

Оригинальное исследование | Original research
DOI: <https://doi.org/10.35693/SIM646547>

 This work is licensed under CC BY 4.0
© Authors, 2025

Оценка морфологической структуры децеллюляризованной человеческой амниотической мембраны

К.Е. Кучук², Л.Т. Волова¹, И.В. Новиков¹, Е.С. Милудин¹

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России
(Самара, Российская Федерация)

²ГБУЗ «СОКОБ имени Т.И. Ерошевского» (Самара, Российская Федерация)

Аннотация

Цель – изучить морфологическую структуру лиофилизированной амниотической мембраны, предварительно подвергнутой децеллюляризации физическим методом.

Материал и методы. Экспериментальное исследование сохранности анатомической структуры лиофилизированной амниотической мембраны (АМ) было выполнено на четырех группах фрагментов амниотической мембраны. Первая группа – АМ, пропитанная глицерином и высушенная над силикагелем; вторая группа – АМ, пропитанная глицерином и обработанная ультразвуком, лиофилизированная; третья группа – АМ, обработанная ультразвуком и лиофилизированная; четвертая группа – нативная АМ, не консервированная.

Выполнено изучение биоматериала с помощью световой микроскопии и сканирующей электронной микроскопии.

Результаты. Физические методы воздействия на биологическую ткань ожидаемо оказывают влияние на жизнеспособность клеток и позволяют получить полностью децеллюляризованную амниотическую мембрану.

Дополнительная обработка АМ глицерином перед физическим воздействием с целью децеллюляризации достоверно не способствует сохранению клеточных структур. При этом необходимо отметить, что в амниотической мембране, пропитанной глицерином, после физического воздействия сохраняется значимо больше фрагментов мембран эпителиальных клеток и более сохранна базальная мембрана.

Выводы. Разработанный нами метод децеллюляризации с использованием физических методов не подразумевает внесения в обрабатываемый биоматериал каких-либо химических веществ, которые впоследствии могут оказать непредсказуемое воздействие на окружающие имплантированную АМ регенерирующие ткани. Также консервация АМ предложенным способом лиофилизации позволяет получить морфологически целостный, эластичный и прочный биоматериал для регенеративной медицины.

Ключевые слова: амниотическая мембрана, децеллюляризация, лиофилизация, морфология лиофилизированной амниотической мембраны.

Конфликт интересов: не заявлен.

Для цитирования:

Кучук К.Е., Волова Л.Т., Новиков И.В., Милудин Е.С. Оценка морфологической структуры децеллюляризованной человеческой амниотической мембраны. Наука и инновации в медицине. 2025;10(X):XX-XX. <https://doi.org/10.35693/SIM646547>

Сведения об авторах

Кучук К.Е. – врач-офтальмолог, заведующая отделением заготовки и консервации тканей.

ORCID: 0009-0003-2986-5913

E-mail: kuchukke@rambler.ru

Волова Л.Т. – д-р мед. наук, профессор, директор НИИ «БиоТех».

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8510-3118>

E-mail: l.t.volova@samsmu.ru

Новиков И.В. – канд. мед. наук, ассистент кафедры травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии имени академика РАН А.Ф. Краснова.

ORCID: 0000-0002-6855-6828

E-mail: p111aa@yandex.ru

***Милудин Евгений Сергеевич** – д-р мед. наук, доцент кафедры оперативной хирургии и клинической анатомии с курсом медицинских информационных технологий.

ORCID: 0000-0001-7610-7523

E-mail: e.s.milyudin@samsmu.ru

***Автор для переписки**

Список сокращений

АМ – амниотическая мембрана.

Получено: 23.01.2025

Одобрено: 21.03.2025

Опубликовано: 10.04.2025

Morphological evaluation of decellularized lyophilized amniotic membrane

Kseniya E. Kuchuk², Larisa T. Volova¹, Iosif V. Novikov¹, Evgenii S. Milyudin¹

¹Samara State Medical University (Samara, Russian Federation)

²Samara Regional Clinical Ophthalmological Hospital named after T.I. Eroshevsky (Samara, Russian Federation)

Abstract

Aim – to study the morphological structure of lyophilized amniotic membrane preliminarily subjected to physical decellularization.

Material and methods. An experimental study of the preservation of the anatomical structure of lyophilized amniotic membrane was performed on four groups of amniotic membrane fragments. Group 1: AM impregnated with glycerin and dried over silica gel; Group 2: AM impregnated with glycerin, treated ultrasonically and lyophilized; Group 3: AM treated

ultrasonically and lyophilized; Group 4: native AM without preservation. The biomaterial was studied using light microscopy and scanning electron microscopy.

Results. Physical methods of influencing biological tissue have an expected effect on cell viability and allow obtaining a completely decellularized amniotic membrane. Additional treatment with glycerol before physical action on biological tissue for the purpose of decellularization does not have

a significant effect on the preservation of cellular structures. It should only be noted that in the amniotic membrane impregnated with glycerol, more fragments of epithelial cell membranes are preserved and the basement membrane is more preserved.

