

УДК 576.31:576.08:616-08

DOI: 10.7868/S3034606126010055

АМНИОН КАК БИОМАТЕРИАЛ ДЛЯ НУЖД ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

А. А. Кондратенко^{1, 2, *}, Л. К. Шуршина¹, Е. М. Иванькова^{2, 3}, Д. В. Товпеко²,
В. Д. Кондратенко², Д. В. Рагузина², В. Е. Чернов^{2, 4}, В. М. Рябов⁵

¹ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,
Санкт-Петербург, 194100, Российская Федерация

² Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 195009, Российская Федерация

³ Филиал Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального
исследовательского центра «Курчатовский институт» — Институт высокомолекулярных соединений,
Санкт-Петербург, 199004, Российская Федерация

⁴ Агрофизический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург, 195220, Российская Федерация

⁵ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Российская Федерация

* E-mail: kondraa24@gmail.com

Аннотация. Обоснование. Благодаря таким описанным в литературе характеристикам, как биосовместимость, антибактериальные, противовоспалительные, антифибротические и иммуномодулирующие свойства, биоматериал амниона привлекателен для нужд тканевой инженерии и регенеративной медицины. Лиофилизация является надежным методом консервации биоматериала для его долгосрочного хранения, а также позволяет отсроченное использование без риска попадания в сероконверсионное окно и упрощает последующую обработку, но может повлиять на экстракцию белковых компонентов и биологические свойства. **Цель** настоящей работы — исследовать свойств лиофилизированного амниона человека. **Материал и методика.** Использовали гистохимические и иммуногистохимические методики. Оценивали влияние лиофилизированного амниона на жизнеспособность сфероидов фетальных мезенхимных клеток человека. Исследована биосовместимость лиофилизированной формы амниона на лабораторных животных. **Результаты.** Показано наличие аргирофильных волокон, изоформы А фактора роста эндотелия сосудов VEGFA, трансформирующего фактора роста TGFβ3 и фибронектина. Содержание коллагена и гликозаминогликанов в лиофилизированной ткани амниона составляет соответственно 157.26 ± 1.56 и 9.59 ± 1.55 мкг на 1 мг сухой ткани амниона. Показано отсутствие цитотоксического действия лиофилизированного амниона на сфероиды фетальных мезенхимных клеток в течение 72 ч. Биосовместимость лиофилизированной формы амниона показана при имплантации в разные участки тела лабораторных мышей. **Заключение.** Благодаря составу и биосовместимости лиофилизированный амнион является удобной формой хранения и последующего использования для нужд тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Ключевые слова: амниотическая мембрана, лиофилизация, биоматериал, тканевая инженерия, регенеративная медицина, биосовместимость, стволовые клетки, коллаген

Принятые сокращения: ЛА — лиофилизированный амнион; НА — нативный амнион; PBS и DPBS — фосфатно-солевой буферный раствор и PBS Дальбеко соответственно; ФМК — фетальные мезенхимные клетки; DAPI — 4',6-diamidino-2-phenylindole; HLA-G — антиген главного комплекса гистосовместимости (HLA) класса I; TGFβ3 — трансформирующий фактор роста β3; Tris — (hydroxymethyl)aminomethane; EDTA — 2,2',2''-(ethane-1,2-diylidinitrilo)tetraacetic acid; VEGFA — фактор роста эндотелия сосудов (изоформа А).

Финансирование. Работа выполнена за счет бюджета Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета. Дополнительного финансирования на проведение или руководство данным исследованием получено не было.

Соблюдение этических стандартов. Все манипуляции с животными проводили с соблюдением этических принципов, установленных Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Директива Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей). Эксперименты с участием животных и использованием биоматериала из плодных оболочек человека

одобрены независимым этическим комитетом при Военно-медицинской академии имени С. М. Кирова (Санкт-Петербург, Россия; протокол № 295 от 22 октября 2024 г.).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Кондратенко А. А., Шуршина Л. К., Ивановка Е. М., Товпеко Д. В., Кондратенко В. Д., Рагузина Д. В., Чернов В. Е., Рябов В. М. Цитология / Cell and Tissue Biology, 2026, том 69, № 1, с. 70. doi: 10.7868/S3034606126010055

Поступила в редакцию 04.09.2025
После доработки 02.11.2025
Принята к публикации 10.11.2025

DOI: 10.7868/S3034606126010055

Amniotic Membrane as a Biomaterial for Tissue Engineering Applications

A. A. Kondratenko^{a, b, *}, L. K. Shurshina^a, E. M. Ivankova^{b, c}, D. V. Tovpeko^b,
V. D. Kondratenko^b, D. V. Raguzina^b, V. E. Chernov^{b, d}, V. M. Ryabov^e

^a Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, 194100, Russian Federation

^b Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, 195009, Russian Federation

^c Branch of Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute of National Research Centre “Kurchatov Institute” –
Institute of Macromolecular Compounds, Saint Petersburg, 199004, Russian Federation

^d Agrophysical Research Institute, St. Petersburg, 195220, Russian Federation

^e Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 194064, Russian Federation

* E-mail: kondraa24@gmail.com

Abstract. Objective: Due to its well-described biocompatibility, antibacterial, anti-inflammatory, antifibrotic, and immunomodulatory properties, amnion biomaterial is attractive for tissue engineering and regenerative medicine. Lyophilization is a reliable method for preserving biomaterial for long-term storage and allows for delayed use without the risk of seroconversion. Lyophilization simplifies subsequent processing, but may impact the extraction of protein components and biological properties. **The aim** of this study was to investigate the properties of lyophilized human amnion. **Materials and Methods:** Amnion was examined using histochemical and immunohistochemical techniques. The effect of lyophilized amnion on the viability of human fetal mesenchymal cell spheroids was assessed. The biocompatibility of the lyophilized amnion was studied in laboratory animals. **Results:** The presence of argyrophilic fibers, vascular endothelial growth factor VEGEA, TGFβ3, and fibronectin was demonstrated. The collagen and glycosaminoglycan content of lyophilized amnion tissue was 157.26 ± 1.56 and 9.59 ± 1.55 μg per 1 mg of dry amnion tissue, respectively. Lyophilized amnion had no cytotoxic effect on fetal mesenchymal cell spheroids over 72 hours. The biocompatibility of lyophilized amnion was demonstrated by implantation into various body sites in laboratory mice. **Conclusion:** Due to its composition and biocompatibility, lyophilized amnion is a convenient form of storage and subsequent use for tissue engineering and regenerative medicine.

Keywords: amniotic membrane, lyophilization, biomaterial, tissue engineering, regenerative medicine, biocompatibility, stem cells, collagen

Funding. This work was supported by ongoing funding of Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia. No additional grants to carry out or direct this particular research were obtained.

Ethics approval and consent to participate. All animal experiments were conducted in compliance with the ethical principles established by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Directive 2010/63/EC of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes). Experiments involving animals and the use of biomaterial from human fetal membranes were approved by the independent Ethics Committee of the Kirov Military Medical Academy (Saint Petersburg, Russia; protocol no: 295 dated October 22, 2024).

Conflict of interest. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

For citation: Kondratenko A. A., Shurshina L. K., Ivankova E. M., Tovpeko D. V., Kondratenko V. D., Raguzina D. V., Chernov V. E., Ryabov V. M. Amniotic membrane as a biomaterial for tissue engineering applications. *Tsitologiya / Cell and Tissue Biology*, 2026. V. 68. no. 1, p. 70. doi: 10.7868/S3034606126010055

Received September 04, 2025

Revised November 02, 2025

Accepted November 10, 2025

При невозможности полного восстановления структуры и функции поврежденных органов и тканей трансплантация является единственным способом спасения жизни и восстановления здоровья пациента. Возможности использования аутотрансплантатов, аллотрансплантатов, ксенотрансплантатов, а также перспективы создания искусственных органов и стимулирования регенерации с использованием тканеинженерных конструкций являются направлениями развития трансплантологии (Gaharwar et al., 2020).

Стремительно развивающаяся технология биопринтинга (область тканевой инженерии) в качестве строительных блоков для построения биологических структур использует клетки, помещенные в поддерживающий гидрогель, имитирующий естественный внеклеточный матрикс (Bhattacharjee et al., 2022; Heidari et al., 2023; Munoz-Torres et al., 2023). Внеклеточный матрикс донорской соединительной ткани является одним из оптимальных для фабрикации таких гидрогелей (Sasikumar et al., 2019; Stepanovska et al., 2021). Для предотвращения реакций отторжения компонентов аллогенного происхождения иммунной системой реципиента широкое распространение получил метод удаления клеток, или децеллюляризация донорской ткани (Abaci, Guvendiren, 2020; Kim et al., 2020). Этот вид обработки показал перспективность, однако потери некоторых биоактивных компонентов при его использовании неизбежны (Sasikumar et al., 2019).

Амниотическая мембрана благодаря структуре и составу является часто используемым биоматериалом для нужд тканевой инженерии и регенеративной медицины (Arki et al., 2023; Fitriani et al., 2023; Jahanafrooz et al., 2023). Амнион использовали для реконструкции поврежденной кожи с начала XX века, он показал многообещающие результаты в восстановлении различных тканей, включая роговицу, сосуды, хрящи, матку и т. д. (Дубовиков и др., 2017; Horn et al., 2019; Lacorzana, 2020; Косова и др., 2023). Кроме того, плодные оболочки человека являются этически нейтральным и доступным источником биоматериала, так как утилизируются после родов (Haghshenas et al., 2022). Преимуществом амниона является потенциальная возможность использовать его без удаления клеток (Rahman et al., 2019; Murphy et al., 2020; Jhumi et al., 2023). В состав коммерческих изделий на основе амниона, предназначенных для имплантации реципиенту (AmniEffect, EpiFix, AmniFix, AmniBurn и AmnioExcel Plus, AmnioBarrier), может входить даже хорион, содержащий большее количество чужеродного генетического материала.

