

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392345 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.01.23

(51) Int. Cl. A61L 27/36 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.13

(54) МНОГОСЛОЙНЫЕ ТРАНСПЛАНТАТЫ АМНИОТИЧЕСКОЙ ТКАНИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/174,280; 63/267,820

(72) Изобретатель:

(32) 2021.04.13; 2022.02.10

Кун Адам, Лонг Дезире, Сиваленка

(33) US

Раджараджесвари, Госевская Анна,

(86) PCT/US2022/071705

Бригиго Стивен А., Уилк Тимоти Ф.,

(87) WO 2022/221852 2022.10.20

Тринка Аманда Л., Харири Роберт

(71) Заявитель:

Дж., Мартинес Луис (US)

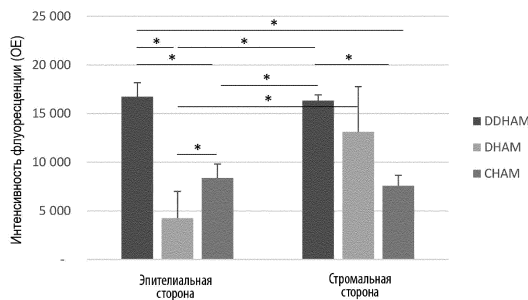
СЕЛУЛАРИТИ ИНК. (US)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Данное изобретение относится к продукту, представляющему собой тканевый трансплантат, включающему множество ламинированных слоев внеклеточного матрикса, причем внеклеточный матрикс происходит из амниотической мембраны и причем стромальная сторона слоя внеклеточного матрикса представлена как на верхней, так и на нижней поверхностях продукта, представляющего собой тканевый трансплантат. Также представлены способы изготовления и применения продукта, представляющего собой тканевый трансплантат.

Адгезия клеток в зависимости от стороны и амниотической мембраны



A1

202392345

202392345

A1

МНОГОСЛОЙНЫЕ ТРАНСПЛАНТАТЫ АМНИОТИЧЕСКОЙ ТКАНИ И ИХ

ПРИМЕНЕНИЯ

[0001] Настоящая заявка заявляет приоритет согласно предварительной заявке на патент США №№ 63/174,280, поданной 13 апреля 2021 года, и 63/267,820, поданной 10 февраля 2022 года, содержание которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Данное изобретение относится, частично, к многослойным трансплантатам амниотической ткани и их применению в офтальмологии.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Амниотическая мембрана человека (амнион) представляет собой самый внутренний слой амниотического мешка, который непосредственно контактирует с амниотической жидкостью. Она состоит из одного слоя клеток кубического эпителия, базальной мембраны и аваскулярного стромального матрикса, рыхло прикрепленного к хориону. Известно, что основными компонентами амниона человека являются коллаген и эластин. Также в небольших количествах присутствуют другие биохимические компоненты, такие как ламинины и протеогликаны.

[0004] BIOVANCE производится из амниотической мембраны человека. Амниотическая мембрана в качестве исходного материала подвергается процессам промывания и децеллюляризации, которые предназначены для очистки от загрязнений в виде компонентов крови и удаления клеток из мембраны без изменения нативной коллагеновой архитектуры. Очищенную и децеллюляризованную амниотическую мембрану подвергают дегидратации при умеренной температуре 50 оС, благодаря чему конечный продукт будет легко хранить, транспортировать, и он будет иметь более

длительный срок хранения. Продукт окончательно стерилизуется с использованием электронно-пучкового облучения.

[0005] Амниотическую мембрану (АМ) используют для реконструкции поверхности глаза при лечении ряда глазных патологий, включая нарушения со стороны поверхности роговицы с дефицитом лимбальных стволовых клеток и без него, в качестве носителя для размножения *ex vivo* клеток лимбального эпителия, реконструкции поверхности конъюнктивы (например, удаление птеригиума, после удаления крупных поражений, кроме птеригиума, после разрушения симблефарона), при глаукоме, неоплазии, птеригиуме, а также формах некроза и перфораций склеры (Walkden, 2020; Elhassan, 2019; Malhotra & Jain, 2014, Mamede et al. 2012).

[0006] АМ можно использовать в виде «заплатки» или трансплантата. За счет размещения АМ эпителиальными клетками сверху, АМ действует как субстрат и скаффолд для роста эпителиальных клеток (Malhotra & Jain, 2014). В виде «заплатки», АМ действует как временная биологическая повязка или контактная линза, способствуя реэпителизации ткани хозяина под «заплаткой» (Walden, 2020, Malhotra & Jain, 2014). Предполагается, что размещение АМ в виде «заплатки» стромальной стороной вниз подавляет воспалительный ответ за счет захвата воспалительных клеток и индукции апоптоза (Dua et al. 2004). Следовательно, АМ размещают стромальной стороной вниз при наличии острого воспаления, особенно если оно ассоциировано с дефектами эпителия, с целью защиты поверхности глаза от воспалительных клеток и медиаторов (Malhotra & Jain, 2014; Mamede et al. 2012).

Таблица 1. Применения АМ в виде трансплантата или «заплатки» при глазной патологии (Safa Elhassan, 2019; Understanding Amniotic Membrane Grafts).

	Трансплантат	«Заплатка»
Роговица	Небольшие перфорации или некротические поражения, вторичные по отношению к язвам или истончению роговицы (стерильный)	Персистирующие дефекты эпителия; нейротрофический кератит; лентовидная кератопатия; буллезная кератопатия; заболевание,

	Трансплантат	«Заплата»
		связанное с лимбальными стволовыми клетками; рецидивирующая эрозия эпителия; дистрофия роговицы
Конъюнктив	Иссечение птеригиума; реконструкция фильтрационной подушки; симблефарон; реконструкция конъюнктивы и свода конъюнктивы после иссечения опухоли или заболевания, связанного с рубцеванием	Симблефарон; механическая травма; химическая травма; синдром Стивенса-Джонсона
Склера	Небольшие перфорации и некротические поражения склеры	Крупные некротические поражения или перфорации
Другое	Реконструкция века	Хирургия глаукомы или катаракты; дисфункциональный слезный синдром

[0007] *Способы ориентации и наложения АМ:* Выбор способа наложения зависит от показания(показаний) к применению, желаемого результата и глубины и размера раны (Walkden, 2020; Elhassan, 2019; Malhotra & Jain, 2014).

[0008] В литературе постоянно сообщается о трех способах наложения:

Методика вкладки (постоянный трансплантат);

Методика накладки (временная биологическая повязка или контактная линза); и

Комбинированная методика вкладки-накладки (постоянный трансплантат и временная биологическая повязка).

[0009] Методика вкладки (постоянный трансплантат): АМ размещают эпителиальной/базальной мембраной вверх, чтобы обеспечить клеткам хозяина субстрат, на котором они могут расти. Со временем АМ-матрица реконструируется в роговицу хозяина. Следовательно, она служит постоянным трансплантатом.

[0010] АМ подрезают по размеру дефекта, размещают эпителиальной стороной вверх и, как правило, пришивают к роговице. Очищается приблизительно 2 мм эпителия роговицы хозяина. Это позволяет регенерирующему эпителию расти поверх эпителиальной/базальной мембраны АМ. В зависимости от размера дефекта может

использоваться одно- или многослойная методика. В случае многослойной методики АМ можно разрезать на несколько частей или сложить «одеялом».

[0011] Методика накладки (временная биологическая повязка или контактная линза): АМ можно размещать либо эпителиальной/базальной мембраной вверх, либо стромальной стороной вверх, поскольку предполагается, что эпителий хозяина будет расти под мембраной. Ожидается, что АМ отпадет, будет удалена или саморазрушится с течением времени. Следовательно, АМ служит временной биологической повязкой или контактной линзой, обеспечивая физический барьер. Она не предназначена для включения в ткань хозяина.

[0012] Размер АМ превышает размер дефекта, поэтому эпителий хозяина находится под мембраной. Ее либо пришивают, либо приклеивают на месте.

[0013] Комбинированная методика вкладки-накладки: Указанная методика сочетает в себе методики вкладки и накладки. Как описано выше, АМ размещают в область дефекта эпителиальной стороной вверх и ожидается, что она включится в ткань хозяина. Можно использовать как однослойную, так и многослойную методику. Она сочетается с методикой накладки, при которой трансплантат размещают либо эпителиальной/базальной мембраной вверх, либо стромальной стороной вверх, при этом он выходит за пределы периметра дефекта. Ожидается, что в случае этой методики эпителий будет расти под «заплаткой», но над самой верхней частью вложенного трансплантата.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0014] Данное изобретение относится к продуктам, представляющим собой тканевый трансплантат, включающим множество слоев внеклеточного матрикса, ламинированных вместе, причем внеклеточный матрикс происходит из амниотической мембраны и причем

стромальная сторона слоя внеклеточного матрикса представлена как на верхней, так и на нижней поверхностях продукта, представляющего собой тканевый трансплантат.

[0015] Данное изобретение также относится к трансплантатам ткани глаза, включающим продукты, представляющие собой тканевый трансплантат, по данному изобретению.

[0016] Данное изобретение также относится к способам лечения заболевания или повреждения глаза у субъекта, причем способ включает этап приведения глаза субъекта в контакт с продуктами, представляющими собой тканевый трансплантат, или трансплантатами ткани глаза по данному изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0017] На ФИГ. 1 показана адгезия клеток в зависимости от стороны и амниотической мембраны. На графике обозначены средние значения и стандартные отклонения. Адгезия клеток измерена как интенсивность флуоресценции (OE).

[0018] На ФИГ. 2 показана пролиферация клеток. На графике обозначены средние значения и стандартные отклонения.

[0019] На ФИГ. 3 показана относительная скорость пролиферации. На графике обозначены средние значения и стандартные отклонения.

[0020] На ФИГ. 4 показана площадь миграции в зависимости от амниотической мембраны. На графике обозначены средние значения и стандартные отклонения. Площадь миграции указывается как пкс^2 .

[0021] На ФИГ. 5 показана жизнеспособность клеток на E&S-сторонах AM на протяжении 7 суток. $*p \leq 0,05$, по сравнению с DDHAM-S.

[0022] На ФИГ. 6 показано, что спустя 4 суток, клетки на S-стороне AM окрашивали кальцеином AM для визуализации живых клеток (A) и фаллоидином для визуализации актина (B).

[0023] На ФИГ. 7 показана экспрессия генов TNF α в HSEC, культивированных на АМ в течение 24 ч, 48 ч и 72 ч. * $p \leq 0,05$.

[0024] На фигурах 8А и 8В показано иммунофлуоресцентное и H&E-окрашивание амниотических мембран. Показано иммунофлуоресцентное окрашивание DDHAM, DHAM и CHAM (А). Поперечные срезы мембран окрашивали красителем Hoechst (ДНК окрашивается синим), фаллоидином (актин окрашивается зеленым) и антителами к коллагену I типа человека (Col1 окрашивается красным). Показаны репрезентативные изображения, и масштабная линейка = 50 мкм. Показано H&E-окрашивание (ядра окрашиваются синим, а цитоплазма окрашивается красным) DDHAM, DHAM и CHAM (В). Показаны репрезентативные изображения, и масштабная линейка = 20 мкм.

[0025] На ФИГ. 9 показана адгезия клеток. Эпителиальные клетки роговицы человека высевали на эпителиальную и стромальную стороны амниотических мембран и инкубировали в течение 24 ч. Показаны результаты сравнения эпителиальной и стромальной сторон каждой амниотической мембраны, и показаны результаты сравнения амниотических мембран для каждой стороны. На графике обозначены средние значения и стандартные отклонения. Интенсивность флуоресценции выражена в относительных единицах (OE). Показанные данные представляют собой среднее \pm SD. * $p \leq 0,05$.

Сокращения: CHAM, подвергнутая криоконсервации амниотическая мембрана человека; DDHAM, децеллюляризованная дегидратированная амниотическая мембрана человека; DHAM, дегидратированная амниотическая мембрана человека.

[0026] На ФИГ. 10 показано окрашивание эпителиальных клеток роговицы человека на АМ на 4-е сутки. Эпителиальные клетки роговицы человека высевали на стромальную сторону трех АМ, культивировали и окрашивали кальцеином АМ для визуализации живых клеток на 4-е сутки (А). Морфологию эпителиальных клеток роговицы человека на АМ отслеживали с помощью окрашивания по актину на 4-е сутки и псевдоокрашивания в красный цвет (В). Изображения получали с использованием

эпифлюоресцентного микроскопа. Масштабная планка = 100 мкм. Сокращения: СНАМ, подвергнутая криоконсервации амниотическая мембрана человека; DDНАМ, децеллюляризованная дегидратированная амниотическая мембрана человека; ДНАМ, дегидратированная амниотическая мембрана человека.

[0027] На фигурах 11А и 11В показана жизнеспособность клеток в зависимости от времени. Эпителиальные клетки роговицы человека высевали на эпителиальную и стромальную стороны амниотических мембран и инкубировали в течение 1, 4 и 7 суток. Показатели жизнеспособности клеток на амниотических мембранах измеряли с помощью анализа alamarBlue в каждый момент времени. Интенсивность флуоресценции выражена в относительных единицах (ОЕ). На графике отмечены средние значения и стандартные отклонения в зависимости от времени для каждой стороны амниотических мембран (А). Относительная жизнеспособность клеток, выраженная в виде процентной доли на 1-е сутки, и стандартные отклонения в динамике отмечены на графике для каждой из амниотических мембран. Показаны результаты сравнения эпителиальной и стромальной сторон каждой амниотической мембраны и показаны результаты сравнения амниотических мембран для каждой стороны. Показанные данные представляют собой среднее \pm SD. * $p \leq 0,05$. Сокращения: СНАМ, подвергнутая криоконсервации амниотическая мембрана человека; DDНАМ, децеллюляризованная дегидратированная амниотическая мембрана человека; ДНАМ, дегидратированная амниотическая мембрана человека.

[0028] На фигурах 12А и 12В показана количественная оценка миграции. Показаны репрезентативные изображения царапины, демонстрирующие эффекты кондиционированной среды в отношении миграции эпителиальных клеток роговицы человека через 0 ч и 24 ч (А). Для оценки эффекта АМ отдельно в отношении миграции эпителиальных клеток роговицы человека тестировали кондиционированную среду из разных амниотических мембран (с клетками или без) (В). Площадь царапины измеряли с

использованием Image J и выражали в квадратных пикселях (пкс²). Площадь миграции = Площадь_{0 ч}-Площадь_{24 ч}. Показанные данные представляют собой среднее ± SD. *p ≤ 0,05. Сокращения: CHAM, подвергнутая криоконсервации амниотическая мембрана человека; DDHAM, децеллюляризованная дегидратированная амниотическая мембрана человека; DHAM, дегидратированная амниотическая мембрана человека; среда в качестве контроля, контроль.

[0029] На фигурах 13A – 13D показана экспрессия мРНК через 24 часа. Показана относительная экспрессия мРНК GM-CSF (A), IL-6 (B), IL-8 (C) и TNF-α (D) через 24 часа. Относительная экспрессия мРНК через 24 часа нормализована к TSP в условиях покоя. Показанные данные представляют собой среднее ± SD. *p ≤ 0,05. Сокращения: CHAM, подвергнутая криоконсервации амниотическая мембрана человека; DDHAM, децеллюляризованная дегидратированная амниотическая мембрана человека; DHAM, дегидратированная амниотическая мембрана человека; GM-CSF, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IL-6, интерлейкин-6; IL-8, интерлейкин-8; TNF-α, фактор некроза опухоли альфа.

[0030] На фигурах 14A – 14D показана экспрессия мРНК с течением времени. Показана относительная экспрессия мРНК GM-CSF (A), IL-6 (B), IL-8 (C) и TNF-α (D) с течением времени в условиях наличия стимуляции (+TNF-α). Относительная экспрессия мРНК с течением времени нормализована к экспрессии через 24 часа. Статистические сравнения проводили между моментами времени для каждой амниотической мембраны в условиях наличия стимуляции. Показанные данные представляют собой среднее ± SD. *p ≤ 0,05. Сокращения: CHAM, подвергнутая криоконсервации амниотическая мембрана человека; DDHAM, децеллюляризованная дегидратированная амниотическая мембрана человека; DHAM, дегидратированная амниотическая мембрана человека; GM-CSF, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IL-6, интерлейкин-6; IL-8, интерлейкин-8; TNF-α, фактор некроза опухоли альфа.