Conclusion. The decellularization method developed by us using physical methods does not introduce any chemicals into the processed biomaterial

that can have an unpredictable effect on regenerating tissues. Preservation of the amniotic membrane by lyophilization allows obtaining a morphologically integral, elastic and durable biomaterial.

Keywords: amniotic membrane, decellularization, lyophilization, morphology of lyophilized amniotic membrane.

Conflict of interest: nothing to disclose.

Citation

Kuchuk KE, Volova LT, Novikov IV, Milyudin ES. **Morphological evaluation of decellularized lyophilized amniotic membrane.** *Science and Innovations in Medicine.* 2025;10(X):XX-XX. DOI: <https://doi.org/10.35693/SIM646547>

Information about authors

Kseniya E. Kuchuk – MD, ophthalmologist, head of the tissue procurement and preservation department.

ORCID: 0009-0003-2986-5913

E-mail: kuchukke@rambler.ru

Larisa T. Volova – MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Director of the "BioTech" Research Institute.

ORCID: 0000-0002-8510-3118

E-mail: l.t.volova@samsmu.ru

Iosif V. Novikov – MD, Cand. Sci. (Medicine), assistant of the Department of Traumatology, Orthopedics and Extreme Surgery named after Academician of the Russian Academy of Sciences A.F. Krasnov.

ORCID: 0000-0002-6855-6828

E-mail: p111aa@yandex.ru

***Evgenii S. Milyudin** – MD, Dr. Sci. (Medicine), Associate professor, Department of Operative Surgery and Clinical Anatomy with a course in Medical Information Technologies.

ORCID: 0000-0001-7610-7523

E-mail: e.s.milyudin@samsmu.ru

***Corresponding Author**

Received: 23.01.2025

Accepted: 21.03.2025

Published: 10.04.2025

ВВЕДЕНИЕ

В регенеративной медицине широко применяется один из уникальнейших биоматериалов – это амниотическая мембрана (АМ), образованная монослоем эпителиальных клеток на базальной мембране и стромы, состоящей из трех слоев. Содержащиеся во всех слоях АМ биологически активные вещества обеспечивают активацию регенераторных процессов, пролиферацию клеток, а также ускоряют их миграцию [1–4]. Однако перед применением донорский биоматериал подвергается обязательной предварительной обработке. Прежде всего АМ отмывают от сгустков крови и слизи на ее поверхности. Данные мероприятия являются общепринятыми. Выполняемая далее обработка АМ различными химическими веществами с целью дезинфекции (в данном случае именно дезинфекции!), защиты биоматериала от избыточного повреждения в ходе консервации и последующей консервации по-разному оцениваются исследователями в плане необходимости, эффективности и влияния на сохранность биологически активных веществ в биоматериале [5]. Многие специалисты предпочитают использовать нативную либо криоконсервированную АМ, так как в данных случаях сохраняются жизнеспособными клетки и практически не повреждается анатомическая структура биоматериала [6–9]. Но поскольку нативную АМ хранить невозможно и есть вероятность использования инфицированного материала, методом выбора для использования АМ в регенеративной медицине является криоконсервация.

Однако необходимо отметить, что применение химических веществ при криоконсервации в средах, содержащих глицерин, использование антибактериальных препаратов при дезинфекции, а также замораживание и размораживание могут значительно изменить как структуру, так и жизнеспособность криоконсервированной АМ [9]. Другие распространенные методы консервации АМ, а именно высушивание над силикагелем либо лиофилизация, подразумевают полную потерю жизнеспособности клеточных элементов, децеллюляризацию и возможное нарушение морфологической структуры с сохранением анатомической целостности биоматериала [10, 11], что многие авторы считают одним из важнейших факторов успешного применения при реконструктивных операциях [11–13].

При создании тканеинженерных комплексов исследователи предпочитают в качестве биологической подложки для культивированных клеток децеллюляризованную АМ. Децеллюляризация – это процесс, направленный на удаление клеток из ткани с сохранением внеклеточного матрикса и трехмерности ее структуры [7, 14, 15], с использованием различных методов воздействия на клетки. Все методы децеллюляризации в зависимости от основного воздействующего фактора можно разделить на три типа – физические, химические и биологические. Физические методы присутствуют в большинстве протоколов предварительной обработки ткани. Они подразумевают применение ротаторов, шейкеров или камер прямой перфузии, позволяющих ускорить процесс обмена жидкости, воздействующей на клеточные мембраны, с целью разрушения клеток и их ядер. Но чаще исследователи используют химические агенты – анионное поверхностно-активное вещество додецилсульфат натрия, обладающий способностью денатурировать белки и растворять клеточные мембраны. Также специалисты используют органические кислоты, в частности, периуксусную кислоту, которая разрушает и удаляет нуклеиновые кислоты. Для децеллюляризации биоматериала возможно использование спиртов и хелатирующих агентов [16, 17].