Технологии изготовления гидрогелей сопряжены с едиными требованиями к безопасности, качеству сырья и его транспортировке, обеспечивающими воспроизводимость и надежность результатов. В связи с этим возникает необходимость придания сырью удобной формы для долгосрочного хранения и обработки биоматериала (Jirsova, Jones, 2017; Fenelon et al., 2018). В свою очередь методы подготовки и консервации амниона могут существенно

повлиять на состав и биологические свойства (Gan et al., 2017; Gholipourmalekabadi et al., 2020).

Цель нашей работы заключалась в исследовании биологических свойств лиофилизированного амниона человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объекты исследований. Биоматериал амниона получали после самопроизвольных родов женщин с их информированного согласия. Для исследований использовали образцы фиксированного не менее 12 ч 10 %-ным забуференным формалином («Биовитрум», Россия), а также лиофилизированного амниона (ЛА). Для изготовления ЛА в течение часа после родов амнион замораживали при -20°C в холодильнике ХМ 4009-022 (Atlant, Белоруссия) в одноразовом медицинском стерильном полипропиленовом контейнере с маркировкой. После размораживания при комнатной температуре измельчали блендером MSM67160 (Bosch, Германия) и отмывали дистиллированной водой 6 ч в настольном инкубаторе-шейкере BS3021 (Senova, Китай) при 130 об/мин и комнатной температуре. Далее материал инкубировали в течение 24 ч в растворе пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (0.1 мг/мл) («Биолот», Россия) на дистиллированной воде при 4°C . После ополаскивания дистиллированной водой биоматериал лиофилизировали в лабораторной лиофильной сушилке VaCo 5 II (ZIRBUS technology, Германия). Степень обезвоживания регистрировали по потере массы образцов, хранили полученный материал при 4°C .

Биосовместимость фиксированного амниона и ЛА оценивали *in vitro* на сфероиде фетальных мезенхимных клеток (ФМК) человека и *in vivo* на беспородных белых мышах. ФМК были получены из Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Культура охарактеризована по всем основным параметрам (Крылова и др., 2012) в соответствии с минимальными требованиями Международного общества клеточной терапии, определяющими ее принадлежность к мезенхимным стромальным клеткам (Dominici et al., 2006).

ФМК культивировали до получения монослоя в среде DMEM/F12, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина («Биолот», Россия) во флаконах 25 см^2 с адгезивной поверхностью (TPP, Швейцария). Далее клетки открепляли в течение 3 мин, используя растворы трипсина (0.25 %) и Версена (0.02 %) в соотношении 1:3 («Биолот», Россия). Клетки по 5×10^4 в 100 мкл культуральной среды вносили в лунки 96-луночного необработанного планшета (Guangzhou JET Bio-Filtration Co., Китай) и культивировали при 37°C и 5 % CO_2 в инкубаторе (Eppendorf AG 22331 New Brunswick S41i, Германия) для формирования сфероидов.

Мыши были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово» РАН. Использовали мышей обоего пола 3–4-месячного возраста массой 22 ± 1.5 г в равных количествах. Содержали животных с соблюдением

этических и правовых норм проведения работ с экспериментальными животными в стандартных условиях в полипропиленовых клетках (площадь пола 47 × 30 см) по 10 особей одного пола со свободным доступом к воде и пище (корм DELTA FEEDS для лабораторных крыс и мышей ЛБК 120 С-19; «БиоПро», Новосибирск). Световой режим составлял 12 ч света и 12 ч темноты. В качестве подстилки использовали древесные опилки. Наблюдения за состоянием животных проводили ежедневно.

Гистологические исследования амниона. Образцы фиксированного в формалине амниона и ЛА после стандартной проводки в изопропиловых спиртах восходящей концентрации («Биовитрум», Россия) заливали в парафин («Биовитрум», Россия). Изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм, используя автоматический ротационный микротом с системой для переноса срезов (HM 355S; Thermo Fisher Scientific, Германия) и окрашивали анилиновым синим по Массону для выявления коллагеновых волокон («Биовитрум», Россия). Для идентификации в ткани амниона гликозаминогликанов срезы окрашивали 1 %-ным раствором альцианового синего в 0.1 н HCl pH 1.0 по инструкции производителя («Биовитрум», Россия). Для идентификации аргирофильных структур использовали набор «Импрегация серебром в аммиаке» по инструкции («Биовитрум», Россия). Результаты визуализировали на микроскопе Axio Imager A2, оснащенного цифровой камерой AxioCam 506 color (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Для иммуногистохимических исследований использовали срезы парафиновых блоков толщиной 3–4 мкм на стеклах с адгезивным покрытием (Citiglas, Китай). После депарафинирования проводили демаскировку антигенов в буферном растворе Tris-EDTA pH 9.0 (Diagnostic BioSystems, США) или 0.01 М цитрата натрия pH 6.0 в микроволновой печи при максимальной мощности в течение 3 мин, а при низкой мощности — 8 мин. Для промывания использовали фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) pH 7.4 («Биолот», Россия). Блокировали активность эндогенной пероксидазы 3 %-ным раствором перекиси водорода в течение 20 мин при комнатной температуре («ЮжФарм», Россия) и неспецифическое связывание с помощью background blocker (Diagnostic BioSystems, США) в течение 60 мин при 37 °C в суховоздушном термостате TC-1/20 СПУ (Смоленское специальное конструкторско-технологическое бюро систем программного управления, Россия).

Инкубацию с антителами против фактора роста эндотелия сосудов А (VEGFA) (моноклональные мыши MHD12601 в разведении 1:50 и против трансформирующего фактора роста TGFβ3 (моноклональные мыши MAV949Hu22, 1:50 (Cloud-clone Corp., Китай), а также против фибронектина (поликлональные кролика AF0738, 1:50, Affinity Biosciences, Китай) проводили в течение 1 ч при 37 °C и ополаскивали PBS. Для разбавления антител использовали разбавитель primary antibody diluent (Diagnostic BioSystems, США). Для визуализации TGFβ3 и фибронектина в фиксированном амнионе и ЛА препараты

инкубировали с вторыми антикरोлическими или антимиоциновыми антителами, конъюгированными с AlexaFluor 488 (SAA544Rb11 или SAA544Mu11, 1:1000, Cloud-Clone Corp., Китай) в течение 40 мин при комнатной температуре. Ядра контрастировали готовым раствором для нуклеиновых кислот (IS008-DAPI, Cloud-Clone Corp., Китай). Учет реакций проводили на микроскопе EVOS M5000 (Invitrogen, США). Для визуализации VEGFA в амнионе и ЛА использовали вторые меченные биотинном козы антимиоциновые антитела с системой усиления сигнала и набором вспомогательных реагентов (IS086; Cloud-clone Corp., Китай). Учет выявления коричневого продукта при окислении хромогена диаминобензидаина проводили на микроскопе Axio Scope A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Содержание общего коллагена в ЛА человека оценивали спектрофотометрически по содержанию гидроксипролина (Игнатъева и др., 2007). Для этого образцы ЛА (до 10 мг) подвергали гидролизу в 1 мл 6 М HCl при 120 °C в течение 6 ч с последующим высушиванием при 99 °C в термостате «Термит» («ДНК-технология», Россия) в пробирках 2 мл с внешней резьбой («Росмедбио», Россия). Сухой остаток растворяли в 1 мл дистиллированной воды и определяли содержание гидроксипролина взаимодействием с реактивом Эрлиха. Для окисления гидроксипролина к образцам (калибровочным и экспериментальным) добавляли по 100 мкл 1 %-ного хлорамина Т («Ленреактив», Россия) в ацетатном буфере pH 6.0, встряхивали на высокоскоростном шейкере (BioSan MPS-1, Латвия) и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Далее добавляли по 100 мкл 3.15 М HClO₄ («Ленреактив», Россия), взбалтывали и по истечении 5 мин добавляли по 100 мкл 20 %-ного раствора пара-диметиламинобензальдегида («Диаэм», Россия) в этилцеллозольве («Экос-1», Россия), взбалтывали, и инкубировали при 60 °C в течение 20 мин. Затем охлаждали в течение 5 мин при комнатной температуре и добавляли по 500 мкл этилцеллозольва до суммарного объема 1 мл. По 200 мкл надосадочной жидкости переносили в 96-луночные планшеты. Оптическую плотность стандартов, холостых реактивов и анализируемых образцов измеряли с помощью микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) при длине волны 558 нм.

Содержание гидроксипролина в анализируемых образцах оценивали по калибровочной прямой, для построения которой использовали сверхчистый порошок L-гидроксипролина (Sisco Research Laboratories, Индия). Данные представлены средними значениями и их стандартными отклонениями в мкг на 1 мг сухого веса ткани. Оценку содержания общего коллагена по гидроксипролину осуществляли исходя из того, что массовая доля гидроксипролина в молекуле коллагена составляет в среднем 13 %, что соответствует данным из литературы (Игнатъева и др., 2007).