[0031] На фигурах 15А – 15F показан клинический пример. Получали изображения эпителиальной поверхности, иллюстрирующие течение болезни: до операции, на которых показана неудовлетворительная неровная поверхность эпителия (А), после удаления неудовлетворительного эпителия с видимым субэпителиальным дебрисом, обусловленного эпителиальной дистрофией базальной мембраны роговицы (В), после снятия всех субэпителиальных рубцов и дебриса, возникающего в результате эпителиальной дистрофии базальной мембраны роговицы (С), размещение DDHAM (D), размещение бандажной контактной линзы поверх DDHAM (Е) и через месяц после операции, на которых показана чистая поверхность.

[0032] На фигурах 16А – 16С показано получение глазной АМ. DDHAM упакована в диски диаметром 10 мм (А). Для исследования, DHAM (В) и SHAM (С) получали в виде дисков диаметром 10 мм с использованием иглы для биопсии на 10 мм. Сокращения: SHAM, подвергнутая криоконсервации амниотическая мембрана человека; DDHAM, децеллюляризованная дегидратированная амниотическая мембрана человека; DHAM, дегидратированная амниотическая мембрана человека.

[0033] На ФИГ. 17 показаны модели напечатанных на 3D-принтере шаблонов, обеспечивающих возможность сушки Biovance 3L Ocular с приданием изогнутых форм.

[0034] На ФИГ. 18 показана Biovance 3L Ocular, которая была высушена с приданием изогнутых форм.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0035] Данное изобретение относится к продуктам, представляющим собой тканевый трансплантат, включающим множество слоев внеклеточного матрикса, ламинированных вместе, причем внеклеточный матрикс происходит из амниотической мембраны и причем стромальная сторона слоя внеклеточного матрикса представлена как на верхней, так и на нижней поверхностях продукта, представляющего собой тканевый трансплантат.

[0036] В некоторых вариантах реализации изобретения продукт включает три или более слоев внеклеточного матрикса. В некоторых вариантах реализации изобретения продукт включает ровно три слоя внеклеточного матрикса.

[0037] В некоторых вариантах реализации изобретения амниотическая мембрана является децеллюляризованной. В некоторых вариантах реализации изобретения амниотическую мембрану децеллюляризуют с помощью детергента или механического разрушения. В некоторых вариантах реализации изобретения детергент представляет собой дезоксихолевую кислоту.

[0038] В некоторых вариантах реализации изобретения множество слоев внеклеточного матрикса ламинированы вместе путем сушки. В некоторых вариантах реализации изобретения продукт сушат с помощью тепла и/или под вакуумом.

[0039] В некоторых вариантах реализации изобретения продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, подвергают дегидратации. В некоторых вариантах реализации изобретения продукт включает менее чем около 20% воды по сухой массе. В некоторых вариантах реализации изобретения продукт включает менее чем около 15% воды по сухой массе. В некоторых вариантах реализации изобретения продукт включает около 10% воды по сухой массе.

[0040] В некоторых вариантах реализации изобретения продукт включает от около 40% до около 70% общего коллагена по сухой массе. В некоторых вариантах реализации изобретения продукт включает от около 45% до около 60% общего коллагена по сухой массе. В некоторых вариантах реализации изобретения продукт включает от около 50% до около 55% общего коллагена по сухой массе. В некоторых вариантах реализации изобретения коллаген представляет собой в основном коллаген I типа и коллаген III типа.

[0041] В некоторых вариантах реализации изобретения продукт включает от около 8% до около 24% эластина по сухой массе. В некоторых вариантах реализации изобретения продукт включает от около 12% до около 20% эластина по сухой массе. В некоторых

вариантах реализации изобретения продукт включает от около 15% до около 20% эластина по сухой массе.

[0042] В некоторых вариантах реализации изобретения продукт включает менее чем около 1% гликозаминогликана по сухой массе. В предпочтительных вариантах реализации изобретения продукт включает менее чем около 0,5% гликозаминогликана по сухой массе. В некоторых вариантах реализации изобретения продукт включает менее чем около 1% фибронектина по сухой массе. В предпочтительных вариантах реализации изобретения продукт включает менее чем около 0,5% фибронектина по сухой массе. В некоторых вариантах реализации изобретения продукт включает менее чем около 1% ламинина по сухой массе. В предпочтительных вариантах реализации изобретения продукт включает менее чем около 0,5% ламинина по сухой массе.

[0043] В некоторых вариантах реализации изобретения амниотическая мембрана представляет собой амниотическую мембрану человека. В некоторых вариантах реализации изобретения амниотическая мембрана получена после доношенной беременности.

[0044] Данное изобретение также относится к трансплантатам ткани глаза, включающим продукты, представляющие собой тканевый трансплантат, по данному изобретению.

[0045] В некоторых вариантах реализации изобретения трансплантат ткани глаза имеет приблизительно круглую форму. В некоторых вариантах реализации изобретения трансплантат ткани глаза включает изогнутую часть в форме части сферы.

[0046] В некоторых вариантах реализации изобретения форму придают путем сушки продукта, представляющего собой тканевый трансплантат, на шаблоне.

[0047] Данное изобретение также относится к способам лечения заболевания или повреждения глаза у субъекта, причем способ включает этап приведения глаза субъекта в

контакт с продуктами, представляющими собой тканевый трансплантат, или трансплантатами ткани глаза по данному изобретению.

[0048] В некоторых вариантах реализации изобретения повреждение глаза включает истирание. В некоторых вариантах реализации изобретения повреждение глаза включает химическое воздействие. В некоторых вариантах реализации изобретения повреждение глаза включает порез или разрыв. В некоторых вариантах реализации изобретения повреждение глаза включает заболевание или повреждение глаза включает заболевание или повреждение роговицы.

[0049] В некоторых вариантах реализации изобретения лечение включает восстановление поврежденной ткани. В некоторых вариантах реализации изобретения лечение включает сокращение рубцовой ткани или сокращение образования рубцовой ткани по сравнению с глазом, не подвергавшимся лечению. В некоторых вариантах реализации изобретения лечение включает повышенную миграцию эпителиальных клеток по сравнению с глазом, не подвергавшимся лечению. В некоторых вариантах реализации изобретения лечение включает повышенную адгезию эпителиальных клеток по сравнению с глазом, не подвергавшимся лечению. В некоторых вариантах реализации изобретения лечение включает повышенную пролиферацию эпителиальных клеток по сравнению с глазом, не подвергавшимся лечению. В некоторых вариантах реализации изобретения лечение включает повышенное покрытие эпителиальными клетками по сравнению с глазом, не подвергавшимся лечению.

[0050] В некоторых вариантах реализации изобретения субъектом является млекопитающее. В предпочтительных вариантах реализации изобретения субъектом является человек.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Биохимический состав Biovance

[0051] BIOVANCE в основном состоит из коллагена и эластина. Также в небольших количествах присутствуют гликозаминогликан, фибронектин и ламинин.

Таблица 2. Биохимический состав.

ТЕСТИРУЕМЫЙ ПАРАМЕТР	СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ (% ОТ ОБЩЕЙ МАССЫ МЕМБРАНЫ) N = 15 (3 НА ПАРТИЮ)	ДИАПАЗОН (% ОТ ОБЩЕЙ МАССЫ МЕМБРАНЫ)
ОБЩИЙ КОЛЛАГЕН	52,9	40,7 - 66,2
ЭЛАСТИН	18,9	10,6 – 23,2
ГЛИКОЗАМИНОГЛИ КАН	0,3	0,19 – 0,33
ФИБРОНЕКТИН	0,3	0,12 – 0,73
ЛАМИНИН	0,1	0,01 – 0,16
ДРУГИЕ БЕЛКИ	17	

* Белки, указанные как «другие», включают без ограничения коллаген V, VI и VII типов, интегрин и предшественник фибронектина.

Таблица 3. Коллагеновый состав по подтипам

ТЕСТИРУЕМЫЙ ПАРАМЕТР	СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ (% ОТ ОБЩЕЙ МАССЫ МЕМБРАНЫ) N = 15 (3 НА ПАРТИЮ)	(% ОТ ОБЩЕЙ МАССЫ МЕМБРАНЫ)
КОЛЛАГЕН I ТИПА	23,2	13 – 33
КОЛЛАГЕН III ТИПА	28,9	20 – 44
КОЛЛАГЕН IV ТИПА	0,8	0,5 – 1,2

Пример 2. Сравнительный анализ эффектов глазных скаффолдов в отношении эпителиальных клеток глаза человека

[0052] Амниотические скаффолды благодаря их уникальным биологическим свойствам нашли применение для лечения различных глазных заболеваний. Лабораторные данные продемонстрировали, что регенеративные свойства таких скаффолдов могут влиять на врожденные механизмы заживления. Амниотические скаффолды могут помочь ускорить естественное заживление и уменьшить субъективную боль и послеоперационные осложнения. Несмотря на обширные исследования, подтверждающие присущую амниотическим скаффолдам регенеративную способность, процессы сбора и обработки ткани постоянно совершенствуются. Необходимы дополнительные усилия, чтобы выяснить, какая методология обработки позволяет получить скаффолд, идеальный для офтальмологического применения.

[0053] Цель: Определить эффект трех амниотических скаффолдов (Biovance3L Ocular, AMBIO2®, AmnioGraft®) в отношении адгезии и пролиферации эпителиальных клеток глаза человека.

[0054] Способы: Эпителиальные клетки роговицы человека (HCEC) и эпителиальные клетки конъюнктивы человека (HConEpiC) высевали в лунки. Адгезию и пролиферацию измеряли на 1-е, 4-е и 7-е сутки на скаффолдах. Кондиционированную среду экстрагировали из лунок и использовали для анализов роста.

[0055] Результаты: По сравнению с двумя другими скаффолдами, Biovance3L Ocular показал значимо более высокую жизнеспособность эпителиальных клеток ($P < 0,001$) и продемонстрировал значимо большую адгезию эпителиальных клеток ($P \leq 0,011$). Более того, скорость пролиферации эпителиальных клеток была значимо выше в случае Biovance3L, чем в случае AmnioGraft® ($P < 0,001$). Миграция HCEC в присутствии кондиционированной среды из клеток, культивированных на Biovance3L Ocular и AMBIO2®, была сопоставимой ($P = 0,885$) и значимо большей, чем в случае клеток, выращенных на AmnioGraft® ($P \leq 0,006$). Миграция HCEC в присутствии кондиционированной среды из клеток, культивированных на глазных скаффолдах, была значимо большей, чем в случае контрольной кондиционированной среды из клеток, выращенных на пластмассовых планшетах для тканевых культур ($P < 0,001$).

Кондиционированная среда из разных скаффолдов не влияла на миграцию HConEpiC.

[0056] Выводы: Biovance3L Ocular оказывал значимый эффект в отношении эпителиальных клеток человека, поддерживая большую высокую жизнеспособность, адгезию и пролиферацию как HCEC, так и HConEpiC, при сравнении с другими скаффолдами. Для оценки клинического влияния этих результатов необходимы дополнительные исследования.

[0057] Краткий обзор: Biovance3L Ocular сравнивали с доступными на рынке конкурентами AMBIO2® и AmnioGraft® для определения разницы в клеточном росте в

различных анализах. Biovance3L продемонстрировал превосходную жизнеспособность, адгезию и пролиферацию НСЕС и НConEpiC при сравнении с другими скаффолдами. Biovance3L Ocular, лишенный остаточных клеток, ДНК, факторов роста и цитокинов, продемонстрировал превосходные показатели роста эпителиальных клеток глаза, что имеет решающее значение для достижения естественного восстановления и регенерации.

Пример 3. Biovance 3L

[0058] Общая информация: Амниотические мембраны имеют широкое клиническое применение. Как правило, в клинических целях используется однослойная мембрана.

[0059] Было подтверждено, что предпочтительной ориентацией для реэпителизации эпителиальных клеток роговицы является эпителиальная сторона амниотической мембраны, поддерживающая реэпителизацию, по сравнению со стромальной стороной.

[0060] Например, D.J Hu (Investigative Ophthalmology & Visual Science May 2003, Vol.44, 3151) сравнивает реэпителизацию роговицы поверх амниотической мембраны (АМ), пришитой к областям дефекта роговицы, в двух направлениях: передняя сторона базальной мембраны АМ (ВМА) и задняя сторона базальной мембраны АМ (ВМР). Его вывод заключался в том, что на скорость реэпителизации роговицы не влияет ориентация АМ. Эпителий роговицы имеет большее сродство к базальной мембране (эпителиальной стороне) АМ, независимо от ориентации. Клиницисты должны учитывать эти данные и понимать, что, хотя эпителий может расти по обе стороны амниотической мембраны, по большей части реэпителизация происходит на поверхности базальной мембраны.

[0061] Предмет исследования/гипотеза: Каким образом сторона (т. е. эпителиальная, стромальная) и разные методологии обработки мембраны (т. е. DDHAM, DHAM и CHAM) в случае амниотических мембран (АМ) влияют на адгезию, пролиферацию и миграцию НСЕС?

[0062] Кроме того, гипотеза авторов данного изобретения заключается в том, что их запатентованный процесс децеллюляризации, направленный на полное удаление

остаточных клеточных компонентов, клеток, клеточного дебриса, ДНК, факторов роста и цитокинов, а также сохранение интактного врожденного коллагенового каркаса с необходимыми молекулами внеклеточного матрикса, в нативной 3-мерной форме, обеспечивает превосходную биосовместимость и способность поддерживать дифференцированные функции клеток по сравнению с другими продуктами, полученными из амниона, содержащими остаточные клетки, клеточный дебрис, ДНК и факторы роста, и цитокины.

[0063] Авторы данного изобретения разработали 3-слойную мембрану, названную 3L, которая отличается от однослойных мембран тем, что три слоя вместо одного высушиваются вместе, образуя новую конфигурацию материала. Перед процессом сушки мембраны был добавлен новый этап наслаивания, в результате чего появился продукт с неожиданными новыми свойствами и клиническими применениями. В рамках этой новой композиции амнион наслаивают так, чтобы он состоял из трех слоев, причем стромальная сторона обращена наружу сверху и снизу. Эту мембрану наслаивают саму на себя и сушат с образованием трехслойной мембраны из одной и той же амниотической мембраны.

[0064] Полученный авторами данного изобретения новый продукт состоит из амниотической мембраны, которую отделяют от плаценты и помещают в мягкий детергент, 1% дезоксиголевую кислоту, для промокания. Амниотическую мембрану подвергают механическому соскабливанию с целью удаления почти 100% амниоцитов и клеток хориона с поверхности мембраны и подавляющего большинства фибробластов из ткани.

[0065] Конечным продуктом является трехслойная структурная ткань амниотической мембраны, состоящая из внеклеточного матрикса, который сохраняет нативную коллагеновую структуру амниотической мембраны, включая эластин и фибронектин, который связывается с коллагеном и другими компонентами матрикса.

[0066] Перед процессом сушки мембраны был добавлен новый этап наслаивания, в результате чего появился продукт с неожиданными новыми свойствами и клиническими применениями.

[0067] В рамках этой новой композиции амнион наслаивают так, чтобы он состоял из трех слоев, причем стромальная сторона обращена наружу сверху и снизу. После сушки амнион разрезают на кусочки требуемого размера, причем каждый отдельный кусочек помещают во внутренний пакет, маркируют, запечатывают и стерилизуют.

[0068] Неожиданные результаты Biovance 3L относятся к различиям в прикреплении, пролиферации и миграции эпителиальных клеток роговицы и конъюнктивы человека на стромальной и эпителиальной стороне 3L BIOVANCE Ocular. Кроме того, процесс децеллюляризации оказывает влияние на характеристики амниотической мембраны.

[0069] Статистический анализ: Независимые переменные представляют собой АМ (DDHAM, DHAM, CHAM), сторону (эпителиальная, стромальная) и время (1-е сутки, 4-е сутки и 7-е сутки). Зависимые переменные представляют собой адгезию, пролиферацию и миграцию клеток. Следующие результаты относятся к эпителиальным клеткам роговицы человека как на эпителиальной, так и на стромальной стороне трех амниотических мембран (АМ): Biovance3L Ocular (DDHAM), AMBIO2 (DHAM) и AmnioGraft (CHAM).