Наиболее простым физическим методом децеллюляризации является процесс многократного замораживания и оттаивания, при котором происходят разрушение клеточных мембран кристаллами льда и соответственно потеря клетками жизнеспособности. Также к физическим методам можно отнести погружение в гипертонический раствор, что приводит к осмотическому стрессу и повреждению мембран клеток [17, 18]. Но наиболее эффективным физическим методом децеллюляризации является ультразвуковое воздействие, поскольку высокая эффективность повреждения клеточных структур звуковой энергией дополняется механическим очищением биоматериала от клеточного мусора [14].

ЦЕЛЬ

Изучение морфологической структуры лиофилизированной амниотической мембраны, предварительно подвергнутой децеллюляризации физическим методом.

■ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование сохранности анатомической структуры лиофилизированной амниотической мембраны было выполнено на четырех группах фрагментов амниотической мембраны. Биоматериал после отмывки в проточной воде от сгустков крови разрезался на фрагменты размером 1x1 см и распределялся на четыре группы. Первая группа – 10 фрагментов – амниотическая мембрана пропитывалась глицерином и помещалась на рамках над силикагелем и осуществлялось высушивание; вторая группа – 12 фрагментов – амниотическая мембрана пропитывалась глицерином и обрабатывалась низкочастотным ультразвуком при частоте 24–40 кГц в ультразвуковой ванне «Сапфир» ТТК (ООО «Сапфир», Москва, Россия) с последующей лиофилизацией; третья группа – 10 фрагментов – амниотическая мембрана обрабатывалась низкочастотным ультразвуком на частоте 24–40 кГц в ультразвуковой ванне «Сапфир» ТТК (ООО «Сапфир», Москва, Россия) и без предварительного пропитывания глицерином подвергалась лиофилизации.

Четвертая (контрольная) группа – 10 фрагментов нативной амниотической мембраны, которые исследовались без дополнительной обработки и консервации.

Лيوфилизацию материала (вакуумную сушку сублимацией) проводили с использованием сублимационной установки ALPHA2-4LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Остероде-ам-Харц, Германия).

Морфологические исследования проводились после фиксации биоматериала в 12% нейтральном растворе формалина, проводки через батарею спиртов и заливки в целлоидин. Выполнялось не менее 500 срезов с разных образцов биоматериала. Срезы окрашивались гематоксилин-эозином или пикрофуксином по Ван Гизону. Анализ изображений окрашенных препаратов производили с помощью системы визуализации на основе исследовательского микроскопа Olympus BX41 («Olympus», Япония), цветной цифровой камеры «ProgRes CF» и стационарного компьютера с программным обеспечением «Морфология 5.2» («ВидеоТест», Россия).

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) амниотической мембраны после консервации выполнялась с использованием растрового электронного микроскопа JEOLJSM-6390 A Analysis Station (Япония). Для данного исследования фрагменты биоматериала фиксировали 2,5% водным раствором глутарового альдегида, далее осуществляли проводку через батарею спиртов. После проведения через раствор этанола в возрастающей концентрации и сушки при комнатной температуре в течение 24 часов на биоматериал напылялось золото или углерод для улучшения требуемой поверхностной электропроводности при выполнении сканирующей электронной микроскопии.

Полученные результаты обрабатывались статистическими методами пакета SPSS_Statistics.

Работа была выполнена с разрешения комитета по биотехнике Самарского государственного медицинского университета (выписка из протокола №206 от 18 марта 2020 г.).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор действующего агента для децеллюляризации нами определен исходя из анатомо-гистологического

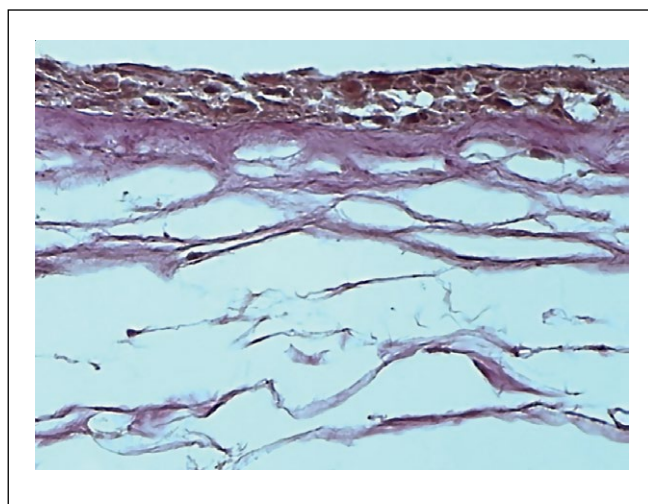


Рисунок 1. Препарат нативной амниотической мембраны. Окраска пикрофуксином. Ув. x400.

Figure 1. Native amniotic membrane preparation. Stained with picrofuchsin. Magnification x400.