Определение содержания гликозаминогликанов. Образцы ЛА (до 10 мг) растворяли с помощью протеиназы К (44 ед/мг; МEBEP Bio Science, Китай) в 50 мМ Tris-HCl

(рН 7.6; 1:50), перемешивали и оставляли на ночь при 56 °С. Затем анализируемые образцы центрифугировали при 12 000 g в течение 10 мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия). К надосадочной жидкости добавляли два объема 4%-ного ацетата натрия в 96%-ном этаноле («Ленреактив», Россия). Центрифугировали при 12 000 g в течение 5 мин. К осадку добавляли 1 мл дистиллированной воды и экстрагировали сульфатированные гликозаминогликаны в течение 30 мин при комнатной температуре. Отбирали аликвоту надосадочной жидкости с таким расчетом, чтобы предполагаемая конечная концентрация сульфатированных гликозаминогликанов была от 1 до 10 мкг на лунку, что соответствует линейности спектрофотометрического определения. Затем к стандартам, холостому реактиву и анализируемым образцам добавляли 250 мкл 0.01%-ного альцианового синего 8GX (PanReac AppliChem, Испания) в 0.1 М HCl (рН 1.5) и инкубировали в течение ночи на орбитальном шейкере (220 об/мин) при комнатной температуре. После центрифугирования при 12 000 g в течение 10 мин удаляли надосадочную жидкость и к осадку добавляли 250 мкл 6 М HCl с последующим инкубированием в течение 30 мин и постоянном перемешивании на орбитальном шейкере при комнатной температуре. По 200 мкл на лунку полученных растворов переносили в 96-луночные планшеты. Оптическую плотность стандартов, холостых реактивов и анализируемых образцов измеряли на микропланшетном ридере CLARIOstar при длине волны 615 нм. Содержание гликозаминогликанов в анализируемых образцах оценивали по калибровочной прямой, для построения которой использовали хондроитин сульфат натрия (Sigma Aldrich, США); данные представлены средними значениями и их стандартными отклонениями в мкг на 1 мг сухого веса ткани.

Влияние ЛА на жизнеспособность сфероидов ФМК. После внесения суспензии ФМК в лунки 96-луночного планшета для формирования сфероидов в половину лунок вносили образцы ЛА, но не измельченного (5 × 5 мм). Спустя 24, 48 и 72 ч спонтанно сформировавшиеся сфероиды окрашивали 1 мкМ раствором ацетоксиметилового эфира кальцеина («Ленреактив», Россия) в DPBS («Биолот», Россия) и раствором йодистого пропидия (5 мкг/мл на цитратно-солевом буфере) по 15 мин последовательно и дважды промывали DPBS. Кальцеин проникает сквозь мембрану и гидролизует эндогенными эстеразами жизнеспособных клеток, в то время как йодистый пропидий окрашивает мертвые клетки. Результаты визуализировали на микроскопе EVOS M5000 (Invitrogen, США).

Сканирующая электронная микроскопия. Для визуализации поверхности и размеров сфероидов спустя 7 сут культивирования их фиксировали 12 ч в 2%-ном глутаровом альдегиде, пятикратно промывали в DPBS по 30 мин, инкубировали последовательно в 5 порциях 96%-ного этилового спирта («Гиппократ», Россия), высушивали на воздухе, напыляли слой золота с помощью напылителя Q 150T ES (Quorum Technology Ltd.,

Англия) и исследовали на микроскопе Merlin (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Оценка биосовместимости *in vivo*. Мыши ($n = 70$) были разделены случайным образом на 7 групп по 10 особей в каждой: 1 — подкожная имплантация нативного амниона человека; 2 — подкожная имплантация ЛА; 3 — двукратная подкожная имплантация ЛА; 4 — трехкратная подкожная имплантация ЛА; 5 — внутримышечная имплантация нативного амниона; 6 — внутримышечная имплантация ЛА; 7 — внутрикостная имплантация ЛА. Использовали образцы ЛА весом 0.0001 г или нативного амниона размером 1 × 1 см.

Для наркоза мышей использовали золетил 100 (50 мг/кг (Virbac, Франция). Для подкожной имплантации после удаления шерсти и обработки 70%-ным водным раствором этилового спирта в области холки делали надрез скальпелем (Volkmann, Индия) длиной 1 см на всю глубину кожи. В образовавшийся карман помещали образцы ЛА или нативного амниона. При двукратной и трехкратной имплантации образцы ЛА помещали под кожу в той же области ранее оперированным мышам с интервалом 30 сут. Для внутримышечной имплантации также после удаления шерсти и обработки спиртом на медиальной поверхности бедра делали надрез кожи (1 см) на всю глубину, далее офтальмологическим пинцетом J-16-131 (Surgicon, Пакистан) раздвигали мышцы *musculus biceps femoris* и помещали образцы ЛА или нативного амниона. Для внутрикостной имплантации после удаления шерсти и обработки спиртом делали разрез латеральной поверхности кожи голени размером 1.5 см. Пинцетом разъединяли мышцы голени, гравером электрическим DC-12VA (Китай) высверливали отверстие в кости *os tibia* бором диаметром 2 мм и пуговчатым хирургическим зондом J-23-028 (Surgicon, Пакистан) тампонируют ЛА в костномозговой канал. Все раны послойно ушивали хирургической нитью prolene 7-0 (Ethicon, Шотландия). Спустя 14, 28 и 40 сут после операций животных (по $n = 3-4$ в каждой группе) умерщвляли передозировкой паров диэтилового эфира («Ленреактив», Россия), ткани области имплантации фиксировали в нейтральном забуференном формалине. После стандартной гистологической обработки изготавливали гистологические срезы толщиной 4—5 мкм и окрашивали по Массону («Биовитрум», Россия). Для визуализации местной реакции тканей животных в областях имплантации образцов использовали микроскоп Axio Imager A2 с камерой AxioCam 506 color (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование амниона. Окрашивание гистологических препаратов фиксированного амниона и ЛА анилиновым синим по Массону показало содержание коллагена в структуре ткани (рис. 1а, б). Окрашивание альциановым синим подтвердило содержание гликозаминогликанов в нативном амнионе и ЛА (рис. 1в, г). Насыщение

препарата аммиачным раствором серебра показало присутствие коллагеновых волокон, окрашенных в коричневый цвет, и черных аргирофильных волокон в нативном амнионе и ЛА (рис. 1*д, е*). Основным компонентом сетчатой структуры амниона является коллаген, обеспечивающий устойчивость и упругость оболочки. Суммарное содержание коллагенов составило 157.26 ± 1.56 мкг, а содержание гликозаминогликанов — 9.59 ± 1.55 мкг на 1 мг сухой ткани амниона. Клетки амниотического эпителия являются продуцентами биологически активных веществ.

Иммуногистохимически показано наличие в биоматериале амниона и ЛА факторов VEGFA (рис. 2*а, б*), TGF β 3 (рис. 2*в, г*) и фибронектина (рис. 2*д, е*).

Биосовместимости лиофилизированной ткани амниона человека *in vitro* и *in vivo*. Не было обнаружено цитотоксических свойств ЛА по отношению к ФМК. Образование сфероидов ФМК в присутствии ЛА и контроле не различалось (рис. 3). Сфероиды ФМК на протяжении трех суток эксперимента окрашивались витальным красителем кальцеином и не окрашивались йодистым пропидием