[0070] Данные показаны как среднее \pm стандартное отклонение (SD). Данные были проверены и было обнаружено, что они приблизительно соответствуют нормальному распределению. Адгезию и миграцию клеток анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки. Пролиферацию клеток анализировали с помощью трехфакторного ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Результаты ANOVA представлены как F-критерий и связанные с ним степени свободы. При необходимости использовали непарные t-критерии как апостериорные

критерии. *P*-значение < 0,05 соответствовало статистической значимости. Все анализы проводили с использованием IBM SPSS (сборка 1.0.0.1444).

[0071] Трехслойный Biovance® представляет собой трехслойную децеллюляризованную дегидратированную амниотическую мембрану человека (DDHAM) с сохраненной естественной базальной мембраной эпителия и интактной структурой внеклеточного матрикса с ее биохимическими компонентами. Базальная мембрана эпителия и внеклеточный матрикс такого аллотрансплантата обеспечивают естественный скаффолд, который обеспечивает возможность клеточного прикрепления или инфильтрации и запас факторов роста. Трехслойный Biovance® обеспечивает защитное покрытие и поддерживает процессы заживления ран в организме. Трехслойный Biovance® в настоящее время продается как 3L Biovance® и Biovance® 3L Ocular.

[0072] Трехслойная децеллюляризованная дегидратированная амниотическая мембрана человека (DDHAM) Biovance® состоит из амниотической мембраны, которую отделяют от плаценты и помещают в мягкий детергент, 1% дезоксихолевою кислоту, для промокания. Амниотическую мембрану подвергают механическому соскабливанию с целью удаления почти 100% амниоцитов и клеток хориона с поверхности мембраны. Из ткани также удаляют подавляющее большинство фибробластов. Эту мембрану наслаивают саму на себя и сушат с образованием трехслойной версии продукта Biovance®. Конечным продуктом является структурная ткань, состоящая из внеклеточного матрикса, который сохраняет нативную коллагеновую структуру амниотической мембраны, включая фибронектин, который связывается с коллагеном и другими компонентами матрикса. Конечным продуктом является трехслойная амниотическая мембрана, лишенная клеток, гормонов, факторов роста и цитокинов.

[0073] Чтобы рационализировать и оптимизировать процесс производства трехслойного Biovance®, команда технологической разработки использовала все этапы обработки из производственного процесса Biovance®. Этап наслаивания был добавлен

перед этапом сушки мембраны. Этапы стерилизации и критерии выпуска также были перенесены из процесса Biovance® в процесс производства трехслойного Biovance®.

[0074] Амниотическую мембрану собирали в 1% раствор дезоксихолевой кислоты, и ее можно хранить при 2-8 оС в течение вплоть до 14 суток. После получения приемлемых результатов анализа крови матери амнион забирают из хранилища и начинают обработку. Перед наплаиванием амнион подвергается серии соскабливаний и промывок вручную. Амнион наплаивают так, чтобы он состоял из трех слоев, причем стромальная сторона обращена наружу сверху и снизу. После сушки амнион разрезают на кусочки требуемого размера, причем каждый отдельный кусочек помещают во внутренний пакет, маркируют, запечатывают и отправляют на визуальную проверку. В ходе визуальной проверки ткань проверяют на предмет размера, формы, отверстий, разрывов/надрывов, дебриса и пятен. После визуальной проверки каждый кусочек во внутреннем пакете помещают в маркированный внешний пакет, запечатывают и стерилизуют.

Результаты:

Адгезия клеток:

[0075] Адгезия клеток была выше на стромальной стороне ($12342,42 \pm 4536,60$ OE), чем на эпителиальной стороне AM ($9788,50 \pm 5704,17$ OE) (сторона как основной эффект, $F(1,18) = 6,714$, $p = 0,018$), что может объясняться более низкой адгезией клеток на эпителиальной стороне DHAM ($4247,75 \pm 2732,87$ OE), по сравнению со стромальной стороной DHAM ($13100,25 \pm 4675,24$ OE, $p = 0,017$), эпителиальной стороной DDHAM ($16725,25 \pm 1453,62$ OE, $p < 0,001$), эпителиальной стороной CHAM ($8392,50 \pm 1425,86$ OE, $p < 0,001$), стромальной стороной DDHAM ($16334,75 \pm 591,85$ OE, $p = 0,002$) и стромальной стороной CHAM ($7592,25 \pm 1073,22$ OE, $p < 0,001$) (сторона x AM, $p = 0,001$).

[0076] Кроме того, имела место значимая разница в адгезии клеток между AM (AM как основной эффект, $F(2,18) = 30,896$, $p < 0,001$), со значимо более высокой адгезией клеток на DDHAM ($16530,00 \pm 1048,46$ OE), чем на DHAM ($8674,00 \pm 5912,61$ OE, $p <$

0,001) и СНАМ ($7992,38 \pm 1244,16$ ОЕ, $p < 0,001$). Однако, как указано выше, адгезия клеток варьировалась в зависимости от стороны и АМ. Адгезия клеток была схожей между эпителиальной стороной DDHAM и стромальной стороной DDHAM ($p = 0,645$) и между эпителиальной стороной СНАМ и стромальной стороной СНАМ ($p = 0,404$). Однако, адгезия клеток была значимо более высокой на стромальной стороне DНАМ, чем на эпителиальной стороне DНАМ ($P = 0,017$). Следовательно, адгезия клеток была значимо более высокой на стромальной и эпителиальной стороне DDHAM, чем на эпителиальной стороне DНАМ ($p \leq 0,002$), эпителиальной стороне СНАМ (апостериорные критерии, $p < 0,001$) и стромальной стороне СНАМ (апостериорные критерии, $p < 0,001$), тогда как между стромальной стороной DDHAM и стромальной стороной DНАМ адгезия клеток была схожей ($p = 0,219$).

Таблица 4. Адгезия клеток в зависимости от стороны и амниотической мембраны. Представлены средние значения и стандартные отклонения.

Амниотическая мембрана	Эпителиальная сторона	Стромальная сторона	Всего
DDHAM	$16725,25 \pm 1453,62$	$16334,75 \pm 591,85$	$16530,00 \pm 1048,46$
DНАМ	$4247,75 \pm 2732,87$	$13100,25 \pm 4675,24^*$	$8674,00 \pm 5912,61$
СНАМ	$8392,50 \pm 1425,86$	$7592,25 \pm 1073,22$	$7992,38 \pm 1244,16$
ВСЕГО	$9788,50 \pm 5704,17$	$12342,42 \pm 4536,60^*$	$11065,46 \pm 5206,33$

*Статистически значимая разница между эпителиальной стороной и стромальной стороной.

Пролиферация клеток:

[0077] Хотя число живых клеток значимо снижалось на протяжении 7-суточного культивирования (время как основной эффект; $(F(2,54) = 44,880, p < 0,001)$), число клеток значимо варьировало в зависимости от стороны, АМ и времени (взаимодействие сторона \times АМ \times время; $(F(4,54) = 3,633, p = 0,011)$). Наиболее примечательно, что число клеток снижалось при всех переменных с течением времени, за исключением стромальной стороны DDHAM на 4-е сутки. На 4-е сутки относительная скорость пролиферации была

значимо более высокой на стромальной стороне DDHAM ($115,29 \pm 15,54\%$), чем на эпителиальной стороне DDHAM ($52,27 \pm 14,41\%$, $p < 0,001$), эпителиальной стороне DHAM ($12,54 \pm 16,79\%$, $p = 0,012$) и стромальной стороне CHAM ($15,00 \pm 6,73\%$, $p < 0,001$). Значимой разницы в относительной скорости пролиферации между стромальной стороной DDHAM и эпителиальной стороной CHAM ($46,83 \pm 25,69\%$, $p = 0,731$) или между стромальной стороной DDHAM и стромальной стороной DHAM ($95,54 \pm 44,25\%$, $p = 0,430$) не наблюдалось. Однако, показатели для стромальной стороны DHAM были значимо выше, чем для стромальной стороны CHAM ($p = 0,012$). Несмотря на снижение числа клеток начиная с 4-х суток, на 7-е сутки относительная скорость пролиферации была значимо более высокой на стромальной стороне DDHAM ($59,47 \pm 28,48\%$), чем на стромальной стороне CHAM ($6,87 \pm 1,77\%$, $p = 0,035$) и эпителиальной стороне DHAM ($7,54 \pm 5,84\%$, $p = 0,017$).

[0078] Число клеток также было значимо выше на стромальной стороне ($9383,33 \pm 6469,15$ OE), чем на эпителиальной стороне AM ($5648,00 \pm 5312,56$ OE, сторона как основной эффект; $F(1,54) = 39,545$, $p < 0,001$), что в значительной степени обусловлено значимо большим числом клеток на стромальной стороне, чем на эпителиальной стороне DDHAM и DHAM (взаимодействие сторона \times AM; $p < 0,001$); DDHAM, стромальная: $14972,00 \pm 4973,00$ OE в сравнении с DDHAM, эпителиальная: $10438,50 \pm 5555,98$ OE, $p = 0,047$; DHAM, стромальная: $10103,33 \pm 4336,49$ OE в сравнении с DHAM, эпителиальная: $1590,42 \pm 2431,25$ OE, $t(22) = 5,932$, $p < 0,001$). Наоборот, для CHAM наблюдали схожее число клеток на эпителиальной стороне ($4915,08 \pm 3072,42$ OE) и стромальной стороне ($3074,67 \pm 3401,09$ OE, $p = 0,178$).

[0079] Число клеток также значимо различалось между AM (AM как основной эффект; $F(2,54) = 79,570$, $p < 0,001$), со значимо большим числом клеток на DDHAM ($12705,25 \pm 5652,67$ OE), чем на CHAM ($3994,88 \pm 3306,13$ OE, $p < 0,001$). Значимой разницы в числе клеток между DDHAM и DHAM ($5846,88 \pm 5543,10$, $P = 0,065$) или между DHAM и

СНАМ ($p = 0,085$) не наблюдали. Схожее количество клеток в случае ДНАМ и СНАМ можно объяснить низким числом клеток на эпителиальной стороне ДНАМ ($1590,42 \pm 2431,25$ ОЕ), которое было значимо ниже, чем на стромальной стороне ДНАМ ($10103,33 \pm 4336,49$ ОЕ, $p < 0,001$), стромальной стороне ДДНАМ ($14972,00 \pm 4973,00$ ОЕ, $p < 0,001$), эпителиальной стороне ДДНАМ ($10438,50 \pm 5555,98$ ОЕ, $p < 0,001$) и эпителиальной стороне СНАМ ($4915,08 \pm 3072,42$ ОЕ, $p = 0,008$). Количество клеток на эпителиальной стороне ДНАМ и стромальной стороне СНАМ было схожим ($3074,67 \pm 3401,09$ ОЕ, $p = 0,117$).

Таблица 5. Пролиферация клеток в зависимости от стороны, амниотической мембраны и времени. Представлены средние значения и стандартные отклонения. Пролиферация клеток измерена как интенсивность флуоресценции (ОЕ).

Сторона и амниотическая мембрана	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	ВСЕГО
Эпителиальная сторона				
ДДНАМ	$16725,25 \pm 1453,62$	$8679,25 \pm 2092,53$	$5911,00 \pm 4747,52$	$10438,50 \pm 5555,98$
ДНАМ	$4247,75 \pm 2732,87$	$279,50 \pm 205,39$	$244,00 \pm 197,88$	$1590,42 \pm 2431,25$
СНАМ	$8392,50 \pm 1425,86$	$3884,50 \pm 2025,36$	$2468,25 \pm 1719,06$	$4915,08 \pm 3072,42$
Эпителиальная сторона, всего	$9788,50 \pm 5704,17$	$4281,08 \pm 3903,66$	$2874,42 \pm 3590,64$	$5648 \pm 5312,56$
Стромальная сторона				
ДДНАМ	$16334,75 \pm 591,85$	$18852,25 \pm 2882,54$	$9729,00 \pm 4776,66$	$14972,00 \pm 4973,00$
ДНАМ	$13100,25 \pm 4675,24$	$10992 \pm 1830,40$	$6217,75 \pm 3253,52$	$10103,33 \pm 4336,49$
СНАМ	$7592,25 \pm 1073,23$	$1102,00 \pm 442,57$	$529,75 \pm 175,43$	$3074,67 \pm 3401,09$

Сторона и амниотическая мембрана	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	ВСЕГО
Стромальная сторона, всего	12342,42 ± 4536,60	10315,42 ± 7795,43	5492,17 ± 4979,13	9383,33 ± 6469,15
ВСЕГО	11574,50 ± 5206,34	7298,25 ± 6771,29	4183,29 ± 4450,91	7515,67 ± 6170,94

Миграция клеток:

[0080] Миграция клеток значимо различалась между АМ (АМ как основной эффект; $F(2,49) = 6,819$, $p = 0,002$), при этом миграция клеток была значимо выше на DDHAM ($466085,13 \pm 98339,52$ пкс²), чем на СНАМ ($344471,06 \pm 106094,18$ пкс², $p = 0,003$). Кроме того, миграция клеток была значимо ниже в случае среды в качестве контроля, чем в случае DDHAM ($p < 0,001$), DНАМ ($420349,88 \pm 95109,86$ пкс², $p < 0,001$) и СНАМ ($p < 0,001$). Основной эффект в виде стороны отсутствовал, что указывает на то, что миграция клеток была схожей на эпителиальной ($421669,96 \pm 113435,95$ пкс²) и стромальной сторонах АМ ($389934,08 \pm 107979,51$ пкс², $F(1,49) = 0,701$, $P = 0,407$). Миграция клеток статистически не различалась по амниотической мембране и стороне ($p = 0,159$).

Таблица. 6. Площадь миграции. Представлены количества, средние значения и стандартные отклонения. Площадь миграции указывается как пкс².

Амниотическая мембрана и сторона	Миграция клеток
DDHAM	
Эпителиальная сторона	482961,50 ± 99654,98
Стромальная сторона	449208,75 ± 100701,20
DDHAM, всего	466085,13 ± 98339,52
DНАМ	
Эпителиальная сторона	461119,13 ± 90282,12
Стромальная сторона	379580,63 ± 86220,78
DНАМ, всего	420349,88 ± 95109,86
СНАМ	
Эпителиальная сторона	320929,25 ± 80791,60
Стромальная сторона	368012,88 ± 127772,77

Амниотическая мембрана и сторона	Миграция клеток
СНАМ, всего	344471,06 ± 106094,18*†
Среда в качестве контроля	145349,00 ± 58822,77
ВСЕГО	372451,59 ± 139865,11

* Статистически значимая разница по сравнению с DDHAM.

† Статистически значимая разница по сравнению со средой в качестве контроля.

Пример 4. Децеллюляризованный дегидратированный биоматериал, полученный из амниотической мембраны человека, поддерживает функцию эпителиальных клеток роговицы человека, и воспалительный ответ

[0081] Заявленная цель: Успешное применение биоматериалов на основе децеллюляризованной ткани для заживления ран требует компонентов матрикса, которые поддерживают функцию и дифференцировку клеток. Амниотическая мембрана (AM) представляет собой природный биоматериал из плацентарной ткани человека с уникальными биологическими и механическими свойствами, которые делают его подходящим для лечения глаз (1,2). Целью данного исследования является оценка эффектов стороны и методологии обработки AM в отношении функции эпителиальных клеток роговицы человека (HCEC) *in vitro*. Переменные эксперимента включают сторону AM (эпителиальная [E] и стромальная [S]) и методологию обработки AM (децеллюляризованная и дегидратированная [DDHAM], дегидратированная [DHAM] и подвергнутая криоконсервации [CHAM]). Зависимые переменные включают жизнеспособность, миграцию и воспалительный ответ для HCEC.