строения и размеров биоматериала. В частности, низкочастотное ультразвуковое воздействие позволяет удалять элементы крови, а волновое воздействие и кавитация, вероятно, могут повреждать все клеточные структуры амниотической мембраны, поскольку толщина нативного биоматериала не более 0,5 мм. Учитывая, что в настоящее время критерии эффективности децеллюляризации не определены, нами изготавливались морфологические препараты. Мы считаем, что децеллюляризованные донорские органы не должны содержать неповрежденные клетки и клеточные компоненты.

Макроскопически биоматериал всех трех опытных групп был внешне похож на лист папиросной бумаги, эластичный и бархатистый на ощупь. Необходимо отметить, что образцы третьей группы лиофилизированной амниотической мембраны без пропитывания глицерином оказались с более матовой и неоднородной поверхностью, чем образцы первой и второй групп, предварительно пропитанные глицерином.

Морфологический препарат нативной амниотической мембраны демонстрирует полностью сохраненный эпителиальный слой с жизнеспособными клетками, множеством пиноцитарных пузырьков (**рисунок 1**). К базальной мембране прилежит компактный слой, состоящий из плотно переплетенных коллагеновых волокон, слой фибробластов – рыхлый с расположенными в переплетениях ретикулярных волокон фибробластами. Спонгиозный слой



Рисунок 2. Препарат амниотической мембраны, консервированной путем высушивания над силикагелем после предварительной обработки глицерином. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x400.

Figure 2. Amniotic membrane preparation preserved by drying over silica gel after preliminary treatment with glycerol. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification x400.

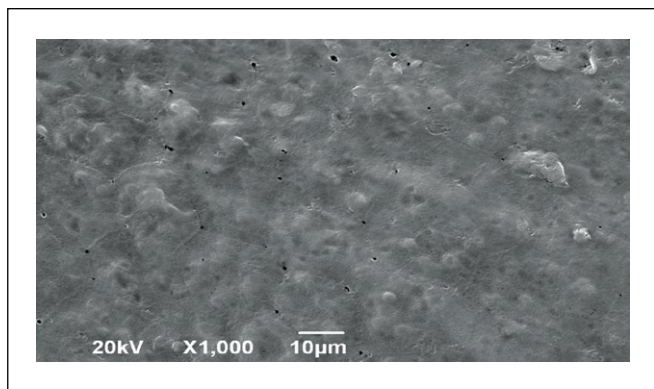


Рисунок 3. Электронно-микроскопическое изображение амниотической мембраны в сканирующем электронном микроскопе. Эпителиальная поверхность препарата амниотической мембраны силиковысушенной с предварительным пропитыванием глицерином. Ув. x1000.

Figure 3. Electron microscopic image of the amniotic membrane in a scanning electron microscope. Epithelial surface of the amniotic membrane preparation dried with silica and pre-impregnated with glycerol. Magnification x1000.

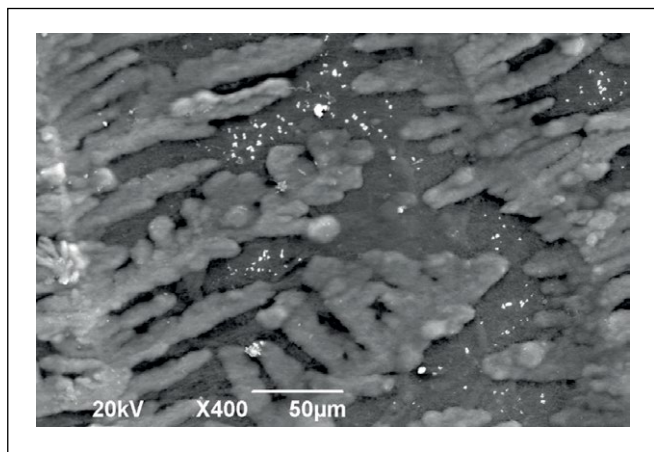


Рисунок 4. Электронно-микроскопическое изображение амниотической мембраны в сканирующем электронном микроскопе. Спонгиозный слой препарата амниотической мембраны силиковысушенной с предварительным пропитыванием глицерином. Ув. x400.

Figure 4. Electron microscopic image of the amniotic membrane in a scanning electron microscope. Spongy layer of the amniotic membrane preparation dried with silica and preliminary impregnation with glycerin. Magnification x400.

представлен нежными, в произвольном порядке переплетенными ретикулярными волокнами.

На гистологических препаратах первой группы – силиковысушенной амниотической мембраны после предварительного пропитывания глицерином – наблюдается практически гомогенная полоса, в которой сложно определить эпителиальный и компактный слои (**рисунок 2**). Местами визуализируются сильно уплощенные ядра клеток. Компактный слой стромы выглядит как гомогенная бесклеточная оксифильная полоса. Нередко видны тени ядер в слое фибробластов. Ядра сохранившихся фибробластов имеют палочковидную форму. Спонгиозный слой резко уплощен, определяется по разнонаправленным оксифильно окрашенным волокнам. При морфометрии общей толщины препарата ($n = 55$) лиофилизированной амниотической мембраны с предварительным пропитыванием глицерином получено среднее значение измерений – 6,9184 мкм.