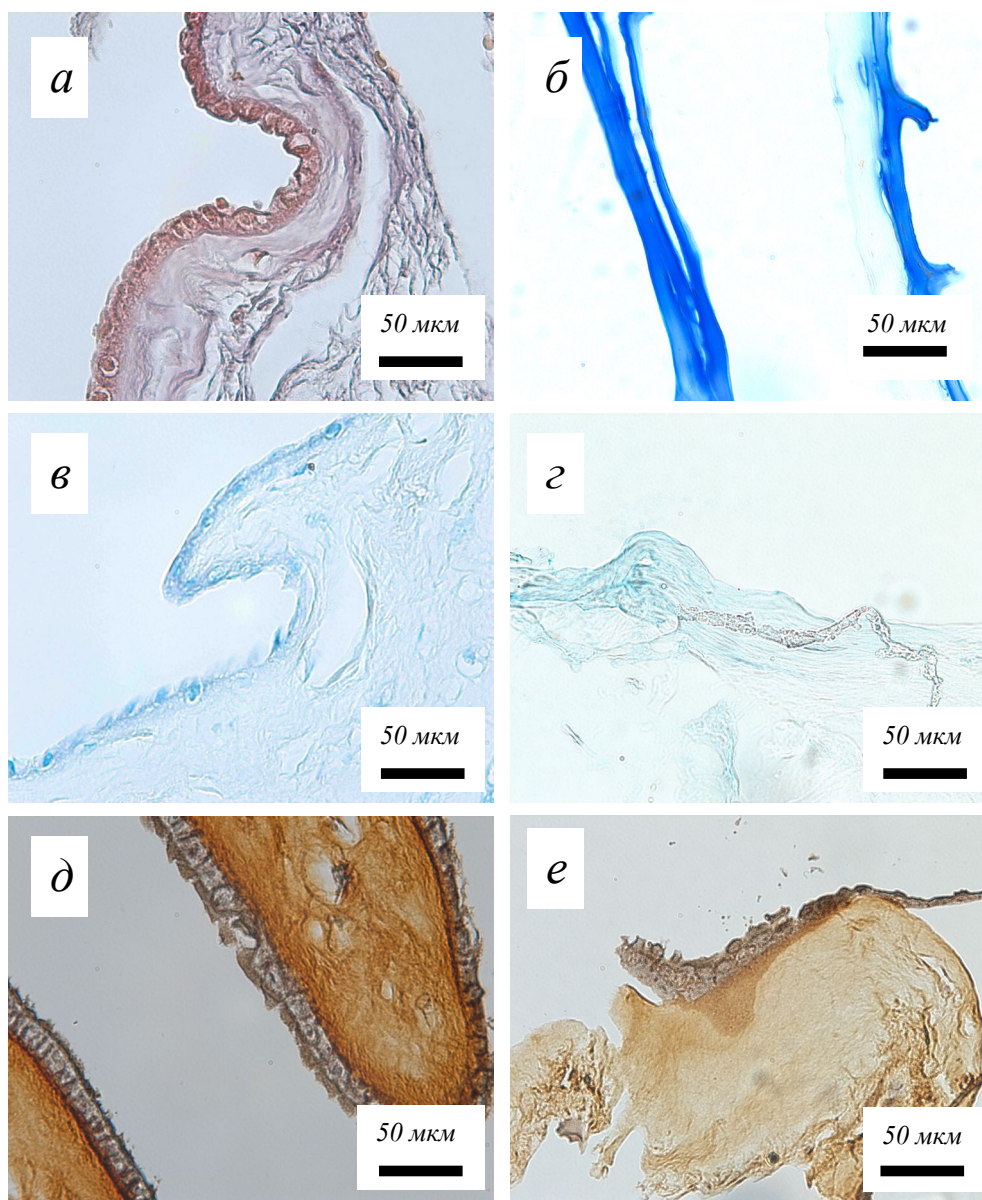


Рис. 1. Гистологические срезы нативного фиксированного (*а, в, д*) и лиофилизированного (ЛА; *б, з, е*) амниона. Световая микроскопия. Окрашивание анилиновым синим по Массону для демонстрации коллагена (*а, б*), 1%-ным раствором альцианового синего рН 1.0 для выявления гликозаминогликанов (*в, з*) и импрегнация серебром в аммиаке для идентификации аргирофильных структур (*д, е*) в структуре ткани

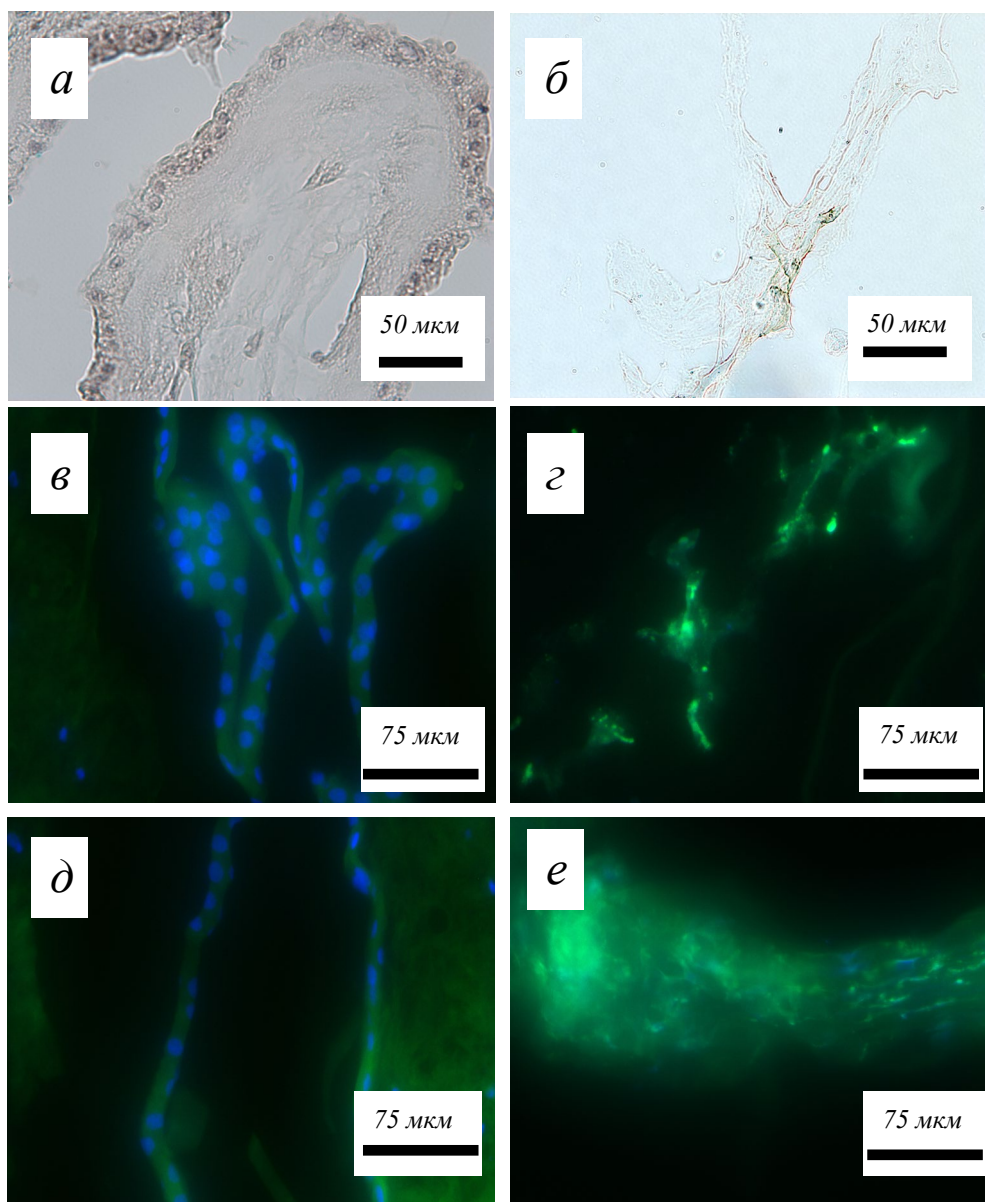


Рис. 2. Выявление специфических маркеров (фактора роста эндотелия сосудов VEGFA, трансформирующего фактора роста TGFβ3 и фибронектина) в амнионе фиксированном (*a, в, д*) и лиофилизированном (ЛА; *б, з, е*). Иммуногистохимия. Использовали: моноклональные антитела к фактору роста эндотелия сосудов (VEGFA) с визуализацией продукта реакции перекисным окислением диаминобензидина (*a, б*); моноклональные антитела к трансформирующему фактору роста (TGFβ3) с визуализацией флуоресцентным красителем и контрастированием ядер DAPI (*в, з*); поликлональные антителами к фибронектину с визуализацией флуоресцентным красителем и контрастированием ядер DAPI (*д, е*)

(рис. 3а–з). Следовательно, можно утверждать, что сфероиды состояли из жизнеспособных клеток. На фотографии рядом со сфероидом, формирование которого происходило в присутствии ЛА, визуализируются клетки, окрашенные йодистым пропидием (рис. 3з). Очевидно, что это амниотический эпителий, поскольку для данного эксперимента использовали сублимированный, но не децеллюляризованный амнион. На снимках

сканирующей электронной микроскопии визуализируются клеточные контрольные сфероиды диаметром 309.8–323.7 мкм (рис. 3д). Диаметр сфер, культивированных в присутствии ЛА, измерить трудно, поскольку в процессе пробоподготовки сфероиды оказались внутри покрывающего их образца ЛА (рис. 3е).

Наблюдения за животными на всем протяжении экспериментов при имплантации ЛА и нативного амниона