[0082] Способы: Были выбраны три по-разному обрабатываемые коммерчески доступные глазные AM: Biovance3L Ocular (DDHAM), Ambio2® (DHAM) и AmnioGraft® (CHAM). HCEC высевали на E- и S-стороны AM и инкубировали в течение 1, 4 и 7 суток. Жизнеспособность клеток измеряли в каждый момент времени на AM с использованием анализа alamarBlue. Кондиционированную среду из HCEC, культивированных на AM,

собирали, и эффект кондиционированной среды в отношении миграции НСЕС оценивали с использованием анализа методом зарастания царапины. Воспалительный ответ индуцировали путем обработки TNF α . Эффект АМ в отношении экспрессии генов провоспалительных белков в НСЕС сравнивали с использованием количественной полимеразной цепной реакции (qPCR). Уровень значимости для всех статистических тестов был принят как $p = 0,05$. Жизнеспособность клеток анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA), пролиферацию клеток анализировали с помощью трехфакторного ANOVA и экспрессию мРНК анализировали с помощью однофакторного ANOVA. Для ретроспективных анализов использовали критерий Тьюки и непарный критерий.

[0083] Результаты. На 1-е сутки жизнеспособность клеток была значимо выше на DDHAM-E&S, чем на CHAM-E&S ($p < 0,001$) и DHAM-E ($p \leq 0,002$). На 4-е сутки жизнеспособность клеток была значимо выше на DDHAM-S, чем в случае всех других переменных ($p \leq 0,004$, ФИГ. 1). Кроме того, на 4-е сутки жизнеспособность клеток была сопоставимой

[0084] между DDHAM-E и DHAM-S ($p = 0,147$) и значимо выше, чем DHAM-E ($p \leq 0,004$), CHAM-S&E ($p \leq 0,017$). На 7-е сутки жизнеспособность клеток была значимо выше на DDHAM-S, чем на DHAM-E ($p = 0,028$) и CHAM-S&E ($p \leq 0,049$). Жизнеспособность клеток была схожей между DDHAM-E и всеми другими переменными ($p \geq 0,097$).

Миграция НСЕС в присутствии кондиционированной среды из клеток, культивированных на DDHAM и DHAM, была сопоставимой ($p = 0,885$) и значимо большей, чем в случае клеток, выращенных на CHAM ($p \leq 0,005$). Интересно, что НСЕС, культивированные на DDHAM, принимали морфологию типа «бульбная мостовая» (ФИГ. 2), которая имитирует морфологию эпителиальных клеток глаза *in situ* (3). Миграция НСЕС в присутствии кондиционированной среды из клеток, культивированных на глазных скаффолдах, была значимо большей, чем в случае контрольной кондиционированной

среды из клеток, выращенных на пластмассовых планшетах для тканевых культур ($p < 0,001$). Более того, в ответ на воспалительную стимуляцию TNF α , экспрессия генов провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8 и TNF α) в HCEC на DDHAM показала первоначальное повышение с последующим снижением с течением времени (ФИГ. 3).

[0085] Вывод: В данном исследовании *in vitro* DDHAM-S лучше всего поддерживала жизнеспособность и миграцию HCEC. Присутствие DDHAM также со временем ослабляло воспалительный ответ HCEC.

[0086] Литературные источники

1. Walkden A. Clin Ophthalmol. 2020;14:2057-2072.
2. Malhotra C. World J Transplant. 2014;4(2):111-121.
3. Sosnová-Netuková M. Br J Ophthalmol. 2007;91(3):372-378.

Пример 5. Сравнение активности эпителиальных клеток роговицы человека и воспалительного ответа на глазных амниотических мембранах различной конструкции *in-vitro* и клинический пример

[0087] Амниотическая мембрана (АМ) представляет собой природный биоматериал с биологическими и механическими свойствами, важными с точки зрения офтальмологии. Эпителиальная сторона АМ способствует эпителизации, тогда как стромальная сторона регулирует воспаление. Однако, не все АМ являются одинаковыми. АМ подвергаются разным типам обработки, что приводит к изменениям в клеточном составе и структуре. В данном исследовании оцениваются эффекты стороны и обработки в отношении активности эпителиальных клеток роговицы человека (HCEC) и эффект обработки в отношении воспалительного ответа HCEC, а затем представлено описание случая. Были выбраны три по-разному обрабатываемые коммерчески доступные глазные АМ: (1) Biovance3L Ocular, децеллюляризованная дегидратированная АМ человека (DDHAM), (2) AMBIO2®, дегидратированная АМ человека (DHAM) и (3) AmnioGraft®, подвергнутая

криоконсервации АМ человека (СНАМ). НСЕС высевали на АМ и инкубировали в течение 1, 4 и 7 суток. Адгезию и жизнеспособность клеток оценивали с использованием анализа *alamarBlue*. Миграцию НСЕС оценивали с использованием анализа методом зарастания царапины. Воспалительный ответ индуцировали путем обработки TNF α . Эффект АМ в отношении экспрессии генов провоспалительных белков в НСЕС сравнивали с использованием количественной полимеразной цепной реакции (qPCR). Окрашивание подтверждало полную децеллюляризацию и отсутствие ядер в DDHAM. Активность НСЕС лучше всего поддерживалась на стромальной стороне DDHAM. При воспалительной стимуляции, DDHAM способствовала более высокому первичному воспалительному ответу, при этом с течением времени имела место тенденция к его снижению. В клинике DDHAM использовали для успешного лечения эпителиальной дистрофии базальной мембраны роговицы. По сравнению с DHAM и СНАМ, DDHAM оказывала значимые положительные эффекты в отношении видов клеточной активности НСЕС *in vitro*, что может свидетельствовать о большей совместимости для клеток глаза *in vivo*.

[0088] Введение: Амниотическая мембрана (АМ) представляет собой природный биоматериал с уникальными биологическими и механическими свойствами, которые делают его особенно подходящим для применения в офтальмологии (Leal-Marín et al. 2021; Walden, 2020; Liu et al. 2019; Malhotra & Jain, 2014; Fernandes et al. 2005). Считается, что ткань амниона способствует заживлению и реконструкции поверхности глаза за счет содействия эпителизации (Shayan et al. 2019; Meller et al. 2002; Meller et al. 1999), уменьшения воспаления (Sharma et al. 2016; Tabatabaei et al. 2017; Tandon et al. 2011), ингибирования образования рубцовой ткани (Niknejad et al. 2008, Tseng et al. 1999 Lee et al. 2000), блокирования новых кровеносных сосудов (Hao et al. 2000) и способности действовать как противомикробное средство (Mamede & Botelho, 2015; Tehrani et al. 2013; Sangwan et al. 2011; Kjaergaard et al. 2001; Kjaergaard et al. 1999, Inge et al. 1991). В

офтальмологии АМ широко применяется для лечения ряда состояний глаза. В клинике АМ можно использовать в качестве хирургической «заплатки», в качестве субстрата для замещения поврежденной ткани глаза или в комбинации, в качестве как «заплатки», так и субстрата.

[0089] В виде «заплатки», АМ действует как временная биологическая повязка или контактная линза, способствуя реэпителизации ткани хозяина под «заплаткой» (Walden, 2020, Malhotra & Jain, 2014), и помещается стромальной стороной вниз для подавления воспалительного ответа за счет захвата воспалительных клеток и индукции апоптоза (Dua et al. 2004; Shimmura et al. 2001). За счет размещения АМ эпителиальной стороной вверх, АМ действует как субстрат и скаффолд для миграции и роста эпителиальных клеток (Malhotra & Jain, 2014). Хотя широко распространено мнение, что АМ следует располагать эпителиальной стороной вверх, чтобы способствовать реэпителизации (Hu et al. 2003), было показано, что стромальная сторона мембраны поддерживает рост эпителиальных клеток (Seitz et al. 2006). Примечательно, что большая часть существующих исследований ограничивается криоконсервированными АМ, и остается неясным, применимы ли эти результаты также к другим АМ, которые подвергались обработке согласно отличным методологиям.

[0090] Перед клиническим применением АМ стерилизуют и обрабатывают, что приводит к изменению клеточного состава и структуры (Leal-Marín et al. 2021; von Versen-Nöynck et al. 2004; Lim et al. 2010). Эту ткань можно использовать напрямую, или ее можно подвергать дополнительному процессу децеллюляризации (Tehrani et al. 2021). Децеллюляризация представляет собой процесс, при котором эндогенные клетки, клеточный дебрис и остатки ДНК удаляют с целью предотвращения иммунного ответа, с сохранением при этом естественных структурных и химических элементов внеклеточного матрикса (ECM) (Gholipourmalekabadi et al. 2015). Предыдущие исследования продемонстрировали наличие корреляции между количеством остаточной ДНК в ECM-

продуктах и воспалительным ответом хозяина (Keane et al. 2012; Seif-Naraghi et al. 2013). Как и в случае с консервацией ткани, децеллюляризация также может влиять на структуры и образования внутри ECM (Aamodt & Grainger, 2016). Следовательно, успешные протоколы консервации-децеллюляризации должны тонко балансировать удаление клеточного материала и сохранение природных свойств и функциональных характеристик ECM (Gholipourmalekabadi et al. 2015; Aamodt & Grainger, 2016; Balestrini et al. 2015). Насколько известно, ни в одном исследовании не оценивалось, как различные протоколы консервации-децеллюляризации влияют на клеточную активность и воспалительный ответ эпителиальных клеток роговицы человека (HCEC).

[0091] Впервые, целью данного проекта является оценка следующего: эффект стороны амниотической мембраны (т. е. эпителиальной в сравнении со стромальной) и методологии обработки в отношении видов клеточной активности HCEC (т. е. адгезия, жизнеспособность и миграция), эффект разных методологий обработки в отношении воспалительного ответа HCEC (т. е. экспрессии провоспалительных цитокинов).

[0092] Следовательно, для сравнения использовали три по-разному обрабатываемые коммерчески доступные глазные АМ:

Biovance3L Ocular (Celularity, Флорхем Парк, Нью-Джерси), децеллюляризованная дегидратированная амниотическая мембрана человека (DDHAM),

AMBIO2® (Katena, Парсиппани, Нью-Джерси), дегидратированная амниотическая мембрана человека (DHAM),

AmnioGraft® (Biotissue, Майами, Флорида), подвергнутая криоконсервации амниотическая мембрана человека (CHAM).

[0093] Biovance®3L Ocular представляет собой трехслойную DDHAM. Она имеет уникальную конструкцию, где стромальная сторона обращена наружу. Следовательно, стромальная сторона соприкасается с поверхностью глаза независимо от ее ориентации.

Кроме того, наличие трех слоев повышает ее пригодность к обработке. АМ иссекают из доношенных плацент, промывают и соскабливают для удаления посторонних тканей и клеток. Затем ткань подвергают децеллюляризации с использованием осмотического шока с последующей обработкой мягким детергентом, сушкой и стерилизацией. Предыдущие исследования подтвердили, что этот запатентованный процесс децеллюляризации позволяет удалять остаточные клетки, клеточный дебрис, факторы роста и цитокины, с сохранением при этом ЕСМ-структуры с высоким содержанием коллагена и ключевыми биологически активными молекулами, такими как фибронектин, ламинин, гликозаминогликаны и эластин (Bhatia et al. 2007).

[0094] AMBIO2® представляет собой однослойную ДНАМ, обработанную в асептических условиях. С помощью процесса дегидратации удаляют влагу, с сохранением при этом структурного матрикса и биологических компонентов ткани (инструкции по применению, 2021 год), включая факторы роста и цитокины.

[0095] AmnioGraft® представляет собой однослойную СНАМ. АМ консервируют с использованием запатентованного способа криоконсервации, CRYOTEK®. Процесс криоконсервации делает амниотические эпителиальные клетки нежизнеспособными, с поддержанием при этом интактной клеточной структуры и сохранением факторов роста и цитокинов (Rodriguez-Ares et al. 2009).

[0096] DDНАМ сохраняет ее нативный ЕСМ, и при этом она лишена всех клеточных компонентов, ДНК, факторов роста и цитокинов. Следовательно, авторы предполагают, что DDНАМ обеспечит более благоприятный для клеток матрикс, поддерживающий клеточную активность и воспалительный ответ НСЕС, по сравнению с двумя другими глазными АМ, содержащими остаточную ДНК и другие клеточные компоненты. Результаты этого *in vitro* исследования дадут более глубокое понимание, как консервация и децеллюляризация ткани амниона влияет на активность эпителиальных клеток глаза человека. Оно также может пролить свет на клиническое применение DDНАМ для

лечения повреждений или дефектов, связанных с роговицей и конъюнктивой, такого как заживление дефектов эпителия роговицы, устранение птеригиума, реконструкция свода конъюнктивы и другие глазные процедуры.

[0097] Материалы и способы: Поскольку тестируемые материалы являются коммерчески доступными продуктами, и для данного исследования не требуется прямое взаимодействие с субъектами-людьми (донорами), одобрение институционального наблюдательного совета не требовалось.

[0098] Глазные АМ: В данном исследовании использовали три глазных АМ: DDHAM, DHAM и CHAM. Образцы DDHAM (партия № OCLR0010) и DHAM хранили при комнатной температуре. Образцы CHAM хранили при -80 °С. Манипуляции для всех АМ проводили в соответствии с инструкциями производителя. Образцы DDHAM были представлены в виде индивидуально упакованных дисков диаметром 10 мм. Следовательно, диски диаметром 10 мм были изготовлены из листа DHAM с использованием иглы для биопсии на 10 мм (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Каждый кусочек (5 см x 10 см) CHAM размораживали и промывали в 20 мл забуференного фосфатом солевого раствора (PBS) в чашке Петри в течение 10 минут (мин) для удаления криопротекторов, и с помощью иглы для биопсии на 10 мм из промытых АМ делали диски диаметром 10 мм. DDHAM является многослойной (трехслойной), при этом стромальная сторона АМ обращена наружу с обеих сторон. Для оценки влияния стороны DDHAM, получали по-другому сконструированную версию (трехслойную) с эпителиальной стороны АМ, обращенной наружу с обеих сторон, DDHAM(E). Диски диаметром 10 мм каждого образца АМ помещали в лунки 48-луночного планшета (1 диск/лунка) (48-луночный микропланшет с препятствующей прикреплению клеток поверхностью Greiner Bio-One, Монро, Северная Каролина, США) со стромальной или эпителиальной стороной АМ, контактирующей с клетками. Стерильное уплотнительное кольцо (McMaster-Carr, Роббинсвилл, Нью-Джерси, США)

шириной 2 мм и внутренним диаметром 7 мм помещали на верхнюю часть каждой АМ, чтобы АМ удерживалась на месте. Амниотические мембраны предварительно кондиционировали питательной средой (0,4 мл/лунка) при 37 °С в течение 2 часов (ч) перед высевом на них клеток. По меньшей мере две партии (доноры) каждого типа АМ использовали в данном исследовании. В каждом независимом эксперименте использовали четыре образца (n=4) из каждой АМ, из которых два образца были из одной партии, и два образца были из другой партии. По меньшей мере два независимых эксперимента проводили для каждого отдельного анализа.

[0099] Первичные клетки: Эпителиальные клетки роговицы человека (НСЕС, № по каталогу PCS-700-010, партия № 80915170), базовая среда для эпителиальных клеток роговицы и набор для выращивания эпителиальных клеток роговицы были приобретены у АТСС (Манассас, Вирджиния, США). Полную питательную среду для НСЕС готовили в соответствии с инструкциями производителя.

[00100] Оценка адгезии клеток к АМ: НСЕС после пассажа 4 (P4) культивировали до 80% конфлюентности на чашках для культивирования клеток диаметром 10 см согласно инструкциям производителя. Клетки один раз промывали 5 мл забуференного фосфатом солевого раствора (PBS)/чашка. Один миллилитр 0,25% трипсина (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) добавляли в каждую чашку и инкубировали при 37 °С в течение 5 мин. Два миллилитра минимальной поддерживающей среды альфа (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), содержащей 10% FBS, добавляли в чашку для нейтрализации трипсина. Клетки переносили в конические пробирки на 15 мл и центрифугировали при 1000 об/мин (число оборотов в минуту) в течение 5 мин. Клетки ресуспендировали в полной питательной среде и подсчитывали с использованием гемоцитометра.