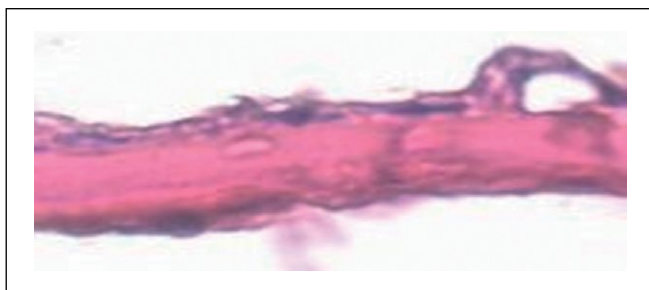


Рисунок 5. Препарат амниотической мембраны, консервированной путем лиофилизации после предварительной обработки глицерином. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x400.

Figure 5. Amniotic membrane preparation preserved by lyophilization after preliminary treatment with glycerol. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification x400.

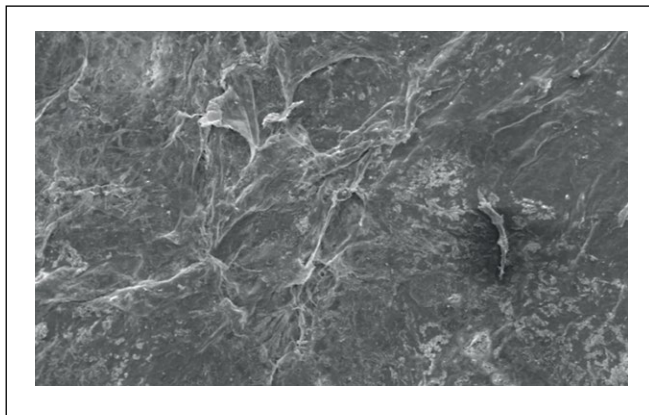


Рисунок 6. Электронно-микроскопическое изображение амниотической мембраны в сканирующем электронном микроскопе. Эпителиальная поверхность препарата лиофилизированной амниотической мембраны с предварительным пропитыванием глицерином. Ув. x50.

Figure 6. Electron microscopic image of amniotic membrane in a scanning electron microscope. Epithelial surface of a lyophilized amniotic membrane preparation with preliminary impregnation with glycerol. Magnification x50.

Растровая электронная микроскопия подтвердила сохранность эпителиального слоя у образцов первой группы (**рисунок 3**). Эпителиальный пласт, представленный частично поврежденными клетками, прилежит к подлежащему слою на всей поверхности биоматериала. Местами наблюдаются точечные дефекты, ограниченные контурами клеток.

Растровая электронная микроскопия амниотической мембраны, высушенной над силикагелем со стороны спонгиозного слоя, подтверждает, что значительные изменения происходят в рыхлом соединительнотканном слое стромы, а именно, спонгиозный слой сглаживается. Важно отметить наличие гомогенных бесструктурных субстратов формирующих древовидную форму по ходу разнонаправленных ретикулярных волокон (**рисунок 4**).

При детальном исследовании гистологических препаратов второй группы четко визуализируется эпителиальный слой (**рисунок 5**). На единичных участках наблюдается очаговая деструкция эпителиальных клеток. В сохранившихся клетках наблюдаются пикноз ядер и концентрация хроматина в виде конгломератов. Базальная мембрана повреждена на участке очаговой деструкции эпителиальных клеток. Компактный слой местами выглядит как

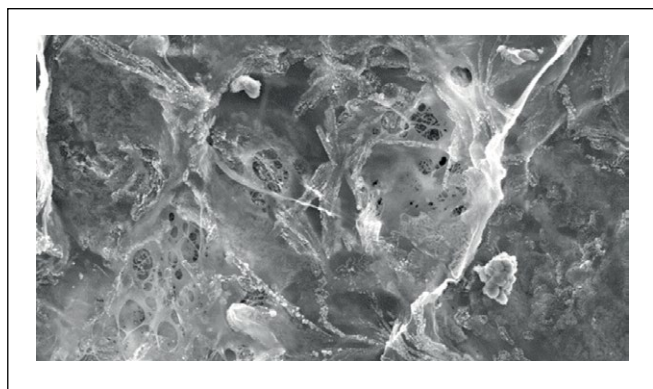


Рисунок 7. Электронно-микроскопическое изображение амниотической мембраны в сканирующем электронном микроскопе. Спонгиозный слой препарата лиофилизированной амниотической мембраны с предварительным пропитыванием глицерином. Ув. x400.

Figure 7. Electron microscopic image of amniotic membrane in a scanning electron microscope. Spongy layer of a lyophilized amniotic membrane preparation with preliminary impregnation with glycerol. Magnification x400.