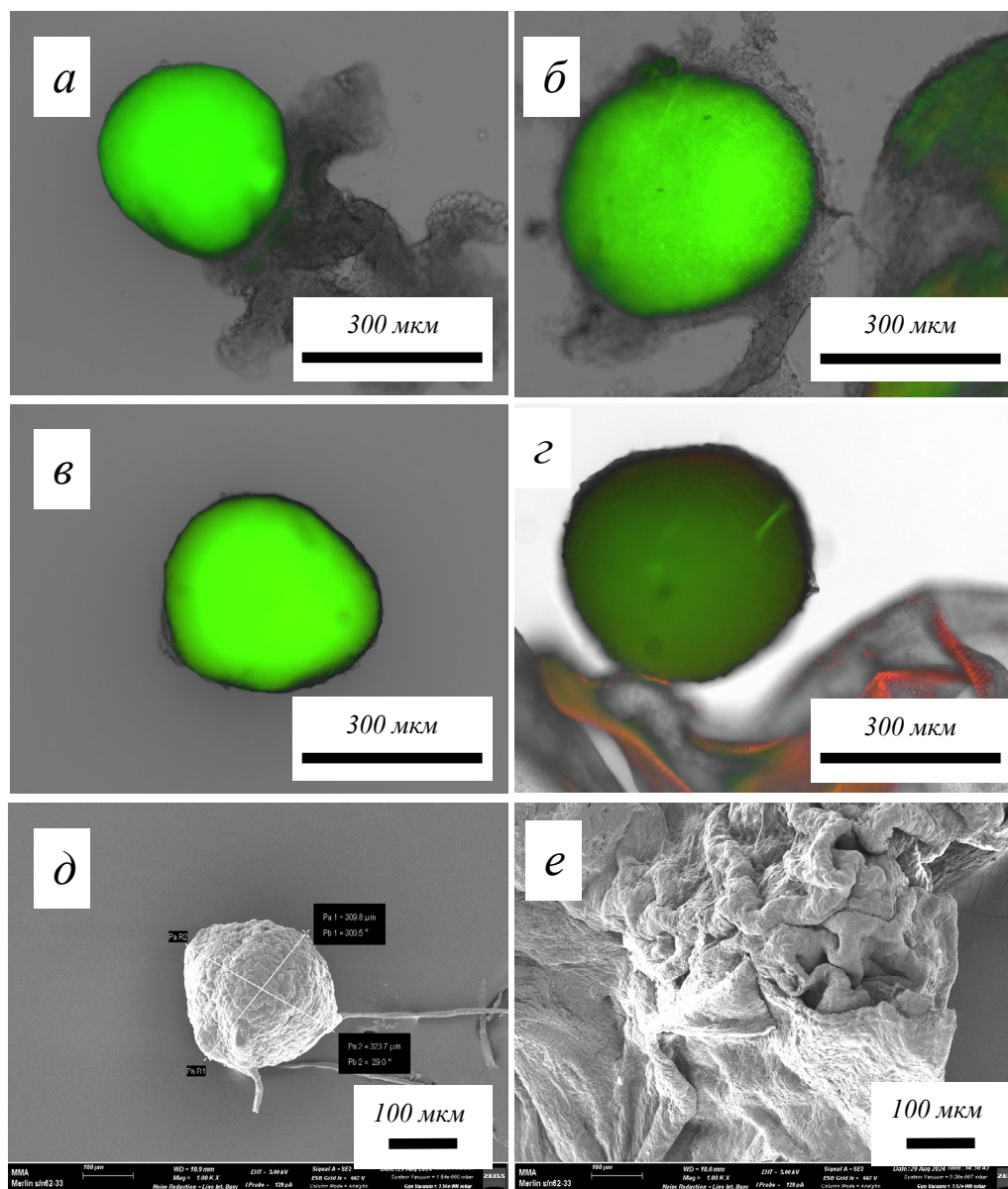


Рис. 3. Визуализация сфероидов фетальных мезенхимных клеток спустя 24 (*a, б*) и 72 (*в–е*) ч. Формирующиеся сфероиды в контроле (*a, в, д*) и в присутствии лиофилизированного амниона (ЛА) (*б, г, е*). *a–г* — Флюоресцентная микроскопия: зеленая окраска кальцеином (жизнеспособные клетки сфероидов), красная — йодидистым пропидием (погибшие клетки). *д, е* — Сканирующая электронная микроскопия: показан диаметр контрольного сфероида (*д*) и микроструктура поверхности ЛА (*е*), сфероид находится внутри

в разные участки тела не выявили признаков их угнетенного состояния, истощения и облысения, признаков появления язв на коже, выделений из глаз, дерматита, энтерита и колита. Внешних признаков гиперемии и интенсивных воспалительных реакций в областях имплантации также выявлено не было. При внутримышечной имплантации нативного амниона спустя 14 сут визуализируется многократно сложенный образец (рис. 4*a*). Между амнионом и мышцами мыши формируется тонкая прослойка

рыхлой соединительной ткани, а также визуализируются адипоциты (рис. 4*a*, черная звездочка). Клетки вытянутой формы с уплощенными ядрами мигрируют в толщу имплантата. Обильной лимфоцитарно-макрофагальной воспалительной инфильтрации в имплантированном нативном амнионе и окружающих его мышцах реципиента не выявлено (см. рис. 4*a*).

При имплантации в мышечную ткань мышей ЛА спустя две недели также формируется тонкая прослойка

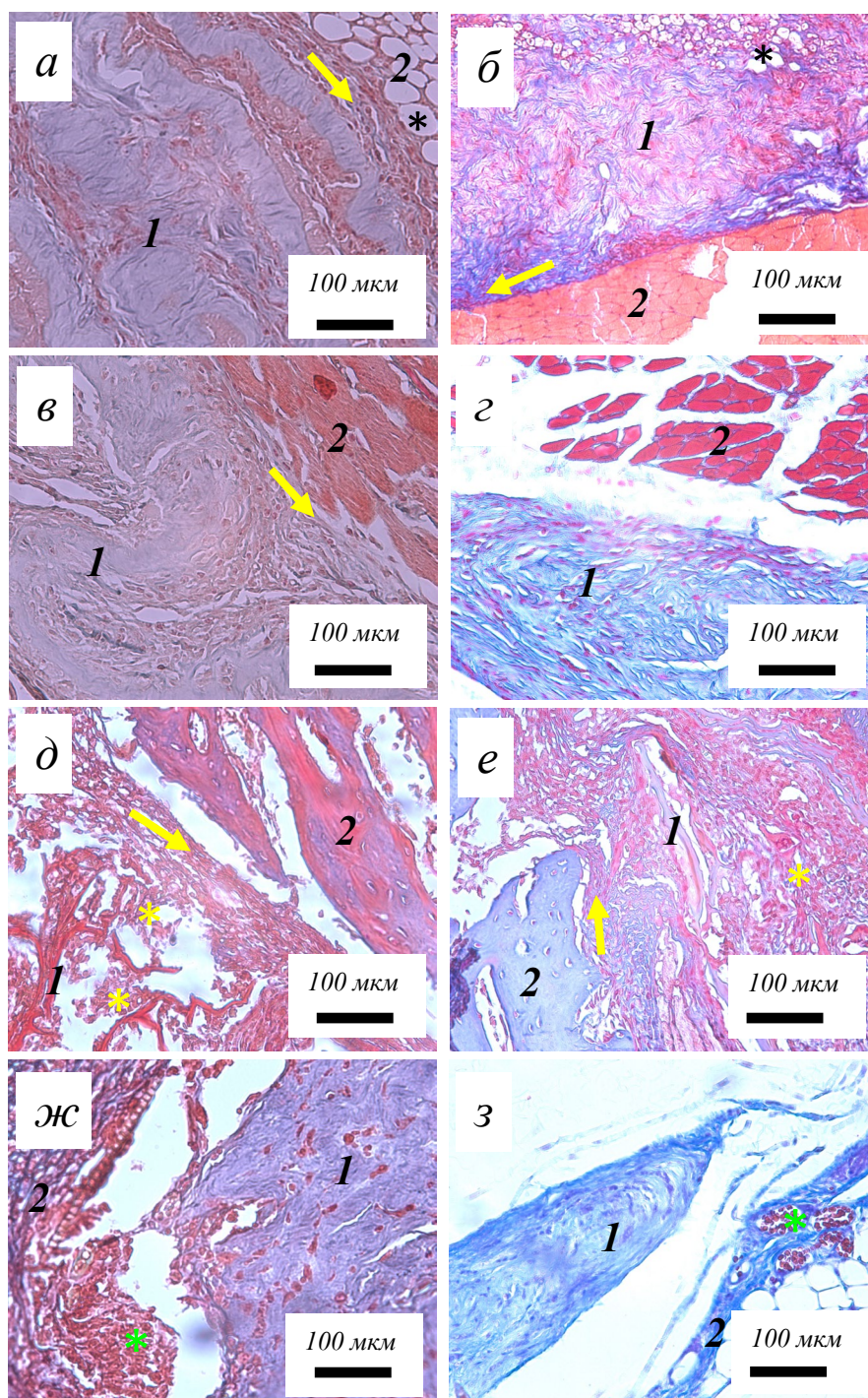


Рис. 4. Гистологические срезы тканей лабораторных мышей из областей имплантации образцов амниона нативного (НА) и лиофилизированного (ЛА). *а–г* — Внутримышечная имплантация: НА (*а*) и ЛА (*б*) спустя 14 сут; НА (*в*) и ЛА (*г*) спустя 28 суток. *д, е* — Внутрикостная имплантация ЛА спустя 14 и 40 сут соответственно. *ж* — Двукратная подкожная имплантация ЛА спустя 14 сут после второй операции; *з* — трехкратная подкожная имплантация ЛА спустя 14 сут после третьей операции. *1* — образец НА или ЛА; *2* — ткани реципиента области имплантации; *желтая стрелка* — формирующаяся грануляционная ткань; *черная звездочка* — жировая ткань; *желтая звездочка* — гемопоэтические клетки разной степени дифференцировки между волокнами соединительной ткани; *зеленая звездочка* — формирующиеся кровеносные сосуды. Световая микроскопия, окраска по Массону

грануляционной ткани, не имеющая четкой границы с имплантатом. В толще образца ЛА визуализируются клетки фибробластоподобной морфологии, в центре имплантата обнаруживаются адипоциты (рис. 4б). Спустя четыре недели после внутримышечной имплантации нативного амниона визуализируется частично резорбированный образец, оплетенный тонкими прожилками рыхлой соединительной ткани (рис. 4в). Имплантированный ЛА в мышцы мыши спустя 28 сут подвергается активному замещению соединительной тканью (рис. 4г). Спустя 4 недели от имплантации двух видов образцов амниона в мышцы нет признаков воспалительной инфильтрации лейкоцитами (см. рис. 4в, г).

При тампонировании ЛА в дефект *os tibia* мышцей материал сразу пропитывался кровью за счет гидрофильной структуры и высокого содержания коллагена и плотно фиксировался. Несмотря на непосредственный контакт ЛА с клетками костного мозга мышцей, животные не проявляли внешних признаков ухудшения состояния. Как видно на рис. 4д, спустя 14 сут после операции между костными балками мыши и имплантированным ЛА формировалась рыхлая соединительная ткань, в ячейках которой визуализируется большое количество кровеносных клеток (см. рис. 4д, желтая звездочка).

Изучение влияния непосредственного контакта с ЛА на дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток не входило в задачи данной работы и является областью будущих исследований. Внутрикостная имплантация ЛА через 40 сут после операции также показала схожие изменения с большей резорбцией образца (рис. 4е).