[00101] НСЕС (2×10^4 /лунка) добавляли в каждую лунку, содержащую предварительно кондиционированные АМ. Планшеты инкубировали при 37 °С с 5% CO₂ и 95%

влажностью. После инкубации в течение 24 ч среду удаляли и клетки один раз промывали PBS. Жизнеспособность прикрепленных клеток выявляли, используя анализ alamarBlue. Вкратце, 0,2 мл/лунка раствора alamarBlue, состоящего из полной питательной среды + 10% реагента alamarBlue (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США), добавляли в каждую лунку и инкубировали при 37 °С в течение 45 мин. После инкубации 0,1 мл/лунка супернатанта переносили в 96-луночный планшет. Интенсивность флуоресценции измеряли, используя многорежимный ридер для микропланшетов (Spark®, TECAN, Швейцария) при возбуждении/испускании (Ex/Em) = 540 нм/590 нм. Интенсивность флуоресценции была выражена в относительных единицах (OE).

[00102] Окрашивание АМ и клеток: Для визуализации структурных элементов АМ, три разных АМ регидратировали, промывали и заливали в среду Tissue-Tek O.C.T. (Sakura, Торранс, Калифорния, США) в вертикальном положении. Криосрезы толщиной пять микрон/срез были сделаны с использованием криостата Leica CM1850 (Leica Biosystems, Буффало-Гров, Иллинойс, США). Криосрезы на предметных стеклах для микроскопа фиксировали 4% параформальдегидом в течение 1 ч и пермеабелизовали в 0,5% Triton X100 в PBS в течение 1 ч. Фиксированные и пермеабелизованные образцы окрашивали антителами к коллагену I типа человека (ab34710, Abcam, Кембридж, Массачусетс, США) в течение ночи. Затем образцы окрашивали конъюгированным с Alexa Fluor 555 антителом к IgG кролика, Alexa 488-фаллоидином (Life Technology, Карлсбад, Калифорния, США) и красителем Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) в течение 60 мин. После окрашивания на каждый образец клали покровные стекла в присутствии препятствующей выгоранию заливочной среды ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

[00103] Для визуализации живых клеток на разных АМ, НСЕС культивировали на разных АМ, как описано в разделе «Оценка адгезии клеток к амниотическим мембранам» в течение 1 или 4 суток. В каждый момент времени среду удаляли из каждой лунки, и в

каждую лунку добавляли 0,2 мл/лунка свежей полной питательной среды, содержащей 50 нМ кальцеина АМ (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). После инкубации в течение 30 мин при 37 °С среду удаляли. Клетки промывали два раза PBS, и они были готовы к визуализации.

[00104] Для визуализации морфологии клеток, клетки НСЕС, культивированные на разных АМ в течение 4 суток, фиксировали 4% параформальдегидом в течение 1 ч и пермеабелизовали в 0,5% Triton X100 в PBS в течение 1 ч. Фиксированные и пермеабелизованные клетки окрашивали Alexa 488-фаллоидином (Life Technology, Карлсбад, Калифорния, США) в течение 30 мин и наблюдали за ними под эпифлюоресцентным микроскопом (Zeiss Observer D1, Йена, Германия).

[00105] Н&Е-окрашивание АМ: Криосрезы АМ высушивали при 60 °С в течение ночи, фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 30 мин и три раза промывали PBS. Образцы окрашивали в растворе гематоксилина Гарриса (Sigma-Aldrich, Inc., Сент-Луис, Миссури) в течение 10 мин и промывали под проточной водой в течение 1 мин. Затем срезы два раза погружали в раствор для дифференциации (0,25 мл концентрированной соляной кислоты, добавленной к 100 мл 70% спирта). Далее срезы промывали под проточной водой в течение 1 мин, с последующим погружением в заместитель проточной воды Скотта (1% сульфат магния (MgSO₄) и 0,06% бикарбонат натрия) на 60 секунд. После 30-секундной промывки в 95% спирте образцы подвергали контрастному окрашиванию в спиртовом растворе эозина Y (Sigma-Aldrich, Inc., Сент-Луис, Миссури, 68178) в течение 10 мин. По завершении окрашивания срезы дегидратировали путем трех промывок в 100% абсолютном этаноле с последующими тремя промывками HistoClear II. Срезы заливали с использованием гистологической среды Permount (Fisher Scientific Inc.) и визуализировали с использованием микроскопа Zeiss Axio Observer A1.

[00106] Оценка жизнеспособности клеток на АМ со временем: НСЕС (1 × 10⁴/лунка) добавляли в каждую лунку 48-луночных планшетов, содержащую предварительно

кондиционированные АМ. Создавали три набора планшетов для каждого типа клеток и инкубировали их при 37 °С с 5% CO₂ и 95% влажностью в течение 1, 4 и 7 суток. В первый момент времени, среду из каждой лунки всех планшетов удаляли и добавляли свежую среду. Жизнеспособность клеток в первом наборе планшетов измеряли с использованием анализа alamarBlue. Второй и третий наборы планшетов культивировали при 37 °С. Во второй момент времени измеряли жизнеспособность клеток во втором наборе планшетов. Третий набор планшетов культивировали в свежей среде при 37 °С. Жизнеспособность клеток в третьем наборе планшетов измеряли с использованием анализа alamarBlue в третий момент времени.

[00107] Кондиционированная среда для анализа миграции: в условиях тестирования, НСЕС (2 × 10⁴/лунка) добавляли в каждую лунку 48-луночных планшетов, содержащую предварительно кондиционированные АМ. В контрольных условиях, к предварительно кондиционированным АМ не добавляли НСЕС. После культивирования в течение 24 ч, среду удаляли. В каждую лунку с клетками или без них добавляли 0,4 мл/лунка свежей питательной среды, и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Супернатанты (кондиционированная в течение 24 ч среда) собирали из каждой лунки и непосредственно использовали для анализа миграции. Для этого эксперимента использовали стромальные стороны АМ.

[00108] Анализ миграции методом зарастания царапины: в каждую лунку 48-луночных планшетов из культурального полистирола добавляли 5×10⁴/лунка НСЕС, и культивировали при 37 °С с 5% CO₂ и 95% влажностью в течение 2 суток. Царапины делали на конфлюэнтном монослое кончиком стерильной металлической палочки. Среда удаляли, и на царапину добавляли кондиционированную среду, собранную из клеток, культивированных на АМ. Изображения областей царапины получали через 0 ч. Для каждой тестируемой группы отслеживали как минимум четыре области. Планшеты инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Через 24 ч получали изображения точно тех же

областей царапины (отмеченных маркером). Области царапины измеряли с использованием программного обеспечения ImageJ (NIH) в относительных единицах (квадратные пиксели, пкс²). Площадь миграции = Площадь_{0 ч} - Площадь_{24 ч}.

[00109] Стимуляция воспалительных ответов НСЕС: НСЕС в концентрации 2×10^4 /лунка высевали и культивировали на разных АМ в течение 24 ч. Среду удаляли, и свежую среду «-фактор некроза опухоли альфа (TNF- α)» или свежую среду, содержащую 10 нг/мл TNF- α человека (№ по каталогу 300-01А, PeproTech, Кранбери, Нью-Джерси), «+TNF- α », добавляли к клеткам и инкубировали в течение 24 ч, 48 ч или 72 ч. В каждый момент времени супернатанты собирали для мультиплексного анализа и клетки лизировали в 0,2 мл лизирующего буфера для выделения РНК (Promega, Дарем, Северная Каролина) для анализа на основе количественной полимеразной цепной реакции (qPCR), как описано ниже.

[00110] Оценка относительной экспрессии мРНК с помощью qPCR: Количественную оценку относительной экспрессии генов цитокинов с помощью qPCR проводили, как было описано ранее (Mao et al. 2021). Вкратце, общую РНК из клеточных лизатов очищали с использованием системы для выделения общей РНК SV 96 (Promega). Концентрацию и чистоту РНК измеряли с использованием ридера TECAN Spark Nano (TECAN, Моррисвилль, Северная Каролина). Получение кДНК и qPCR проводили, как было описано (Mao et al. 2017). Праймеры для qPCR, используемые для данного исследования, были от QuantiTect (Qiagen, Джермантаун, Мэриленд): гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF: QT00000896), интерлейкин-6 (IL-6: QT00083720), интерлейкин-8 (IL-8: QT00000322), фактор некроза опухоли альфа (TNF- α : QT01079561) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH: QT01192646). Каждый образец анализировали в двух повторах. После завершения анализа, проводили второй производный анализ с использованием первичных данных для определения среднего C_p (точка пересечения-ПЦР-цикл) для каждого образца. Для каждой экспрессии генов,

экспрессия GAPDH служила в качестве внутреннего контроля. Относительную экспрессию мРНК определяли с помощью анализа по Pfaffl (ЕΔCp мишени/ЕΔCp эталона), в котором эффективность праймера $E = 10^{(-1/\text{наклон})}$ и $\Delta C_p = \text{среднее } C_p \text{ образца} - \text{среднее } C_p \text{ контроля}$. Экспрессию клеток на культуральном полистироле (TCP) или экспрессию клеток через 24 ч использовали в качестве «контроля» для анализов, что определялось в конкретном анализе в разделе «Результаты».

[00111] Статистические методы: в случае оценки активности НСЕС, независимые переменные представляли собой АМ (DDHAM, DHAM, CHAM), сторону (эпителиальная, стромальная) и время (1-е сутки, 4-е сутки и 7-е сутки). Зависимые переменные представляли собой адгезию клеток, жизнеспособность клеток и миграцию. В случае оценки воспалительного ответа НСЕС по экспрессии мРНК, независимые переменные представляли собой амниотическую мембрану (DDHAM, DHAM, CHAM, контроль [TCP]), состояние (покой, стимулированные) и время (24 ч, 48 ч и 72 ч). В случае оценки воспалительного ответа НСЕС по уровням белка, независимые переменные представляли собой амниотическую мембрану (DDHAM, DHAM, CHAM, контроль [TCP]) и состояние (покой, стимулированные, только АМ). Зависимые переменные представляли собой относительную экспрессию мРНК цитокинов (GM-CSF, IL-6, IL-8 и TNF- α) и белковые уровни цитокинов и хемокинов (GM-CSF, IL-1 β , IL-1RA, IL-6, IL-8, TGF β 2 и VEGF).

[00112] Все анализы проводили с использованием IBM SPSS (сборка 1.0.0.1444). Уровень значимости для всех статистических тестов был принят как $p = 0,05$. Данные были проверены и было обнаружено, что они соответствуют нормальному распределению. Адгезию и миграцию клеток анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки. Пролиферацию клеток анализировали с помощью трехфакторного ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Относительную экспрессию мРНК через 24 ч анализировали с помощью двухфакторного ANOVA с апостериорным критерием Тьюки для оценки каждой

зависимой переменной в каждом из тестируемых условий. Относительную экспрессию мРНК с течением времени анализировали с помощью однофакторного ANOVA с апостериорным критерием Тьюки для оценки каждой зависимой переменной в каждом из тестируемых условий. Значимые взаимодействия оценивали с помощью простого анализа основных эффектов с поправкой Сидака для множественных сравнений. В тексте и на Фигурах данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (SD)

Результаты:

[00113] Структура AM: Для оценки структур этих трех AM, поперечные срезы AM окрашивали по клеточным компонентам (ДНК и актин) и ECM (коллаген I типа) (ФИГ. 8A). Хотя сильное окрашивание ядер и актина было выявлено в DHAM и CHAM, ни окрашивание актина, ни ядер не было выявлено в DDHAM. Присутствие коллагена I типа выявляли во всех трех AM. H&E-окрашивание трех AM (ФИГ. 8B) подтверждало полную децеллюляризацию и отсутствие ядер в DDHAM, по сравнению с DHAM и CHAM. DHAM показала незначительное окрашивание в виде темно-синих остатков ядер, тогда как CHAM показала интактное темно-синее окрашивание ядер, что указывает на наличие клеток.

[00114] Адгезия HSEC на разных AM: Адгезию клеток на разных AM и разных сторонах AM оценивали путем сравнения жизнеспособности клеток (отражающей количество прикрепленных клеток) через 24 ч. Интенсивность флуоресценции была выражена в относительных единицах (OE).

[00115] Эффект стороны. Адгезия клеток была выше на стромальной стороне, чем на эпителиальной стороне AM (сторона как основной эффект, $p = 0,018$), что можно объяснить низкой адгезией клеток на эпителиальной стороне DHAM, по сравнению со стромальной стороной DHAM ($p < 0,001$; сторона \times AM, $p = 0,001$; ФИГ. 9). Значимой разницы между эпителиальной и стромальной сторонами DDHAM ($p = 0,822$) или между эпителиальной и стромальной сторонами CHAM ($p = 0,645$) не наблюдали.

[00116] Эффект АМ. Кроме того, имела место значимая разница в адгезии клеток между АМ (АМ как основной эффект, $p < 0,001$), со значимо более высокой адгезией клеток на DDHAM, чем на DHAM ($p < 0,001$) и CHAM ($p < 0,001$). Однако, как было указано ранее, адгезия клеток варьировалась в зависимости от стороны и АМ ($p = 0,001$; ФИГ. 9). На эпителиальной стороне, адгезия клеток была значимо более высокой на DDHAM, чем на DHAM ($p < 0,001$) и CHAM ($p < 0,001$), и значимой разницы между CHAM и DHAM ($p = 0,076$) не наблюдали. На стромальной стороне, адгезия клеток была значимо более низкой на CHAM, чем на DDHAM ($p < 0,001$) и DHAM ($p = 0,014$), и значимой разницы между DDHAM и DHAM ($p = 0,207$) не наблюдали. Эти результаты указывают на то, что среди этих трех АМ, эпителиальная и стромальная стороны DDHAM лучше всего поддерживали адгезию клеток.

[00117] Жизнеспособность и морфология НСЕС на разных АМ на 4-е сутки: Окрашивание живых эпителиальных клеток. Жизнеспособность НСЕС на стромальной стороне разных АМ (DDHAM, CHAM, DHAM) наблюдали через 4 суток после высева клеток (ФИГ. 10). В соответствии с количественными результатами, НСЕС на DDHAM и DHAM прикреплялись и распространялись на 4-е сутки после высева клеток, тогда как НСЕС на CHAM выглядели дезорганизованными и принимали гетерогенную морфологию. Морфологию НСЕС на АМ отслеживали путем окрашивания по актину на 4-е сутки (ФИГ. 10). НСЕС на DDHAM принимали морфологию типа «бульжная мостовая» с плотной актиновой кольцевой структурой.

[00118] Жизнеспособность клеток на разных АМ со временем: Жизнеспособность клеток на разных АМ отслеживали на протяжении периода времени вплоть до 7 суток. Хотя число живых клеток значимо снижалось на протяжении 7-суточного культивирования (время как основной эффект, $p < 0,001$), жизнеспособность клеток значимо варьировалась в зависимости от стороны, АМ и времени (взаимодействие сторона \times АМ \times время, $p = 0,011$). Наиболее примечательно, что жизнеспособность клеток

снижалась при всех переменных с течением времени, за исключением стромальной стороны DDHAM на 4-е сутки (ФИГ. 11А).

[00119] Эффект стороны. Жизнеспособность клеток также было значимо выше на стромальной стороне, чем на эпителиальной стороне AM (сторона как основной эффект, $p < 0,001$), что можно объяснить различиями в относительной жизнеспособности клеток между сторонами на 4-е и 7-е сутки (ФИГ. 11В). На 4-е сутки относительная жизнеспособность клеток была значимо более высокой на стромальной стороне DDHAM, чем на эпителиальной стороне и DDHAM ($p < 0,001$), и относительная жизнеспособность клеток была значимо более высокой на стромальной стороне DHAM, чем на эпителиальной стороне DHAM ($p < 0,001$). Наоборот, относительная жизнеспособность клеток была значимо более высокой на эпителиальной стороне CHAM, чем на стромальной стороне CHAM ($p = 0,039$). На 7-е сутки значимых различий в относительной жизнеспособности клеток между эпителиальной и стромальной сторонами DDHAM ($p = 0,102$) или CHAM ($p = 0,157$) не наблюдали. Однако, относительная жизнеспособность клеток была значимо более высокой на стромальной стороне DHAM, чем на эпителиальной стороне DHAM ($p < 0,001$).