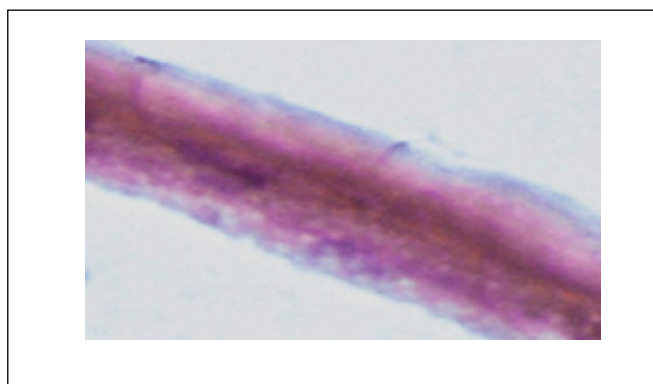


Рисунок 8. Препарат амниотической мембраны, консервированной путем лиофильной сушки без обработки глицерином. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x400.

Figure 8. Amniotic membrane preparation preserved by lyophilization without glycerol treatment. Hematoxylin and eosin staining. Magnification x400.

гомогенная бесклеточная оксифильная полоса, местами в нем визуализируются волокна. Спонгиозный слой также сохранен, но уплотнен, потеряна структурная организация. При морфометрии общей толщины препаратов (n – 48) лиофилизированной амниотической мембраны с предварительным пропитыванием глицерином получено среднее значение измерений – 10,236 мкм.

Сканирующая электронная микроскопия более подробно показала разрушения эпителиального слоя, отсутствие жизнеспособных клеточных структур, повреждения и частичную десквамацию базальной мембраны.

Спонгиозный слой представлен более плотными соединительнотканскими волокнами, на которых определяются гомогенные бесструктурные субстраты, прикрепленные гроздьями (**рисунок 7**).

Эпителиальный слой на гистологических препаратах третьей группы образцов выглядит уплотненным гомогенным оксифильным слоем (**рисунок 8**). Наблюдаются единичные конгломераты хроматина разрушенных ядер эпителиальных клеток.

Базальная мембрана неравномерной толщины частично отсутствует. Компактный слой имеет уплотненную

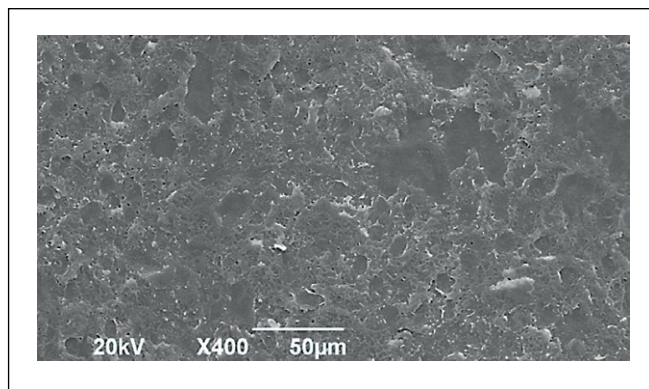


Рисунок 9. Электронно-микроскопическое изображение амниотической мембраны в сканирующем электронном микроскопе. Эпителиальная поверхность препарата лиофилизированной амниотической мембраны без предварительного пропитывания глицерином. Ув. x400.

Figure 9. Electron microscopic image of amniotic membrane in a scanning electron microscope. Epithelial surface of a lyophilized amniotic membrane preparation without preliminary impregnation with glycerol. Magnification x400.

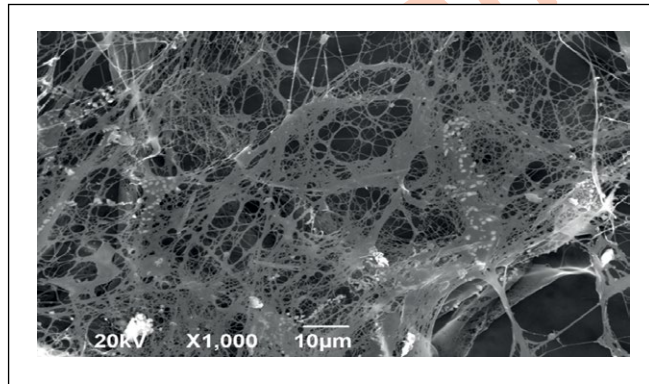


Рисунок 10. Электронно-микроскопическое изображение амниотической мембраны в сканирующем электронном микроскопе. Спонгиозный слой препарата лиофилизированной амниотической мембраны без предварительного пропитывания глицерином. Ув. x1000.

Figure 10. Electron microscopic image of amniotic membrane in a scanning electron microscope. Spongy layer of the preparation of lyophilized amniotic membrane without preliminary impregnation with glycerol. Magnification x1000.