При подкожной имплантации образцов амниона и ЛА кожа над областью операций оставалась подвижной и не имела признаков гиперемии и отека. Для сокращения периода индукции высвобождения цитокинов активированными Т-лимфоцитами памяти реципиента и выявления вероятности влияния циркулирующих антител, образовавшихся при первой имплантации, были предприняты повторные подсадки ЛА под кожу лабораторным мышам двукратно и троекратно с интервалом 30 сут. Спустя 14 сут после последней имплантации обнаружить первые образцы ЛА не удалось. Как видно на рис. 4ж и 4з, последние имплантированные образцы ЛА подвергались интенсивной перестройке с прорастанием грануляционной тканью без признаков фиброобразования. Лимфоцитарно-макрофагальной реакции на многократное внедрение чужеродного биоматериала не наблюдали. Вокруг образцов ЛА формируются тонкостенные кровеносные сосуды, заполненные кровью (см. рис. 4ж, з, зеленая звездочка). Многоядерных клеточных элементов, напоминающих гигантские многоядерные клетки инородных тел, обнаружено не было.

Полученные нами результаты показывают безопасность биодеградируемого биоматериала ЛА для нужд тканевой инженерии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Лиофилизация или сублимационная сушка является надежным методом консервации биоматериала для его длительного хранения. Высушивание биоматериала позволяет отсроченное использование без риска попадания в сероконверсионное окно и упрощает последующую обработку (Jirsova, Jones, 2017). Однако высушивание амниона может повлиять на экстракцию из него белковых компонентов и факторов роста по сравнению с нативными или криоконсервированными образцами (Gan et al., 2017; Gholipourmalekabi et al., 2020).

С помощью гистологического окрашивания и иммуногистохимии мы показали, что основную массу амниона составляют коллагены, а также в нем содержатся аргирофильные волокна, гликозаминогликаны разной степени сульфатированности, факторы роста и фибронектин. Однако данные о количестве коллагена и гликозаминогликанов, полученные нами, не согласуются с результатами других исследователей. Например, сообщается, что содержанию коллагена и гликозаминогликанов на 1 мг сухого веса амниона составляет соответственно 313.50 ± 27.89 и 7.20 ± 1.66 мкг (Tan et al., 2025) или 14.10 ± 0.50 и 13.40 ± 5.30 мкг (Galvez et al., 2025), или 63.40 ± 8.20 и 115.60 ± 7.40 мкг (Milan et al., 2020).

Столь разные данные о содержании структурных компонентов ткани амниона человека, полученные нами и другими авторами, вероятно, можно объяснить отсутствием стандартных методов пробоподготовки образцов и измерений. Тем не менее можно утверждать, что такой метод консервации (лиофилизация) и хранения оправдан для использования биологически-активных молекул, фиксированных в структурных компонентах амниона. Сублимированная форма позволяет использовать биоактивные компоненты, синтезированные клетками амниона, без предварительного культивирования клеточной массы (Marsit et al., 2014). К тому же было показано, что измельчение высушенного амниона обеспечивает высвобождение белковых компонентов и факторов роста (Russo et al., 2012; Jahanafrooz et al., 2023).

В свою очередь, концентрация коллагена в гидрогеле оказывает наибольшее влияние на функциональность чернил для биопечати. Чаще всего используют гидрогели с концентрацией коллагена от 5 до 20 мг/мл (Исаева и др. 2021; Stepanovska et al., 2021). Гидрогели с меньшей концентрацией коллагена обладают низкими свойствами механической прочности и термостабильности, а гели с высоким содержанием коллагена имеют неоднородную структуру и препятствуют пролиферации помещенных в них клеток. Вязкость гидрогеля влияет на передачу внутриклеточных сигналов, следовательно и на дифференцировку и фенотип клеток. Наиболее оптимальной основой чернил для биопечати является коллаген без примесей, хотя их влияние на формирование и свойства коллагеновых гидрогелей систематически не изучалось и не анализировалось (Stepanovska et al., 2021).

Как источники коллагена биоматериалы с высоким его содержанием (например, сухожилия, тела гидробионтов и др.) имеют очевидные преимущества (Kim et al., 2020; Куликова и др., 2024). Коллаген, извлеченный методами гидролитического расщепления тканей, обладает оптимальными параметрами гелеобразования (Kim et al., 2020; Исаева и др., 2021; Kafili et al., 2024). Высушенную ткань амниона, содержащую биологически-активные вещества, целесообразнее использовать в качестве дополнительного компонента (Rahman et al., 2019; Murphy et al., 2020; Jhumi et al., 2023). Тем не менее и в этом случае возможны сложности. Так, добавление порошкообразного амниона к коллагеновому концентрату ухудшает параметры его гелеобразования (Lee et al., 2020). Использование экстрактов или микронизированных форм ткани амниона является возможной альтернативой решению данных проблем (Murphy et al., 2020; Elkhennany et al., 2022; Li et al., 2022; Heidari et al., 2023).

Для создания тканевых эквивалентов необходимой высоты и прочности зачастую невозможно обойтись без использования поддерживающих материалов и/или последующего сшивания коллагена, что может негативно отразиться на биосовместимости (Stepanovska et al., 2021). Для снижения цитотоксического эффекта при таком виде обработки использование компонентов амниона также может быть оправдано (Deus et al., 2022; Kafili et al., 2023; Bakhtiar et al., 2023). Еще одним возможным вариантом амниона для его применения может быть его высушенная и/или измельченная форма в качестве непосредственно контактирующего с тканями реципиента слоя на формообразующем каркасе (Chen et al., 2018; Peng et al., 2020; Lei et al., 2020; Zhang et al., 2021; Comperat et al., 2023). Плотное прилегание к раневой поверхности способствует уменьшению боли и вторичной альтерации и инфицирования, снижая вероятность гипертрофического рубцевания. Функциональная активность амниона, контактирующего с поврежденной тканью, ускоряет образование грануляционной ткани и естественное очищение от некротизированных тканей посредством фагоцитоза с максимальной эффективностью (Ragazzo et al., 2022; Sacco et al., 2023; Nussein et al., 2025).

Использование клеточных сфероидов для трехмерной биопечати оправдано, поскольку при внесении клеточной массы в таком виде в гидрогель создаются оптимальные условия гелеобразования каркасного материала, а также необходимый уровень межклеточного взаимодействия (Лазарев и др., 2021; Stepanovska et al., 2021; Кораблев

и др., 2023). Мы не обнаружили цитотоксического действия лиофилизированного амниона на образование, рост и жизнеспособность сфероидов из ФМК *in vitro*. Оценка биосовместимости амниона *in vivo* при подкожной, внутримышечной и внутрикостной имплантации лабораторным животным в наших экспериментах также показала отсутствие воспаления, нагноения и отторжения даже при повторных имплантациях.

В отличие от других тканей, амнион обладает преимуществами для использования в тканевой инженерии благодаря его противовоспалительным свойствам, неоднократно подтвержденным. Клетки амниотического эпителия и стромального слоя экспрессируют лейкоцитарные антигены человека (HLA) класса I, что определяет способность вызывать гуморальный и/или клеточно-опосредованный иммунный ответ у реципиента. Экспрессия HLA класса II клетками амниона значительно снижена (Magatti et al., 2018). А секреция клетками амниотического эпителия таких факторов, как HLA класса G (HLA-G), интерлейкин-10, TGFβ, фактор роста гепатоцитов, простагландин E2 и индолеамин-2,3-диоксигеназа, антагонист рецепторов интерлейкина-1, может участвовать в возникновении иммунологической толерантности (Silini et al., 2017; Koelink et al., 2020; Elkhennany et al., 2022). Связывание HLA-G с рецепторами на поверхности лимфоцитов, моноцитов или дендритных клеток реципиента ингибирует их пролиферацию и секрецию иммуноглобулина, ослабляет их врожденную цитотоксичность (Srinivasan et al., 2020; Wassmer, Berishvili, 2020). Эндостатин, альфа-1-антитрипсин, лизоцим, рибонуклеазы, бета-дефензины, кателицидин, ингибиторы эластазы, содержащиеся в биоматериале амниона, могут быть связаны с проявлением антибактериальных эффектов его применения. Кроме того, такие компоненты амниона, как лактоферрин и гиалуроновая кислота, также способствуют его противовоспалительному и антибактериальному действию (Zare-Bidaki et al., 2017).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Амнион имеет долгую историю использования в биомедицинских исследованиях и применения его для лечения повреждений тканей и коррекции различных заболеваний. Высушенная форма амниона является удобной для последующей обработки с целью использования сохраняющихся в нем биологически-активных компонентов, предназначенных для нужд тканевой инженерии, регенеративной медицины и трехмерной биопечати.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубовиков А. С., Безушко А. В., Куликов А. Н., Чурашов С. В., Черныш В. Ф., Блинова М. И., Александрова О. И., Суетов А. А., Гаврилюк И. О. 2017. О применении культивированных на амниотической мембране стволовых клеток роговичного эпителия для устранения лимбальной недостаточности в эксперименте. Практическая медицина. Т. 2. № 9. С. 67. (Dubovikov A. S., Bezushko A. V., Kulikov A. N., Churashov S. V., Chernysh V. F., Blinova M. I., Aleksandrova O. I., Suetov A. A., Gavrilyuk I. O. 2017. On using the corneal epithelial stem cells cultured on the amniotic membrane for limbal stem cell deficiency treatment in an experiment. Practical Med. V. 2. No. 9. P. 67.)