[00120] Эффект AM. Число клеток также значимо различалось между AM (AM как основной эффект, $p < 0,001$), со значимо большим числом живых клеток на DDHAM, чем на DHAM ($p < 0,001$) и CHAM ($p < 0,001$), и значимо большим числом живых клеток на DHAM, чем на CHAM ($p = 0,036$). Основной эффект AM во многом объясняется значимыми различиями в относительной жизнеспособности клеток на 4-е и 7-е сутки (ФИГ. 11В).

[00121] На эпителиальной стороне, на 4-е сутки относительная жизнеспособность клеток была значимо более высокой на DDHAM, чем на DHAM ($p = 0,032$), при этом относительная жизнеспособность клеток была схожей между DDHAM и CHAM ($p =$

0,978) и между СНАМ и ДНАМ ($p = 0,077$). На эпителиальной стороне, на 7-е сутки значимых различий между тремя амниотическими мембранами не наблюдали ($p \geq 0,219$).

[00122] На стромальной стороне, на 4-е сутки относительная жизнеспособность клеток была значимо более высокой на DDНАМ, чем на СНАМ ($p < 0,001$), и относительная жизнеспособность клеток была значимо более высокой на ДНАМ, чем на СНАМ ($p < 0,001$). Значимой разницы в относительной жизнеспособности клеток на стромальной стороне на 4-е сутки между DDНАМ и ДНАМ ($p = 0,477$) не наблюдали. Однако, на стромальной стороне, на 7-е сутки относительная жизнеспособность клеток была значимо ниже на СНАМ, чем на DDНАМ ($p = 0,003$) и ДНАМ ($p = 0,002$). Как и в случае эпителиальной стороны, на стромальной стороне, на 7-е сутки значимой разницы в относительной жизнеспособности клеток между DDНАМ и ДНАМ ($p = 0,999$) не наблюдали.

[00123] Данные о более высокой жизнеспособности клеток на стромальной стороне АМ и лучшем поддержании жизнеспособности на DDНАМ, по сравнению с ДНАМ и СНАМ, свидетельствуют о том, что жизнеспособность клеток лучше всего поддерживалась на стромальной стороне DDНАМ.

[00124] Миграция НСЕС на разных АМ: Для оценки эффекта АМ отдельно в отношении миграции НСЕС тестировали кондиционированную среду из разных АМ в отсутствие НСЕС. Кроме того, сравнивали различия в миграции между АМ в присутствии клеток для определения того, влияют ли факторы, которые высвобождаются НСЕС, культивированными на разных АМ, на миграцию клеток. Клетки, культивированные на АМ, кондиционировали в течение 24 ч. Миграцию НСЕС в присутствии кондиционированной среды из разных АМ оценивали с использованием анализа методом зарастания царапины. Зарастание царапины отслеживали в течение 24 ч (Фигуры 12А и 12В).

[00125] Имело место значимое взаимодействие между эффектами амниотической мембраны и присутствием клеток ($p = 0,006$; Фигуры 12А и 12В). Миграция была значимо выше с клетками, чем без клеток на DDHAM ($p = 0,009$) и DHAM ($p < 0,001$). Миграция значимо не различалась в присутствии или в отсутствие клеток на CHAM ($p = 0,291$) или в случае контроля ($p = 0,265$).

[00126] Эффект AM. Кроме того, что касается кондиционированной среды (CM), собранной в присутствии клеток, миграция была значимо ниже в CM из клеток на CHAM, чем на DDHAM ($p = 0,004$) и DHAM ($p = 0,002$). Значимой разницы в миграции между DDHAM и DHAM ($p = 1,000$) не наблюдали. По сравнению с контролем в присутствии клеток, миграция была значимо выше в CM из клеток на DDHAM ($p < 0,001$), DHAM ($p < 0,001$) и CHAM ($p = 0,005$).

[00127] Экспрессия генов воспалительных цитокинов в HSEC: Поскольку сообщалось, что стромальная сторона AM осуществляет регуляцию воспалительного ответа (Dua et al. 2004; Shimmura et al. 2001), оценивали эффект стромальной стороны этих трех AM в отношении воспалительных ответов HSEC. Были выбраны цитокины, для которых ранее была продемонстрирована роль в заживлении ран, включая GM-CSF, IL-6, IL-8 или TNF- α (Rho et al. 2015; Arranz-Valsero et al. 2014; Ebihara et al. 2011; Nishida et al. 1992; Hafezi et al. 2018; Strieter et al. 1992; Koch et al. 1992; Wang et al. 2020; Yang et al. 2019). С этой целью воспалительный ответ HSEC в условиях воспаления *in vitro* имитировали путем стимуляции TNF- α в течение 24 ч. Экспрессию генов (относительные уровни мРНК) GM-CSF, IL-6, IL-8 или TNF- α в HSEC на разных AM оценивали с помощью qPCR, по сравнению с экспрессией генов в клетках, культивированных на стандартной поверхности для культивирования клеток, TCP.

[00128] GM-CSF. Экспрессия GM-CSF через 24 ч значимо варьировалась в зависимости от условий в отношении стимуляции (\pm TNF α) и AM ($p = 0,049$) (ФИГ. 13А). При стимуляции экспрессия GM-CSF значимо повышалась на DHAM ($p < 0,001$), но не на

DDHAM ($p = 0,226$), CHAM ($p = 0,664$) или TCP ($p = 0,827$). Сравнение экспрессии GM-CSF между амниотическими мембранами в условиях покоя показало схожую экспрессию GM-CSF на DDHAM, DHAM, CHAM и TCP ($p \geq 0,134$). Сравнение экспрессии GM-CSF между амниотическими мембранами в условиях наличия стимуляции показало значимо более высокую экспрессию на DHAM, чем на DDHAM ($p = 0,001$), CHAM ($p < 0,001$) и TCP ($p < 0,001$).

[00129] IL-6. Экспрессия IL-6 через 24 ч значимо варьировалась в зависимости от условий в отношении стимуляции и амниотической мембраны ($p = 0,002$) (ФИГ. 13B). При стимуляции экспрессия IL-6 значимо повышалась на DDHAM ($p < 0,001$), CHAM ($p = 0,017$) и TCP ($p = 0,014$), но не на DHAM ($p = 0,128$). Сравнение экспрессии IL-6 между амниотическими мембранами в условиях покоя показало схожую экспрессию IL-6 на DDHAM, DHAM, CHAM и TCP ($p \geq 0,717$). В условиях наличия стимуляции наблюдали значимо более высокую экспрессию IL-6 на DDHAM, чем на DHAM ($p < 0,001$), CHAM ($p < 0,001$) и TCP ($p < 0,001$). Других значимых различий обнаружено не было.

[00130] IL-8. Хотя экспрессия IL-8 через 24 ч в зависимости от условий в отношении стимуляции и AM значимо не варьировалась ($p = 0,188$), имели место основные эффекты условий в отношении стимуляции ($p < 0,001$) и AM ($p = 0,002$). При стимуляции значимо повышалась общая экспрессия IL-8. С помощью ретроспективных анализов было выявлено, что общая экспрессия IL-8 была значимо более высокой на DHAM, чем на CHAM ($p = 0,018$) и TCP ($p = 0,014$), и на DDHAM по сравнению с CHAM ($p = 0,022$) и TCP ($p = 0,017$). Значимой разницы в экспрессии IL-8 между DHAM и DDHAM ($p = 1,000$) или между CHAM и TCP ($p = 0,999$) не наблюдали.

[00131] TNF α . Хотя экспрессия TNF α через 24 ч в зависимости от условий в отношении стимуляции и AM значимо не варьировалась ($p = 0,194$), имели место основные эффекты условий в отношении стимуляции ($p = 0,001$) и AM ($p < 0,001$) (ФИГ. 13D). При стимуляции значимо повышалась общая экспрессия TNF α . С помощью ретроспективных

анализов было выявлено, что общая экспрессия TNF α была значимо более высокой на DDHAM, чем на CHAM ($p < 0,001$) и TCP ($p < 0,001$), и на DHAM по сравнению с CHAM ($p = 0,022$) и TCP ($p = 0,024$). Значимой разницы в экспрессии TNF α между DDHAM и DHAM ($p = 0,095$) или между CHAM и TCP ($p = 1,000$) не наблюдали.

[00132] Эти результаты указывают на то, что через 24 ч присутствие DDHAM и DHAM стимулировало экспрессию GM-CSF, IL-6, IL-8 и TNF- α в НСЕС в большей степени, чем в случае клеток на CHAM или TCP.

[00133] Экспрессия генов воспалительных цитокинов в НСЕС со временем: Воспалительный ответ является динамическим процессом. Экспрессия цитокинов в разные моменты времени указывает на стадию процесса заживления ран. Для оценки экспрессии цитокинов на протяжении отрезка времени 72 ч, экспрессию каждого цитокина анализировали с интервалом в 24 ч (Фигуры 14А – 14D).

[00134] Значимых изменений в экспрессии GM-CSF с течением времени в условиях наличия стимуляции для DDHAM ($p = 0,206$), DHAM ($p = 0,078$) или CHAM ($p = 0,215$) не наблюдали (ФИГ. 14А). Исключением был TCP, для которого в условиях наличия стимуляции наблюдали значимые изменения в экспрессии GM-CSF с течением времени ($p < 0,001$). Экспрессия GM-CSF на TCP с течением времени значимо повышалась с 24 до 72 ч ($p < 0,001$) и с 48 до 72 ч ($p < 0,001$). Экспрессия GM-CSF на TCP с 24 до 48 ч оставалась схожей ($p = 0,700$).

[00135] IL-6. Наблюдали статистически значимые изменения в экспрессии IL-6 в условиях наличия стимуляции с течением времени на DDHAM ($p = 0,007$), DHAM ($p < 0,001$), CHAM ($p < 0,001$) и TCP ($p = 0,002$) (ФИГ. 14В). Сравнение экспрессии IL-6 на DDHAM показало значимые снижения с 24 до 72 ч ($p = 0,007$) и с 48 до 72 ч ($p = 0,021$). Экспрессия IL-6 на DDHAM с 24 до 48 ч оставалась схожей ($p = 0,623$). Сравнение экспрессии IL-6 на DHAM с течением времени показало значимое повышение с 24 до 48 ч ($p = 0,003$), а затем значимое снижение с 48 до 72 ч ($p < 0,001$). Экспрессия IL-6 на DHAM

с 24 до 72 ч оставалась схожей ($p = 0,321$). Сравнение экспрессии IL-6 на СНАМ с течением времени показало значимые снижения с 24 до 48 ч ($p < 0,001$) и с 24 до 72 ч ($p < 0,001$). Экспрессия IL-6 на СНАМ не выявлялась ни через 48, ни через 72 ч. Для экспрессии IL-6 на ТСП с течением времени наблюдали значимое повышение с 24 до 48 ч ($p = 0,008$), а затем значимое снижение с 48 до 72 ч ($p = 0,002$). Экспрессия IL-6 на ТСП с 24 до 72 ч оставалась схожей ($p = 0,407$).

[00136] IL-8. Хотя наблюдались статистически значимые изменения в экспрессии IL-8 в условиях наличия стимуляции с течением времени на СНАМ ($p = 0,024$) и ТСП ($p < 0,001$), экспрессия IL-8 оставалась схожей с течением времени на DDHAM ($p = 0,179$) и DHAM ($p = 0,282$) (ФИГ. 14C). Экспрессия IL-8 на СНАМ значимо повышалась с 24 до 72 ч ($p = 0,040$) и с 48 до 72 ч ($p = 0,033$). Экспрессия IL-8 на СНАМ с 24 до 48 ч оставалась схожей ($p = 0,984$). Как и в случае СНАМ, экспрессия IL-8 на ТСП значимо повышалась с 24 до 72 ч ($p < 0,001$) и с 48 до 72 ч ($p < 0,001$). Экспрессия IL-8 на ТСП с 24 до 48 ч оставалась схожей ($p = 0,071$).

[00137] TNF- α . Хотя наблюдались статистически значимые изменения в экспрессии TNF- α в условиях наличия стимуляции с течением времени на DHAM ($p < 0,001$) и ТСП ($p = 0,005$), экспрессия TNF- α оставалась схожей с течением времени на DDHAM ($p = 0,125$) и СНАМ ($p = 0,519$) (ФИГ. 14D). Экспрессия TNF- α на DHAM с течением времени значимо повышалась с 24 до 48 ч ($p = 0,009$) и значимо снижалась с 24 до 72 ч ($p = 0,048$) и с 48 до 72 ч ($p < 0,001$). Кроме того, для экспрессии TNF- α на ТСП с течением времени наблюдали значимые повышения с 24 до 48 ч ($p = 0,035$) и с 24 до 72 ч ($p = 0,004$). Экспрессия TNF- α на ТСП с 48 до 72 ч оставалась схожей ($p = 0,201$).

[00138] Для разных АМ и цитокинов наблюдались разные тенденции в отношении изменения в относительных уровнях мРНК с течением времени. Хотя уровни экспрессии повышались со временем в клетках, культивированных на ТСП, экспрессия таких цитокинов имела тенденцию к снижению в клетках, культивированных на DDHAM.

[00139] Клинический пример: 87-летняя женщина обратилась с основной жалобой на ухудшение состояния левого глаза, возникшее в течение предыдущих нескольких месяцев. Она сообщила, что ей сложно разглядеть мелкий шрифт из-за дискомфорта и ощущения инородного тела при длительном чтении. В ее анамнезе были отмечены синдром сухого глаза, первичная открытоугольная глаукома, эпиретинальная мембрана и макулярные друзы в обоих глазах. Поддерживающее лечение включало смазывающие глазные капли, гиперосмотические средства и бандажные контактные линзы. В ее офтальмологической хирургической истории были удаление катаракты на обоих глазах и ИАГ-лазерная капсулотомия на обоих глазах. При осмотре были отмечены эпителиальные и субэпителиальные рубцы в конфигурации карта/точка. На основании клинических проявлений, анамнеза и тщательного обследования роговицы пациентке был поставлен диагноз эпителиальная дистрофия базальной мембраны роговицы (ABMD). С согласия пациентки было принято решение лечить эпителиальную дистрофию базальной мембраны роговицы хирургическим путем с использованием DDHAM в качестве субстрата для восстановления популяции передней поверхности роговицы нормальной мембраной Боумена (т.е. эпителием и эпителиальной базальной мембраной).

[00140] Удаление поврежденных частей эпителия роговицы и мембраны Боумена и размещение AM (без швов) проводили амбулаторно. Был применен местный анестетик и визуализировался неравномерный поверхностный эпителий (ФИГ. 15A). Алмазный бор использовали для аккуратного и равномерного удаления всего аномального, рыхлого эпителия роговицы (ФИГ. 15B), а также нижележащих субэпителиальных рубцов и дебриса ABMD (ФИГ. 15C). Затем эпителиальную поверхность промывали сбалансированным солевым раствором. DDHAM аккуратно размещали поверх очищенной мембраны (ФИГ. 15D) и накрывали бандажной контактной линзой для содействия устранению дискомфорта и заживлению (ФИГ. 15E). После операции пациентке было рекомендовано использовать капли на основе стероидов/антибиотиков 4 раза в сутки в

течение 10 суток, с постепенным снижением в течение 6 недель. Она проходила осмотр после операции через 1 неделю, 2 недели, 1 месяц и 2 месяца. Пациентка почти сразу же сообщила о повышении комфорта в отношении повседневной деятельности. При посещении через 1 месяц после операции трансплантат полностью растворился в тканях, и его остатков не было видно. Поверхность роговицы была гладкой и соответствовала норме (ФИГ. 15F).

Обсуждение

[00141] Предполагается, что структура базальной мембраны АМ способствует эпителизации поверхности глаза. Коллагеновый состав очень похож на таковой конъюнктивы и роговицы, что делает АМ подходящим субстратом для роста эпителиальных клеток. АМ способствует росту эпителия роговицы посредством четырех предложенных механизмов (Malhotra & Jain, 2014; Walkden et al. 2020): 1) облегчение миграции эпителиальных клеток (Meller et al. 2002; Meller et al. 1999), 2) усиление адгезии базальных эпителиальных клеток (Keene et al. 1987, Sonnenberg et al. 1991, Terranova et al. 1987), 3) содействие дифференцировке эпителиальных клеток (Guo et al. 1989; Streuli et al. 1991; Kurpakus et al. 1992) и 4) предотвращение апоптоза (Boudreau et al. 1996; Boudreau et al. 1995). Хотя имеются данные о том, стромальная поверхность может поддерживать рост эпителиальных клеток (Seitz et al. 2006), предполагается, что эпителизация происходит преимущественно на базальной мембране (Hu et al. 2003). Однако, большая часть существующих исследований ограничивается криоконсервированными АМ, поэтому неясно, применимы ли эти результаты к АМ, обработанным по-разному.

