stem cell therapy. *Middle East Fertility Society Journal*, 19(3), 156–170.
- Hao, Y., Ma, D. H.-K., Hwang, D. G., Kim, W.-S., & Zhang, F. (2000). Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*, 19(3), 348–352.
- Horalskiy, L. P., Khomych, V. T., & Kononsky, A. I. (2019). Histological techniques and morphological methods in normal and pathological conditions. *Zhitomir, Polissia* (in Ukrainian).
- Hosseini, H., & Nejabat, M. (2007). A potential therapeutic strategy for inhibition of corneal neovascularization with new anti-VEGF agents. *Medical Hypotheses*, 68(4), 799–801.
- Kasparov, A. A., & Trufanov, C. B. (2003). Ispol'zovanie konservirovannoy amnioticheskoy membrany dlja rekonstrukcii poverhnosti perednego otrezka glaza [Use of preserved amniotic membrane for reconstruction of the surface of the anterior segment of the eye]. *Vestnik Oftal'mologii*, 3, 45–47 (in Russian).
- Kim, B. S., Chun, S. Y., Lee, J. K., Lim, H. J., Bae, J., Chung, H.-Y., Atala, A., Soker, S., Yoo, J. J., & Kwon, T. G. (2012). Human amniotic fluid stem cell injection therapy for urethral sphincter regeneration in an animal model. *BMC Medicine*, 10(1).
- Kim, J. C., & Tseng, S. C. G. (1995). Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*, 14(5), 473–484.
- Lee, S.-H., & Tseng, S. C. G. (1997). Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *American Journal of Ophthalmology*, 123(3), 303–312.
- Li, W., Hayashida, Y., Chen, Y.-T., & Tseng, S. C. (2007). Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Research*, 17(1), 26–36.
- Ma, D., Chen, J., Zhang, F., Lin, K., Yao, J., & Yu, J. (2006). Regulation of corneal angiogenesis in limbal stem cell deficiency. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25(6), 563–590.
- Mazurkevych, A. I., Kovpak, V. V., & Danilov, V. B. (2014). Klitynni tekhnolohii u veterynarnii medytsyni. Navchalnyi posibnyk. Kyiv, Komprynt (in Ukrainian).
- Moraghebi, R., Kirkeby, A., Chaves, P., Rönn, R. E., Sitnicka, E., Parmar, M., Larsson, M., Herbst, A., & Woods, N.-B. (2017). Term amniotic fluid: an unexploited reserve of mesenchymal stromal cells for reprogramming and potential cell therapy applications. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1).
- Muñoz-López, E., Hermida-Gómez, T., Fuentes-Boquete, I., de Toro-Santos, J., Blanco, F. J., & Díaz-Prado, S. M. (2017). Human amniotic mesenchymal stromal cells as favorable source for cartilage repair. *Tissue Engineering Part A*, 23(17–18), 901–912.
- Schroeder, A., Theiss, C., Steuhl, K.-P., Meller, K., & Meller, D. (2007). Effects of the human amniotic membrane on axonal outgrowth of dorsal root ganglia neurons in culture. *Current Eye Research*, 32(9), 731–738.
- Schlötzer-Schrehardt, U., & Kruse, F. E. (2005). Identification and characterization of limbal stem cells. *Experimental Eye Research*, 81(3), 247–264.
- Seitz, B. (2006). Histopathology and ultrastructure of human corneas after amniotic membrane transplantation. *Archives of Ophthalmology*, 124(10), 1487.
- Seitz, B., Das, S., Sauer, R., Mena, D., & Hofmann-Rummelt, C. (2008). Amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defects in eyes after penetrating keratoplasty. *Eye*, 23(4), 840–848.
- Shimazaki, J., Shinozaki, N., & Tsubota, K. (1998). Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *British Journal of Ophthalmology*, 82(3), 235–240.
- Shortt, A. J., Secker, G. A., Notara, M. D., Limb, G. A., Khaw, P. T., Tuft, S. J., & Daniels, J. T. (2007). Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Survey of Ophthalmology*, 52(5), 483–502.
- Sippel, K. C., Ma, J. J. K., & Foster, C. S. (2001). Amniotic membrane surgery. *Current Opinion in Ophthalmology*, 12(4), 269–281.
- Solomon, A., Meller, D., Prabhasawat, P., John, T., Espana, E. M., Steuhl, K.-P., & Tseng, S. C. (2002). Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocelles, and deep ulcers. *Ophthalmology*, 109(4), 694–703.
- Sorsby, A., & Symons, H. M. (1946). Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye: (Burns of the second degree). *British Journal of Ophthalmology*, 30(6), 337–345.
- Thatte, S. (2011). Amniotic membrane transplantation: An option for ocular surface disorders. *Oman Journal of Ophthalmology*, 4(2), 67.
- Tsuji, H., Miyoshi, S., Ikegami, Y., Hida, N., Asada, H., Togashi, I., Suzuki, J., Satake, M., Nakamizo, H., Tanaka, M., Mori, T., Segawa, K., Nishiyama, N., Inoue, J., Makino, H., Miyado, K., Ogawa, S., Yoshimura, Y., & Umezawa, A. (2010). Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circulation Research*, 106(10), 1613–1623.
- Zhang, D., Jiang, M., & Miao, D. (2011). Transplanted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in mouse. *PLoS ONE*, 6(2), e16789.
- Zhang, L., Coulson-Thomas, V. J., Ferreira, T. G., & Kao, W. W. Y. (2015). Mesenchymal stem cells for treating ocular surface diseases. *BMC Ophthalmology*, 15(S1).