2. *Игнатъева Н. Ю., Данилов Н. А., Аверкиев С. В., Обрезкова М. В., Лунин В. В., Соболев Э. Н.* 2007. Определение гидроксипролина в тканях и оценка содержания в них коллагена. Журнал аналитической химии. Т. 62. № 1. С. 59. (*Lazarev P. E., Mogileva A. S., Nekrasov M. S., Purveev S. S., Lebedenko E. A., Karabasova Y. O., Glushakov R. I.* 2021. Stem cells from tooth pulp: immunophenotypic characteristics and differentiation. FORCIPE. V. 4. No. 1. P. 26.)
3. *Исаева Е. В., Бекетов Е. Е., Южаков В. В., Аргучинская Н. В., Кисель А. А., Малахов Е. П., Лагода Т. С., Яковлева Н. Д., Шегай П. В., Иванов С. А., Каприн А. Д.* 2021. Использование коллагена высокой концентрации в тканевой инженерии хряща методом трехмерной биопечати. Цитология. Т. 63. № 3. С. 260. (*Isaeva E. V., Beketov E. E., Yuzhakov V. V., Arguchinskaya N. V., Kisel A. A., Malakhov E. P., Lagoda T. S., Ykovleva N. D., Shegai P. V., Ivanov S. A., Kaprin A. D.* 2021. The use of collagen in a high concentration for the engineering of cartilage tissue with 3D-bioprinting. Tsitologiya (Russ.). V. 63. No. 3. P. 260.)
<https://doi.org/10.31857/S0041377121030056>
4. *Кораблев Р. В., Васильев А. Г., Тапильская Н. И., Рыжов Ю. Р., Эмиргаев З. К., Пюрвеев С. С., Брус Т. В., Таминкина Ю. А., Прохорычева А. А.* 2023. Механизмы миграции мезенхимных стволовых клеток и возможные стратегии их улучшения. Российские биомедицинские исследования. Т. 8. № 4. С. 45. (*Korablev R. V., Vasiliev A. G., Tapil'skaya N. I., Ryzhov J. R., Emirgaev Z. K., Pyurveev S. S., Brus T. V., Taminkina Y. A., Prokhorycheva A. A.* 2023. Mesenchymal stem cells migration mechanisms and possible strategies for their improvement. Russ. Biomed. Res. V. 2. No. 4. P. 45.)
<https://doi.org/10.56871/RBR.2023.12.54.006>
5. *Косова Д. А., Александров Л. С., Ищенко А. И., Трифонова Н. С., Никонов А. П., Лаврентьева К. И., Агеев М. Б., Федорова Е. В., Люндуп А. В., Жолобова М. Н., Беришвили М. В., Проклова Г. Ф., Землина Н. С., Науменко Н. С.* 2023. Применение амниотических оболочек в клинической медицине. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. Т. 22. № 5. С. 69. (*Kosova D. A., Aleksandrov L. S., Ischenko A. I., Trifonova N. S., Nikonov A. P., Lavrentyeva K. I., Ageev M. B., Fedorova E. V., Lyundup A. V., Zholobova M. N., Berishvili M. V., Proklova G. F., Zemlina N. S., Naumenko N. S.* 2023. Application of amniotic membranes in clinical medicine. Gynecol. Obstetrics Perinatol. V. 22. No. 5. P. 69.)
<https://doi.org/10.20953/1726-1678-2023-5-69-78>
6. *Крылова Т. А., Кольцова А. М., Зенин В. В., Мусорина А. С., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г.* 2012. Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека. Цитология. Т. 54. № 1. С. 5. (*Krylova T. A., Koltsova A. M., Zenin V. V., Musorina A. S., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G.* 2012. Comparative characteristics of new mesenchymal stem cell lines derived from human embryonic stem cells, bone marrow and foreskin. Tsitologiya (Russ.). V. 54. No. 1. P. 5.)
7. *Куликова Ю. В., Сухих С. А., Бабич О. О.* 2024. Методы экстракции морского коллагена для решения задач регенеративной медицины. Регенерация органов и тканей. Т. 1. № 2. С. 29. (*Kulikova Yu. V., Sukhikh S. A., Babich O. O.* 2024. Marine collagen extraction methods for solving regenerative medicine problems. Tiss. Organ Regeneration. V. 1. No. 2. P. 29.)
<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-29-45>
8. *Лазарев П. Э., Могилева А. С., Некрасов М. С., Пюрвеев С. С., Лебеденко Е. А., Карabasова Я. О., Глушаков Р. И.* 2021. Стволовые клетки из пульпы зуба: иммунофенотипическая характеристика и дифференцировка. FORCIPE. Т. 4. No. 1. С. 26.
9. *Abaci A., Guvendiren M.* 2020. Designing decellularized extracellular matrix-based bioinks for 3D bioprinting. Adv. Healthc. Mater. V. 24. Art. ID: 2000734.
<https://doi.org/10.1002/adhm.202000734>
10. *Arki M. K., Moeinabadi-Bidgoli K., Hossein-Khannazer N., Gramignoli R., Najimi M., Vosough M.* 2023. Amniotic membrane and its derivatives: novel therapeutic modalities in liver disorders. Cells. V. 12. Art. ID: 2114.
<https://doi.org/10.3390/cells12162114>
11. *Bakhtiar H., Mousavi M. R., Rajabi S., Pezeshki-Modaress M., Ayati A., Ashoori A., Ellini M. R., Baaji K., Kamali A., Abediasl Z., Azarpazhooh A., Kishen A.* 2023. Fabrication and characterization of a novel injectable human amniotic membrane hydrogel for dentin-pulp complex regeneration. Dent. Mater. V. 39. P. 718.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2023.06.008>
12. *Bhattacharjee M., Escobar Ivirico J. L., Kan H.-M., Shah S., Otsuka T., Bordett R., Barajaa M., Nagiah N., Pandey R., Nair L. S., Laurencin C. T.* 2022. Injectable amnion hydrogel-mediated delivery of adipose-derived stem cells for osteoarthritis treatment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 4. Art. ID: e2120968119.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2120968119>

13. *Comperat L., Chagot L., Massot S., Stachowicz M. L., Dusserre N., Médina C., Desigaux T., Dupuy J.-W., Fricain J.-C., Oliveira H.* 2023. Harnessing human placental membrane-derived bioinks: characterization and applications in bioprinting and vasculogenesis. *Adv. Healthc. Mater.* V. 13. Art. ID: e2303370.
<https://doi.org/10.1002/adhm.202303370>
14. *Chen X., Sun J., Li X., Mao L., Zhou Y., Cui L., Bai W.* 2018. Antifibrotic effects of decellularized and lyophilized human amniotic membrane transplant on the formation of intrauterine adhesion. *Exp. Clin. Transplant. Official J. Middle East Soc. Organ Transplant.* V. 17. P. 236.
<https://doi.org/10.6002/ect.2017.0284>
15. *Deus I. A., Santos S. C., Custódio C. A., Mano J. F.* 2022. Designing highly customizable human based platforms for cell culture using proteins from the amniotic membrane. *Biomater. Adv.* V. 134. Art. ID: 112574.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112574>
16. *Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E.* 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* V. 8. P. 315.
<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
17. *Elkhenany H., El-Derby A., Abd Elkodous M., Salah R. A., Lotfy A., El-Badri N.* 2022. Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred-year challenge. *Stem Cell Res. Ther.* V. 13. Art. ID: 8.
<https://doi.org/10.1186/s13287-021-02684-0>
18. *Fitriani N., Wilar G., Narsa A. C., Mohammed A. F., Wathoni N.* 2023. Application of amniotic membrane in skin regeneration. *Pharmaceutics.* V. 15. Art. ID: 748.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030748>
19. *Gan L., Duan H., Sun F. Q., Xu Q., Tang Y. Q., Wang S.* 2017. Efficacy of freeze-dried amnion graft following hysteroscopic adhesiolysis of severe intrauterine adhesions. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* V. 137. P. 116—122.
<https://doi.org/10.1002/ijgo.12112>
20. *Gaharwar A. K., Singh I., Khademhosseini A.* 2020. Engineered biomaterials for in situ tissue regeneration. *Nat. Rev. Mater.* V. 5. P. 686.
<https://doi.org/10.1038/s41578-020-0209-x>
21. *Galvez P., Ahmed Omar N., Siadous R., Durand M., Comperat L., Lafarge X., Gindraux F., Sentilhes L., Fricain J. C., L'Heureux N., Fenelon M.* 2025. In vitro and in vivo assessment of a new acellular human amnion/chorion membrane device for guided bone regeneration. *Sci Rep.* V. 15. Art. ID: 5483.
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-88814-7>
22. *Gholipourmalekabadi M., Farhadhosseinabadi B., Faraji M., Nourani M. R.* 2020. How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? How safe are the procedures? *Burns.* V. 46. P. 1254.
<https://doi.org/10.1016/j.burns.2019.07.005>
23. *Haghshenas M., Tavana S., Zand E., Montazeri L., Fathi R.* 2022. Mouse ovarian follicle growth in an amniotic membrane-based hydrogel. *J. Biomater. Appl.* V. 37. P. 563.
<https://doi.org/10.1177/08853282221094193>
24. *Heidari F., Saadatmand M., Simorgh S.* 2023. Directly coaxial bioprinting of 3D vascularized tissue using novel bioink based on decellularized human amniotic membrane. *Int. J. Biol. Macromol.* V. 253. Art. ID: 127041.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127041>
25. *Horn A., Saller J., Cuttica D., Neufeld S.* 2019. Review of use of amniotic membrane allograft in total ankle replacements. *Foot ankle orthopaedics.* V. 4. Art. ID: 2473011419S0022.
<https://doi.org/10.1177/2473011419S0022>
26. *Hussein K. H., Motiea E., Hussein M. T.* 2025. Efficacy of xenogeneic fresh and lyophilized amniotic membranes on the healing of experimentally induced full-thickness skin wounds in dogs. *Sci Rep.* V. 15. Art. ID: 15605.
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-95023-9>
27. *Jahanafrooz Z., Bakhshandeh B., Behnam Abdollahi S., Seyedjafari E.* 2023. Human amniotic membrane as a multi-functional biomaterial: recent advances and applications. *J. Biomater. Appl.* V. 37. P. 1341—1354.
<https://doi.org/10.1177/08853282221137609>
28. *Jirsova K., Jones G. L. A.* 2017. Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting – a review. *Cell Tissue Bank.* V. 18. P. 193—204.
<https://doi.org/10.1007/s10561-017-9618-5>