[00142] Разные методологии обработки могут способствовать изменению клеточного состава и структуры АМ, что может повлиять на функциональные характеристики ЕСМ (Gholipourmalekabadi et al. 2015). Предыдущая работа продемонстрировала значительные различия в составе и ультраструктуре между DDHAM и CHAM (Lim et al. 2010). Хотя криоконсервация является одной из наиболее широко используемых методик

консервации, она имеет некоторые недостатки, а именно, влияние на жизнеспособность и пролиферативную способность клеток, а также необходимость транспортировки и хранения при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kruse et al. 2000). Следовательно, настоящее исследование было направлено на сравнение того, как сторона и разные способы стерилизации, консервации и децеллюляризации влияют на адгезию, жизнеспособность и миграцию НСЕС. Как указано в предыдущих работах (Bhatia et al. 2007), авторы предполагают, что для идеальной глазной АМ требуется удаления клеток, ДНК, клеточного дебриса, остаточных факторов роста и цитокинов, а также адекватная консервация нативной архитектуры ЕСМ и биологически активных компонентов для предотвращения воспалительного ответа и содействия динамическим взаимодействиям между ЕСМ и клетками хозяина. Результаты настоящего исследования подтверждают гипотезу авторов данного изобретения, демонстрируя, что DDHAM представляет собой полностью децеллюляризованную АМ, тогда как DHAM и CHAM содержат остаточные клетки и ДНК. Затем было обнаружено, что DDHAM лучше всего поддерживает виды клеточной активности НСЕС. Кроме того, присутствие DDHAM усиливает первичный воспалительный ответ и предотвращает длительный воспалительный ответ в НСЕС в условиях воспаления *in vitro*.

[00143] Окрашивание подтверждает отсутствие клеток и ядер в DDHAM. Предыдущие исследования показали, что биологической эффективности АМ в офтальмологии способствует ее ЕСМ, а не клетки, сохраненные в АМ (Dua et al. 2004; Kubo et al. 2001; Kruse et al. 2000). Предполагается, что в децеллюляризованной АМ ЕСМ служит физическим каналом клеточной инфильтрации, посредством чего клетки хозяина и ЕСМ взаимодействуют, обеспечивая необходимый биохимический стимул для активации реакции заживления (Bhatia et al. 2007). Следовательно, в качестве предварительного этапа, для визуализации клеточного состава и структуры для каждой из трех АМ проводили окрашивание. Как иммунофлуоресцентное, так и Н&Е-окрашивание подтверждало полную децеллюляризацию и отсутствие ядер в DDHAM, при этом в случае

как ДНАМ, так и СНАМ наблюдали содержание ядер, остатки в ДНАМ и присутствие клеток в СНАМ.

[00144] Стромальная сторона DDНАМ лучше всего поддерживает виды клеточной активности НСЕС. Результаты этого исследования *in vitro* позволяют предположить, что стромальная часть DDНАМ лучше всего поддерживает активность НСЕС. Сторона не влияла на адгезию НСЕС на DDНАМ или СНАМ, однако адгезия НСЕС была значимо ниже на эпителиальной стороне ДНАМ. Разница в клеточной адгезии между DDНАМ и ДНАМ, двумя дегидратированными АМ, свидетельствует о том, что удаление клеточных компонентов, ДНК, факторов роста и цитокинов, обеспечивает более благоприятное для клеток окружение, поддерживающее прикрепление НСЕС.

[00145] При изучении в динамике, было обнаружено, что жизнеспособность клеток снижается для всех комбинаций сторон и АМ, за исключением стромальной стороны DDНАМ. На стромальной стороне DDНАМ, жизнеспособность клеток повышалась с 1-е сутки по 4-е сутки. Конкретная причина общего снижения жизнеспособности клеток не ясна. Присутствие клеток амниона (криоконсервированных или высушенных) в СНАМ или ДНАМ может ингибировать способность этих АМ поддерживать пролиферацию клеток роговицы. Хотя ранее сообщалось, что децеллюляризованная амниотическая мембрана является лучшим субстратом для эпителиальных клеток роговицы, чем свежий амнион (Koizumi et al. 2000), эти результаты позволяют предположить, что сторона также может быть влияющим фактором. Это исследование показало, что стромальная сторона DDНАМ является наиболее совместимым субстратом для роста НСЕС, тогда как ни эпителиальная, ни стромальная стороны СНАМ и ДНАМ, по-видимому, не поддерживают стабильно их адгезию и рост.

[00146] Эти данные дополнительно подтверждаются окрашиванием. На четвертые сутки DDНАМ продемонстрировала наиболее однородный характер роста НСЕС (ФИГ. 10). Как показывает окрашивание по актину, морфология и организация клеток на

DDHAM схожа с морфологией эпителиальных клеток роговицы *in situ* (Фигуры 11А и 11В) (Sosnová-Netuková et al. 2007). Эти наблюдения предполагают упорядоченный рост на АМ. Наоборот, характер роста на ДНАМ кажется дезорганизованным, и остается неясным, жизнеспособны или существуют ли НСЕС на СНАМ. Хорошо известно, что когда клетки подвергаются стрессу, они меняют фенотип (Kumar et al. 2013). Хотя существует множество факторов, которые следует учитывать, эти результаты позволяют предположить, что различия в процессах дегидратации, криоконсервации и децеллюляризации могут влиять на то, как клетки взаимодействуют с мембраной, особенно с точки зрения адгезии клеток и жизнеспособности клеток.

[00147] По-разному обработанные АМ также могут влиять на высвобождение факторов из культивируемых на них эпителиальных клеток. Для оценки эффекта АМ отдельно в отношении миграции НСЕС, в настоящем исследовании тестировали кондиционированную среду из трех разных АМ с клетками и без них, и было обнаружено, что НСЕС мигрировали в большей степени в присутствии кондиционированной среды с клетками, чем без клеток, на DDHAM и ДНАМ. Однако, различия в миграции НСЕС в присутствии кондиционированной среды с клетками или без них на СНАМ или на контроле не наблюдали. Эти данные свидетельствуют о том, что факторы, высвобождаемые клетками, способствуют миграции клеток за пределы таковых АМ (т. е. DDHAM и ДНАМ) отдельно. Кроме того, миграция НСЕС в присутствии кондиционированной среды из клеток на DDHAM и из клеток на ДНАМ была сопоставимой, и в обоих случаях она была значимо более высокой, чем для клеток на СНАМ. Одним из возможных объяснений этого обнаружения является то, что при сборе кондиционированной среды на СНАМ было меньше клеток. При меньшем количестве клеток стимулирующий эффект кондиционированной среды может быть ниже, что приводит к меньшей миграции в присутствии кондиционированной среды из клеток на СНАМ. Кроме того, миграция НСЕС в присутствии кондиционированной среды с

клетками была значимо более высокой на всех трех АМ, чем в случае среды в качестве контроля. В совокупности, эти данные свидетельствуют о том, что факторы, высвобождаемые из клеток и АМ, способствуют миграции клеток, и что высвобождаемые факторы варьируют в зависимости от АМ, что приводит к миграции большего количества НСЕС на DDHAM и DHAM, чем на CHAM. Необходимы дополнительные исследования для определения природы и источников этих факторов.

[00148] Был проведен дополнительный независимый эксперимент для определения того, влияет ли сторона на миграцию НСЕС. В эксперименте применялась та же методология, которая описана в разделах «Кондиционированная среда для анализа миграции» и «Анализ миграции методом зарастания царапины». Однако в этом эксперименте миграцию НСЕС в присутствии кондиционированной среды оценивали как на стромальной, так и на эпителиальной сторонах АМ. Результаты этого эксперимента подтвердили, что нет никакой разницы в миграции НСЕС в присутствии кондиционированной среды из клеток на эпителиальной или на стромальной сторонах АМ ($p = 0,407$; данные не показаны).

[00149] Традиционно АМ размещается как трансплантат эпителиальной стороной вверх для содействия эпителизации над дефектом. Как DHAM, так и CHAM имеют клиническую применимость, обусловленную конкретной стороной. Однако, DDHAM производится стромальной стороной наружу, чтобы соприкасаться с поверхностью глаза независимо от ориентации. Результаты этого исследования *in vitro* продемонстрировали, что активность НСЕС была наиболее высокой на стромальной стороне DDHAM, свидетельствуя, тем самым, о клинической применимости в качестве трансплантата. Более того, включенное описание случая продемонстрировало успешное применение DDHAM для лечения эпителиальной дистрофии базальной мембраны роговицы. Через месяц после операции поверхность роговицы была гладкой и считалась нормальной, что могло указывать на прогрессирующую реэпителизацию. Однако, необходимо гистологическое

исследование в дополнительные моменты времени, чтобы продемонстрировать реорганизацию и ремоделирование эпителия роговицы, ее базальной мембраны и слоя Боумана. Несмотря на то, что эти данные обнадеживают, необходимы дополнительные исследования *in vivo* с большим размером выборки для более полной оценки DDHAM, а также ее способности способствовать эпителизации на поверхности глаза.

[00150] DDHAM поддерживает первичный воспалительный ответ с последующим снижением такой тенденции с течением времени.

[00151] Противовоспалительные свойства AM хорошо известны (Sharma et al. 2016; Tabatabaei et al. 2017; Tandon et al. 2011). Согласно исследованиям *in vitro*, AM снижают экспрессию факторов роста и провоспалительных цитокинов из поврежденной ткани глаза (Solomon et al. 2001), а также захватывают воспалительные клетки и индуцируют апоптоз (Dua et al. 2004; Shimmura et al. 2001). Следовательно, вторичной целью этого исследования было оценить воспалительный ответ HSEC на различных AM. Это было достигнуто путем изучения непосредственной экспрессии мРНК, а также тенденций с течением времени. Учитывая их известную роль в заживлении ран роговицы, провоспалительные цитокины, GM-CSF, IL-6, IL-8 и TNF- α , были выбраны для оценки воспалительного ответа HSEC.

[00152] GM-CSF известен как воспалительный (van Nieuwenhuijze et al. 2013) и иммунорегуляторный цитокин (Parmiani et al. 2007), при этом его эффекты зависят от дозы и контекста (Bhattacharya et al. 2015; Parmiani et al. 2007; Shachar and Karin 2013). Известно, что этот мультипотентный цитокин играет важную роль в воспалении и заживлении ран, и более конкретно, он обладает доказанной способностью усиливать заживление ран роговицы как *in vitro*, так и *in vivo* (Rho et al. 2015). IL-6, IL-8 и TNF- α являются более традиционными провоспалительными цитокинами. Было показано, что помимо регуляции воспалительных и иммунных ответов IL-6 способствует заживлению ран роговицы *in vitro* и *in vivo* (Arranz-Valsero et al. 2014; Ebihara et al. 2011; Nishida et al.

1992; Hafezi et al. 2018). IL-8 является фактором роговицы, который индуцирует неоваскуляризацию и, как полагают, модулирует заживление ран (Strieter et al. 1992; Koch et al. 1992). Наконец, TNF- α участвует в воспалительном ответе в роговице и в заживлении ран после повреждений роговицы (Wang et al. 2020; Yang et al. 2019).

[00153] В настоящем исследовании наблюдалась более высокая экспрессия воспалительных цитокинов (т.е. IL-6, IL-8, TNF- α) в клетках, культивируемых на DDHAM, в первые 24 ч, с последующей тенденцией к снижению с течением времени. Эти наблюдения позволяют предположить, что присутствие DDHAM может способствовать первичному воспалительному ответу и предотвращать длительный воспалительный ответ в клетках HCEC, что может быть полезно в условиях заживления ран. Однако, для более полной оценки этих данных необходимы дополнительные исследования *in vivo*.

[00154] АМ используют для реконструкции поверхности глаза для лечения ряда глазных патологий, включая нарушения со стороны поверхности роговицы с дефицитом лимбальных стволовых клеток и без него (Maharajan et al. 2007; Sangwan et al. 2012), реконструкции поверхности конъюнктивы (например, удаление птеригиума [Röck et al. 2019; Akbari et al. 2017]), в качестве носителя для размножения *ex vivo* клеток лимбального эпителия (Rama et al. 2010; Shortt et al. 2009), при глаукоме (Sheha et al. 2008), неоплазии (Agrawal et al. 2017), формах некроза и перфораций склеры (Hanada et al. 2001; Ma et al. 2002), среди прочего. Учитывая ее потенциал для ускорения заживления, интеграции с тканями хозяина и предотвращения ответа на инородное тело, децеллюляризованная АМ в последние годы вызывает растущий интерес (Gholipourmalekabadi et al. 2015; Fenelon et al. 2019; Lim et al. 2010; Koizumi et al. 2000; Salah et al. 2018; Fransisco et al. 2016; Gholipourmalekabadi et al. 2016; Taghiabadi et al. 2015). Было показано, что адекватная консервация ЕСМ в децеллюляризованной АМ улучшает взаимодействие различных типов клеток в пределах АМ, что свидетельствует об улучшении адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток (Fenelon et al. 2019;

Koizumi et al. 2000; Salah et al. 2018; Fransisco et al. 2016; Gholipourmalekabadi et al. 2016; Taghiabadi et al. 2015). Более того, и это, пожалуй, самое главное, было показано, что децеллюляризованная АМ интегрируется в биологическую ткань с низкой иммуногенностью (Fenelon et al. 2019; Fransisco et al. 2016; Gholipourmalekabadi et al. 2016).

[00155] AmbioDry™ представляет собой однослойную АМ, которая была стерилизована электронным излучением при низкой дозе и консервирована посредством дегидратации с механическим удалением эпителиального слоя (Hovanesian, 2012). Хотя продукт больше не доступен, многое можно почерпнуть из научной оценки этого DDHAM-продукта (Memarzadeh et al. 2008; Chuck et al. 2004). Memarzadeh et al. продемонстрировали его способность действовать как эффективный аутооттрансплантат конъюнктивы для предотвращения рецидива птеригиума (Memarzadeh et al. 2008). Кроме того, биомеханическое исследование подтвердило, что эта DDHAM сохраняет требуемые эластичные характеристики при регидратации, что делает ее удобной с точки зрения манипуляций тканью для реконструкции поверхности глаза (Chuck et al. 2004). Несмотря на явные различия между AmbioDry™ и Biovance®3L Ocular, такие как уникальная трехслойная конструкция Biovance®3L Ocular, а также полное удаление клеток и ассоциированных с ними факторов роста (Bhatia et al. 2007), эти предыдущие публикации дают дополнительную информацию о DDHAM-продуктах и их клиническом применении в офтальмологии.

[00156] Хотя результаты настоящего исследования обнадеживают, существует несколько ограничений. Прежде всего, результаты исследований *in vitro* не применимы напрямую к клиническому применению. Превосходная совместимость с эпителиальными клетками глаза не обязательно означает клиническое улучшение в отношении заживления ран глаз. В отличие от этого исследования *in vitro*, в тканях *in vivo* существуют и взаимодействуют друг с другом многие типы клеток. Клеточное поведение одного типа

клеток не обязательно отражает ответы ткани. Однако, несмотря на эти ограничения, это исследование уникально в сравнении активности клеток глаза и воспалительного ответа на трех коммерчески доступных АМ. Кроме того, это исследование является первым, которое продемонстрировало эффект стороны АМ в отношении клеточной активности.

Вывод:

[00157] В целом было показано, что DDHAM поддерживает лучшую функциональность HSEC *in vitro*, что может свидетельствовать о большей совместимости с клетками глаза *in vivo*. Необходимы дополнительные исследования для оценки ответа в виде заживления ран DDHAM, а также ее клинического применения и результатов.

Литературные источники

Leal-Marín S, Kern T, Hofmann N, Pogozhykh O, Framme C, Börgel M, Figueiredo C, Glasmacher B, Gryshkov O. Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2021;109:1198-1215.

Walkden A. Amniotic membrane transplantation in Ophthalmology: an updated perspective. *Clin Ophthalmol.* 2020;14:2057-2072.