гомогенную структуру. В слое фибробластов практически отсутствуют клеточные элементы. Единичные ядра разрушенных фибробластов представлены тенью в форме палочек. Конгломератов хроматина нет. Спонгиозный слой уплотнен. При морфометрии общей толщины препарата (n – 44) лиофилизированной амниотической мембраны без пропитывания глицерином получено среднее значение измерений – 10,026 мкм.

Сканирующая электронная микроскопия препаратов третьей группы консервированной амниотической мембраны: эпителиальный слой представлен незначительными фрагментами клеточных мембран и базальной мембраной, которая на большей части изучаемой поверхности десквамирована. При большем увеличении базальная мембрана представлена незначительными фрагментами, края которых свернуты и обнажен подлежащий стромальный слой (**рисунок 9**).

Спонгиозный слой у данной группы образцов менее всего поврежден. Коллагеновые волокна тонкие, разнонаправленные, рыхло расположенные. На данном препарате

четко прослеживается сквозная пористость биоматериала. Необходимо отметить наличие единичных гомогенных образований, прикрепленных к коллагеновым волокнам (рисунок 10).

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное гистологическое исследование амниотической мембраны показало значительные отличия морфологической картины в зависимости от предварительной (перед консервацией) обработки биоматериала. В тех случаях, когда децеллюляризация не проводилась и применялась методика высушивания над силикагелем, без этапов заморозки биоматериала, визуализировался эпителиальный слой с сохранными ядрами и мембранами клеток.

При изучении фрагментов АМ, подвергнутых процессу децеллюляризации путем воздействия низкочастотным ультразвуком, в второй и третьей группах наблюдаются полное разрушение клеточных структур и почти полное удаление клеточных компонентов. На гистологических препаратах отмечаются полное разрушение клеток эпителиального слоя и частичное повреждение базальной мембраны с обнажением стромы и формированием трабекулярной архитектоники биоматериала. Более выражены данные изменения в препаратах, которые не пропитывались глицерином перед лиофилизацией.

В децеллюляризованной ткани внеклеточный матрикс оставался неизменным. Набухания либо иных патологических изменений структуры, архитектоники, ориентации волокон, тинкториальных свойств соединительной ткани обнаружено не было.

Следовательно, физические методы воздействия на биологическую ткань ожидаемо оказывают влияние на жизнеспособность клеток и позволяют получить полностью децеллюляризованную амниотическую мембрану. Дополнительная обработка глицерином перед физическим воздействием на биологическую ткань с целью децеллюляризации значительного влияния на сохранность клеточных структур не оказывает. Следует лишь отметить, что в децеллюляризованной лиофилизированной АМ, пропитанной глицерином, больше сохраняется фрагментов мембран эпителиальных клеток и базальная мембрана также более сохранена.

■ ВЫВОДЫ

Разработанный нами метод децеллюляризации с использованием физических методов не вносит в обрабатываемый биоматериал каких-либо химических веществ, которые могут оказать непредсказуемое воздействие на регенерирующие ткани.

Консервация АМ методом лиофилизации позволяет получить морфологически целостный, эластичный и прочный биоматериал. ■

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ	ADDITIONAL INFORMATION
Источник финансирования. Работа выполнена по инициативе авторов без привлечения финансирования.	Study funding. The study was the authors' initiative without external funding.
Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с содержанием настоящей статьи.	Conflict of interest. The authors declare that there are no obvious or potential conflicts of interest associated with the content of this article.
Соответствие нормам этики. Исследование одобрено комитетом по биоэтике Самарского государственного медицинского университета (выписка из протокола №206 от 18 марта 2020 г.).	Compliance with Ethical Standards. The study was approved by the Bioethics Committee of Samara State Medical University (extract from protocol No. 206 dated March 18, 2020).
Участие авторов. К.Е. Кучук – обработка и консервация биоматериала, подготовка текста. Л.Т. Волова – разработка концепции и дизайна исследования, анализ полученных данных. И.В. Новиков – анализ полученных данных, подготовка текста. Е.С. Милудин – сбор материала, анализ полученных данных, редактирование текста. Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.	Contribution of individual authors. K.E. Kuchuk: processing and conservation of biomaterial, text preparation. L.T. Volova: development of the concept and design of the study, analysis of the obtained data. I.V. Novikov: analysis of obtained data, preparation of text. E.S. Milyudin: collection of material, analysis of obtained data, editing of text. The authors gave their final approval of the manuscript for submission, and agreed to be accountable for all aspects of the work, implying

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Meller D, Pires RT, Mack RJ, et al. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology*. 2000;107(5):980-9; discussion 990. DOI: [10.1016/s0161-6420\(00\)00024-5](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(00)00024-5)
2. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, et al. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2008;15:88-99. DOI: [10.22203/ecm.v015a07](https://doi.org/10.22203/ecm.v015a07)
3. Pollard SM, Aye NN, Symonds EM. Scanning electron microscope appearances of normal human amnion and umbilical cord at term. *Br J Obstet Gynaecol*. 1976;83(6):470-7. DOI: [10.1111/j.1471-0528.1976.tb00868.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1976.tb00868.x)
4. Adds PJ, Hunt CJ, Dart JK. Amniotic membrane grafts, "fresh" or frozen? A clinical and in vitro comparison. *Brit J Ophthalmol*. 2001;85(8):905-7. DOI: [10.1136/bjo.85.8.905](https://doi.org/10.1136/bjo.85.8.905)
5. Aleksandrova OI, Gavriluk IO, Mashel TV, et al. On preparation of amniotic membrane as a scaffold for cultivated cells to create corneal bioengineering constructs. *Saratov Journal of Medical*