29. *Jhumi I. J., Arafat T.-A., Karmakar P. C., Arifuzzaman M., Hossain M. S., Akhtar N., Asaduzzaman S. M.* 2023. Silver nanoparticle incorporated human amniotic membrane gel accelerates second-degree burn wound healing in wister rat. Evidence-Based Complementary Altern. Med. Art. ID: 9808556.
<https://doi.org/10.1155/2023/9808556>
30. *Kafili G., Niknejad H., Tamjid E., Simchi A.* 2024. Amnion-derived hydrogels as a versatile platform for regenerative therapy: from lab to market. Front. Bioeng. Biotechnol. V. 12. Art. ID: 1358977.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1358977>
31. *Kafili G., Tamjid E., Niknejad H., Simchi A.* 2023. Development of printable nanoengineered composite hydrogels based on human amniotic membrane for wound healing application. J. Mater. Sci. V. 58. Art. ID: 12351.
<https://doi.org/10.1007/s10853-023-08783-y>
32. *Kim B. S., Das S., Jang J., Cho D.-W.* 2020. Decellularized extracellular matrix-based bioinks for engineering tissue- and organ-specific microenvironments. Chem. Rev. (Washington, DC, U.S.). V. 120. P. 10608.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00808>
33. *Koelink P. J., Bloemendaal F. M., Li B., Westera L., Vogels E. W., van Roest M., Gloudemans A. K., van't Wout A. B., Korf H., Vermeire S., Te Velde A. A., Ponsioen C. Y., D'Haens G. R., Verbeek J. S., Geiger T. L. et al.* 2020. Anti-TNF therapy in IBD exerts its therapeutic effect through macrophage IL-10 signalling. Gut. V. 69. P. 1053.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318264>
34. *Lacorzana J.* 2020. Amniotic membrane, clinical applications and tissue engineering. Review of its ophthalmic use. Arch. Soc. Esp. Oftalmol. (English Ed.). V. 95. P. 15.
<https://doi.org/10.1016/j.oftale.2019.09.008>
35. *Lee S. Y., Shin J. E., Kwon H., Choi D. H., Kim J. H.* 2020. Effect of autologous adipose-derived stromal vascular fraction transplantation on endometrial regeneration in patients of Asherman's syndrome: a pilot study. Reprod. Sci. V. 27. P. 561.
<https://doi.org/10.1007/s43032-019-00055-y>
36. *Lei X., Wu Y., Peng X., Zhao Y., Zhou X., Yu X.* 2020. Research on alginate-polyacrylamide enhanced amnion hydrogel, a potential vascular substitute material. Mater. Sci. Eng. V. 115. Art. ID: 111145.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111145>
37. *Li X., Li P., Wang C., Shang T., Han H., Tong Y., Kang Y., Fang J., Cui L.* 2022. A thermo-sensitive and injectable hydrogel derived from a decellularized amniotic membrane to prevent intrauterine adhesion by accelerating endometrium regeneration. Biomaterials Sci. V. 9. P. 2275.
<https://doi.org/10.1039/D1BM01791H>
38. *Magatti M., Vertua E., Cargnoni A., Silini A., Parolini O.* 2018. The immunomodulatory properties of amniotic cells: the two sides of the coin. Cell Transplantat. V. 27. P. 31.
<https://doi.org/10.1177/0963689717742819>
39. *Marsit N., Dwejen S., Saad I., Abdalla S., Shaab A., Salem S., Khanfas E., Hasan A., Mansur M., Abdul Sammad M.* 2014. Substantiation of 25 kGy radiation sterilization dose for banked air dried amniotic membrane and evaluation of personnel skill in influencing finished product bioburden. Cell Tissue Bank. V. 15. P. 603.
<https://doi.org/10.1007/s10561-014-9433-1>
40. *Milan P. B., Amini N., Joghataei M. T., Ebrahimi L., Amoupour M., Sarveazad A., Kargozar S., Mozafari M.* 2020. Decellularized human amniotic membrane: from animal models to clinical trials. Methods. V. 171. P. 11.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.07.018>
41. *Munoz-Torres J.R., Martinez-Gonzalez S.B., Lozano-Lujan A.D., Martinez-Vazquez M.C., Velasco-Elizondo P., Garza-Veloz I., Martinez-Fierro M.L.* 2023. Biological properties and surgical applications of the human amniotic membrane. Front. Bioeng. Biotechnol. V. 10. Art. ID: 1067480.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1067480>
42. *Murphy S. V., Skardal A., Nelson R. A., Jr, Sunnon K., Reid T., Clouse C., Kock N. D., Jackson J., Soker S., Atala A.* 2020. Amnion membrane hydrogel and amnion membrane powder accelerate wound healing in a full thickness porcine skin wound model. Stem cells Transl. Med. V. 9. P. 80.
<https://doi.org/10.1002/sctm.19-0101>
43. *Peng X., Wang X., Cheng C., Zhou X., Gu Z., Li L., Liu J., Yu X.* 2020. Bioinspired, artificial, small-diameter vascular grafts with selective and rapid endothelialization based on an amniotic membrane-derived hydrogel. ACS Biomaterials Sci. Eng. V. 6. P. 1603.
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01493>

44. *Rahman, M. S., Islam, R., Rana, M. M., Spitzhorn L.-S., Rahman M. S., Adjaye J., Asaduzzaman S. M.* 2019. Characterization of burn wound healing gel prepared from human amniotic membrane and Aloe vera extract. *BMC Complementary Altern. Med.* V. 19. Art. ID: 115.
<https://doi.org/10.1186/s12906-019-2525-5>
45. *Ragazzo M., Val M., Montagner G., Trojan D., Fusetti S., Guarda Nardini L.* 2022. Human amniotic membrane: an improvement in the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ)? A case-control study. *Cell Tissue Bank.* V. 23. P. 129.
<https://doi.org/10.1007/s10561-021-09922-y>
46. *Russo A., Bonci P., Bonci P.* 2012. The effects of different preservation processes on the total protein and growth factor content in a new biological product developed from human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank.* V. 13. P. 353.
<https://doi.org/10.1007/s10561-011-9261-5>
47. *Sacco R., Akintola O., Sacco N., Acocella A., Calasans-Maia M.D., Maranzano M., Olate S.* 2023. The use of human amniotic membrane (hAM) as a treatment strategy of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ): a systematic review and meta-analysis of the literature. *medicina (Kaunas).* V. 59. Art. ID: 968.
<https://doi.org/10.3390/medicina59050968>
48. *Sasikumar S., Chameettachal S., Cromer B., Pati F., Kingshott P.* 2019. Decellularized extracellular matrix hydrogels—cell behavior as a function of matrix stiffness. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* V. 10. P. 123.
<https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.05.002>
49. *Silini A. R., Magatti M., Cargnoni A., Parolini O.* 2017. Is immune modulation the mechanism underlying the beneficial effects of amniotic cells and their derivatives in regenerative medicine? *Cell Transplantation.* V. 26. P. 531.
<https://doi.org/10.3727/096368916X693699>
50. *Srinivasan R. C., Strom S. C., Gramignoli R.* 2020. Effects of cryogenic storage on human amnion epithelial cells. *Cells.* V. 9. Art. ID: 1696.
<https://doi.org/10.3390/cells9071696>
51. *Stepanovska J., Supova M., Hanzalek K., Broz A., Matejka R.* 2021. Collagen bioinks for bioprinting: a systematic review of hydrogel properties, bioprinting parameters, protocols, and bioprinted structure characteristics. *Biomedicines.* V. 9. Art. ID: 1137.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9091137>
52. *Tan Y., Wang W., Xu L., Zhou X., Shen J., Zhou T., Duan C., Wang X., Liu Z., Wang M., Li G.* 2025. Decellularized human amniotic member hydrogel promotes limbal stem cells proliferation. *Colloids Surf B Biointerfaces.* V. 252. Art. ID: 114656.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2025.114656>
53. *Wassmer C.-H., Berishvili E.* 2020. Immunomodulatory properties of amniotic membrane derivatives and their potential in regenerative medicine. *Curr. Diabetes Rep.* V. 20. P. 31.
<https://doi.org/10.1007/s11892-020-01316-w>
54. *Zare-Bidaki M., Sadrinia S., Erfani S., Afkar E., Ghanbarzade N.* 2017. Antimicrobial properties of amniotic and chorionic membranes: a comparative study of two human fetal sacs. *J. Reprod. Infertil.* V. 18. P. 218. PMID: PMC5565909.
55. *Zhang Q., Chang C., Qian C., Xiao W., Zhu H., Guo J., Meng Z., Cui W., Ge Z.* 2021. Photo-crosslinkable amniotic membrane hydrogel for skin defect healing. *Acta Biomater.* V. 125. P. 197.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.02.043>