- Scientific Research*. 2019;15(2):409-413. [Александрова О.И., Гаврилюк И.О., Машель Т.В., и др. К вопросу о подготовке амниотической мембраны в качестве скаффолда для культивируемых клеток при создании биоинженерных конструкций роговицы. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2019;15(2):409-413]. URL: <https://ofmntk.ru/files/upload/2019215.pdf>
6. Li H, Niederkorn JY, Neelam S, et al. Immunosuppressive Factors Secreted by Human Amniotic Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(3):900-907. DOI: [10.1167/iov.04-0495](https://doi.org/10.1167/iov.04-0495).
 7. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*. 2000;20(3):173-7. PMID: 10694891
 8. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2010;31(2):216-25. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2009.09.034](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.034)

9. Adds PJ, Hunt CJ, Dart JK. Amniotic membrane grafts, "fresh" or frozen? A clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(8):905-7. DOI: [10.1136/bjo.85.8.905](https://doi.org/10.1136/bjo.85.8.905)
10. Milyudin ES. Technology of preservation of the amniotic membrane by drying with silica gel. *Technologies of living systems*. 2006;3(3):44-49. (In Russ.). [Миллюдин Е.С. Технология консервации амниотической мембраны путем высушивания над силикагелем. *Технологии живых систем*. 2006;3(3):44-49].
11. Milyudin ES, Kuchuk KE, Bratko OV. Preserved amniotic membrane in a small tissue-engineering complex of the anterior corneal epithelium. *Perm Medical Journal*. 2016;33(5):47-54. [Миллюдин Е.С., Кучук К.Е., Братко О.В. Консервированная амниотическая мембрана в структуре тканеинженерного комплекса переднего эпителиального слоя роговицы. *Пермский медицинский журнал*. 2016;33(5):47-54]. DOI: [10.17816/pmj33547-53](https://doi.org/10.17816/pmj33547-53)
12. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*. 1995;14:473-484. PMID: [8536460](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8536460/)
13. Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, et al. Quantock Cultivation of Corneal Epithelial Cells on Intact and Denuded Human Amniotic Membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2000;41:2506-2513. PMID: 10937561
14. Lin CH, Hsia K, Su CK, et al. Sonication-Assisted Method for Decellularization of Human Umbilical Artery for Small-Caliber Vascular Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. 2021;13(11):1699. DOI: [10.3390/polym13111699](https://doi.org/10.3390/polym13111699)
15. Melkonyan KI, Rusinova TV, Kozmai YaA, Asyakina AS. Assessment of Nuclear Material Elimination by Different Methods of Dermis Decellularization. *Journal Biomed*. 2021;17(3E):59-63. [Мелконян К.И., Русинова Т.В., Козмай Я.А., Асякина А.С. Оценка элиминации ядерного материала при различных методах децеллюляризации дермы. *Биомедицина*. 2021;17(3E):59-63]. DOI: [10.33647/2713-0428-17-3E-59-63](https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-59-63)
16. Murphy SV, Skardal A, Nelson RA Jr, et al. Amnion membrane hydrogel and amnion membrane powder accelerate wound healing in a full thickness porcine skin wound model. *Stem Cells Transl Med*. 2020;9(1):80-92. DOI: [10.1002/sctm.19-0101](https://doi.org/10.1002/sctm.19-0101)
17. Startseva OI, Sinelnikov ME, Babayeva YuV, Trushenkova VV. Decellularization of organs and tissues. *Pirogov Russian Journal of Surgery*. 2019;(8):59-62. [Старцева О.И., Синельников М.Е., Бабаева Ю.В., Трущенко В.В. Децеллюляризация органов и тканей. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2019;(8):59-62]. DOI: [10.17116/hirurgia201908159](https://doi.org/10.17116/hirurgia201908159)
18. Tovpeko DV, Kondratenko AA, Astakhov AP, et al. Decellularization of organs and tissues as a key stage in the creation of biocompatible material. *Bulletin of the Military Innovation Technopolis "Era"*. 2023;4(4):342-346. [Товпеко Д.В., Кондратенко А.А., Астахов А.П., и др. Децеллюляризация органов и тканей как ключевой этап создания биосовместимого материала. *Вестник Военного инновационного технополиса «Эра»*. 2023;4(4):342-346]. DOI: [10.56304/S2782375X23040150](https://doi.org/10.56304/S2782375X23040150) EDN: IHEIWC