Liu J, Li L, Li X. Effectiveness of Cryopreserved Amniotic Membrane Transplantation in Corneal Ulceration: A Meta-Analysis. *Cornea.* 2019 Apr;38:454-462.

Malhotra C, Jain AK. Human amniotic membrane transplantation: different modalities of its use in ophthalmology. *World J Transplant.* 2014;4:111-121.

Meller D, Pauklin M, Thomasen H, Westekemper H, Steuhl KP. Amniotic membrane transplantation in the human eye. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108:243-248.

Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea.* 2005;24:643-653.

Shayan Asl N, Nejat F, Mohammadi P, Nekoukar A, Hesam S, Ebrahimi M, Jadidi K. Amniotic membrane extract eye drop promotes limbal stem cell proliferation and corneal epithelium healing. *Cell J.* 2019;20:459-468.

Meller D, Pires RT, Tseng SC. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *Br J Ophthalmol*. 2002;86:463-471.

Meller D, Tseng SC. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:878-886.

Sharma N, Singh D, Maharana PK, Kriplani A, Velpandian T, Pandey RM, Vajpayee RB. Comparison of amniotic membrane transplantation and umbilical cord serum in acute ocular chemical burns: a randomized controlled trial. *Am J Ophthalmol*. 2016;168:157-163.

Tabatabaei SA, Soleimani M, Behrouz MJ, Torkashvand A, Anvari P, Yaseri M. A randomized clinical trial to evaluate the usefulness of amniotic membrane transplantation in bacterial keratitis healing. *Ocul Surf*. 2017;15:218–226.

Tandon R, Gupta N, Kalaivani M, Sharma N, Titiyal JS, Vajpayee RB. Amniotic membrane transplantation as an adjunct to medical therapy in acute ocular burns. *Br J Ophthalmol*. 2011;95:199–204.

Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cells Mater*. 2008;15:88-99.

Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol*. 1999;179:325–335.

Lee SB, Li DQ, Tan DT, Meller DC, Tseng SC. Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res*. 2000;20:325-334.

Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*. 2000; 19:348-352.

Mamede AC, Botelho MF. Amniotic membrane: origin, characterization and medical applications. Mamede AC, Botelho MF, editors. New York, NY: Springer; 2015.

Tehrani FA, Peirovi H, Niknejad. Determination of antibacterial effect of the epithelial and mesenchymal surfaces of amniotic membrane on escherichia coli, staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa. Qom Univ Med Sci J. 2013;7:12-22.

Sangwan VS, Basu S. Antimicrobial properties of amniotic membrane. Br J Ophthalmol. 2011;95:1.

Kjaergaard N, Hein M, Hyttel L, Helmig RB, Schønheyder HC, Uldbjerg N, Madsen H. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2001;94:224-229.

Kjaergaard N, Helmig RB, Schonheyder HC, Uldbjerg N, Hansen ES, Madsen H. Chorioamniotic membranes constitute a competent barrier to group b streptococcus in vitro. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1999;83:165–169.

Inge E, Talmi YP, Sigler L, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. Placenta. 1991;12:285-288.

Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. Surv Ophthalmol. 2004;49:51-77.

Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. Cornea. 2001;20:408-413.

Hu DJ, Basti A, Wen A, Bryar PJ. Prospective comparison of corneal re-epithelialization over the stromal and basement membrane surfaces of preserved human amniotic membrane. ARVO Annual Meeting Abstract, 2003.

Seitz B, Resch MD, Schlötzer-Schrehardt U, Hofmann-Rummelt C, Sauer R, Kruse FE. Histopathology and ultrastructure of human corneas after amniotic membrane transplantation. Arch Ophthalmol; 2006;124:1487–1490.

von Versen-Höynck F, Syring C, Bachmann S, Möller DE. The influence of different preservation and sterilisation steps on the histological properties of amnion allografts—light and scanning electron microscopic studies. Cell Tissue Bank. 2004;5:45-56.

Lim LS, Poh RW, Riau AK, Beuerman RW, Tan D, Mehta JS. Biological and ultrastructural properties of acelagraft, a freeze-dried γ -irradiated human amniotic membrane. *Arch Ophthalmol*. 2010;128:1303-1310.

Tehrani FD, Firouzeh A, Shabani I, Shabani A. A review on modifications of amniotic membrane for biomedical applications. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;13;8:606982.

Gholipourmalekabadi M, Mozafari M, Salehi M, et al. Development of a cost-effective and simple protocol for decellularization and preservation of human amniotic membrane as a soft tissue replacement and delivery system for bone marrow stromal cells. *Adv Healthc Mater*. 2015;4:918-926.

Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*. 2012;33:1771-1781.

Seif-Naraghi SB, Singelyn JM, Salvatore MA, Osborn KG, Wang JJ, Sampat U, Kwan OL, Strachan GM, Wong J, Schup-Magoffin PJ, Braden RL, Bartels K, DeQuach JA, Preul M, Kinsey AM, DeMaria AN, Dib N, Christman KL. Safety and efficacy of an injectable extracellular matrix hydrogel for treating myocardial infarction. *Sci Transl Med*. 2013;5:173ra25.

Aamodt JM, Grainger DW. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials*. 2016;86:68-82.

Balestrini JL, Gard AL, Liu A, et al. Production of decellularized porcine lung scaffolds for use in tissue engineering. *Integr Biol (Camb)*. 2015;7:1598-1610.

Bhatia M, Pereira M, Rana H, et al. The mechanism of cell interaction and response on decellularized human amniotic membrane: implications in wound healing. *Wounds*. 2007;19:207-217.

Rodríguez-Ares MT, López-Valladares MJ, Touriño R, Vieites B, Gude F, Silva MT, Couceiro J. Effects of lyophilization on human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol*. 2009;87:396-403.

Keene DR, Sakai LY, Lunstrum GP, Morris NP, Burgeson RE. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol.* 1987;104:611-621.

Sonnenberg A, Calafat J, Janssen H, Daams H, van der Raaij-Helmer LM, Falcioni R, Kennel SJ, Aplin JD, Baker J, Loizidou M, et al. Integrin alpha 6/beta 4 complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J Cell Biol.* 1991;113(4):907-917.

Terranova VP, Lyall RM. Chemotaxis of human gingival epithelial cells to laminin. A mechanism for epithelial cell apical migration. *J Periodontol.* 1986;57(5):311-317.

Guo M, Grinnell F. Basement membrane and human epidermal differentiation in vitro. *J Invest Dermatol.* 1989;93:372-378.

Kurpakus MA, Stock EL, Jones JC. The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Dev Biol.* 1992;150:243-255.

Streuli CH, Bailey N, Bissell MJ. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol.* 1991;115:1383-95.

Boudreau N, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:3509-3513.

Boudreau N, Sympton CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science.* 1995;267:891-893.

Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42:1539-1546.

Kruse FE, Jousseaume AM, Rohrschneider K, et al. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2000;238: 68-75.

Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:2506-2513.

Sosnová-Netuková M, Kuchynka P, Forrester JV. The suprabasal layer of corneal epithelial cells represents the major barrier site to the passive movement of small molecules and trafficking leukocytes. *Br J Ophthalmol.* 2007;91:372-378.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Cell Injury, Cell Death, and Adaptations. B: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, ed. *Robins Basic Pathology.* Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013:1-28.

Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of Interleukin 1 alpha and Interleukin 1 beta in the human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol.* 2001;85: 444-449.

van Nieuwenhuijze A, Koenders M, Roeleveld D, Sleeman MA, van den Berg W, Wicks IP. GM-CSF as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Mol Immunol.* 2013;56:675-682.

Parmiani G, Castelli C, Pilla L, Santinami M, Colombo MP, Rivoltini L. Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Ann Oncol.* 2007;18:226-232.

Bhattacharya P, Budnick I, Singh M, Thiruppathi M, Alharshawi K, Elshabrawy H, Holterman MJ, Prabhakar BS. Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy. *J Interferon Cytokine Res.* 2015;35:585-599.

Shachar I, Karin N. The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. *J Leukoc Biol.* 2013;93:51-61.

Rho CR, Park MY, Kang S. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating (GM-CSF) factor on corneal epithelial cells in corneal wound healing model. *PLoS One.* 2015;10:e0138020.

Hafezi F, Gatziofufas Z, Angunawela R, Ittner LM. Absence of IL-6 prevents corneal wound healing after deep excimer laser ablation in vivo. *Eye (Lond).* 2018;32:156-157.

Arranz-Valsero I, Soriano-Romaní L, García-Posadas L, López-García A, Diebold Y. IL-6 as a corneal wound healing mediator in an in vitro scratch assay. *Exp Eye Res.* 2014;125:183-192.

Ebihara N, Matsuda A, Nakamura S, Matsuda H, Murakami A. Role of the IL-6 classic- and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:8549-8557.

Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T, Hikida M. Interleukin 6 facilitates corneal epithelial wound closure in vivo. *Arch Ophthalmol.* 1992;110:1292-1294.

Strieter RM, Kunkel SL, Elnor VM, Martonyi CL, Koch AE, Polverini PJ, Elnor SG. Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization. *Am J Pathol.* 1992;141:1279-1284.

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.* 1992;258:1798-1801.

Wang X, Zhang S, Dong M, Li Y, Zhou Q, Yang L. The proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α modulate corneal epithelial wound healing through p16Ink4a suppressing STAT3 activity. *J Cell Physiol.* 2020;235:10081-10093.

Yang L, Zhang S, Duan H, Dong M, Hu X, Zhang Z, Wang Y, Zhang X, Shi W, Zhou Q. Different effects of pro-inflammatory factors and hyperosmotic stress on corneal epithelial stem/progenitor cells and wound healing in mice. *Stem Cells Transl Med.* 2019;8:46-57.

Sangwan VS, Basu S, MacNeil S, Balasubramanian D. Simple limbal epithelial transplantation (SLET): a novel surgical technique for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol.* 2012 Jul;96(7):931-934.

Maharajan VS, Shanmuganathan V, Currie A, Hopkinson A, Powell-Richards A, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: indications and outcomes. *Clin Exp Ophthalmol.* 2007 Mar;35:140-147.

Röck T, Bramkamp M, Bartz-Schmidt KU, Röck D. A retrospective study to compare the recurrence rate after treatment of pterygium by conjunctival autograft, primary closure, and amniotic membrane transplantation. *Med Sci Monit.* 2019;25:7976-7981.

Akbari M, Soltani-Moghadam R, Elmi R, Kazemnejad E. Comparison of free conjunctival autograft versus amniotic membrane transplantation for pterygium surgery. *J Curr Ophthalmol.* 2017;29:282-286.

Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med.* 2010;363:147-155.

Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, Daniels JT. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials.* 2009;30:1056-65.

Sheha H, Kheirkhah A, Taha H. Amniotic membrane transplantation in trabeculectomy with mitomycin C for refractory glaucoma. *J Glaucoma.* 2008;17:303-307.

Agraval U, Rundle P, Rennie IG, Salvi S. Fresh frozen amniotic membrane for conjunctival reconstruction after excision of neoplastic and presumed neoplastic conjunctival lesions. *Eye (Lond).* 2017;31:884-889.

Hanada K, Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. *Am J Ophthalmol.* 2001;131:324-331.

Ma DH, Wang SF, Su WY, Tsai RJ. Amniotic membrane graft for the management of scleral melting and corneal perforation in recalcitrant infectious scleral and corneoscleral ulcers. *Cornea.* 2002;21:275-283.

Fenelon M, Maurel DB, Siadous R, et al. Comparison of the impact of preservation methods on amniotic membrane properties for tissue engineering applications. *Mat Sci Eng C.* 2019;104:109903.

Salah RA, Mohamed IK, El-Badri N. Development of decellularized amniotic membrane as a bioscaffold for bone marrow-derived mesenchymal stem cells: ultrastructural study. *J Mol Histol.* 2018;49:289-301.

Francisco JC, Correa Cunha R, Cardoso MA, Baggio Simeoni R, Mogharbel BF, Picharski GL, Silva Moreira Dziedzic D, Guarita-Souza LC, Carvalho KA. Decellularized Amniotic Membrane Scaffold as a Pericardial Substitute: An In Vivo Study. *Transplant Proc.* 2016;48:2845-2849.

Gholipourmalekabadi M, Sameni M, Radenkovic D, Mozafari M, Mossahebi-Mohammadi M, Seifalian A. Decellularized human amniotic membrane: how viable is it as a delivery system for human adipose tissue-derived stromal cells? *Cell Prolif.* 2016;49:115-121.

Taghiabadi E, Nasri S, Shafieyan S, Firoozinezhad SJ, Aghdami N. Fabrication and characterization of spongy denuded amniotic membrane based scaffold for tissue engineering. *Cell J.* 2015;16:476-487.

Memarzadeh F, Fahd AK, Shamie N, Chuck RS. Comparison of de-epithelialized amniotic membrane transplantation and conjunctival autograft after primary pterygium excision. *Eye (Lond).* 2008;22:107-112.

Chuck RS, Graff JM, Bryant MR, Sweet PM. Biomechanical characterization of human amniotic membrane preparations for ocular surface reconstruction. *Ophthalmic Res.* 2004;36:341-348.

Hovanesian JA. History of amniotic membranes in pterygium surgery. В: Hovanesian JA, editor. *Pterygium: techniques and technologies for surgical success.* Thorofare: SLACK Incorporated; 2012: 65-75.

Пример 6: Изогнутая Biovance 3L Ocular

[00158] В данном примере Biovance 3L Ocular создана в изогнутом формате, чтобы лучше соответствовать по форме роговице и главному яблоку.

[00159] С помощью 3D-печати были изготовлены шаблоны, имеющие сферические сегменты с разными радиусами, высотами и диаметрами (ФИГ. 17). Слоистые мембраны сушат на шаблонах и осторожно извлекают. Высушенный продукт, ФИГ. 18, разрезают в участке между изогнутыми элементами.

Таблица 7. Изогнутая Biovance 3L Ocular

<u>Сферический</u>		<u>Общий</u>	<u>Внутренний</u>	<u>Расстояние</u>	<u>Допущения:</u> Текущий диаметр 2D-высекального прессы = 10 мм Параметры первого шаблона Средний сферический диаметр роговицы = 16 мм Наиболее распространенные размеры – 10 и 12 мм Средний сферический диаметр глазного яблока = 23 мм
<u>радиус</u>	<u>Высота</u>	<u>угол</u>	<u>диаметр</u>	<u>по радиусу</u>	
5,00	5,00	90	10,00	15,71	
5,00	2,30	57,32	8,42	10,00	
8,00	1,50	35,66	9,33	9,96	
11,50	1,07	24,91	9,69	10,00	

[00160] Объем данного изобретения не ограничен конкретными вариантами реализации, описанными в данном документе. Фактически, различные модификации данного изобретения, в дополнение к описанным, будут очевидны для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и прилагаемых чертежей. Предполагается, что такие модификации охвачены объемом прилагаемой формулы изобретения.

[00161] Все цитируемые в данном документе источники включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме и для всех целей в той же степени, как если бы каждое из отдельной публикации, патента или заявки на патент было конкретно и индивидуально указано как включенное посредством ссылки в полном объеме для всех целей. Цитирование любой публикации предназначено для ее раскрытия до даты подачи и не должно толковаться как признание того, что данное изобретение не имеет права претендовать на первенство в подаче такой публикации в силу предшествующего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, включающий множество слоев внеклеточного матрикса, ламинированных вместе, причем внеклеточный матрикс происходит из амниотической мембраны и причем стромальная сторона слоя внеклеточного матрикса представлена как на верхней, так и на нижней поверхностях продукта, представляющего собой тканевый трансплантат.
2. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 1, отличающийся тем, что он включает три или более слоев внеклеточного матрикса.
3. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 1, отличающийся тем, что он включает ровно три слоя внеклеточного матрикса.
4. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по любому из пп. 1 – 3, отличающийся тем, что амниотическая мембрана является децеллюляризованной.
5. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 4, отличающийся тем, что амниотическая мембрана децеллюляризована с помощью детергента или механического разрушения.
6. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 5, отличающийся тем, что детергент представляет собой дезоксихолевую кислоту.
7. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по любому из пп. 1 – 6, отличающийся тем, что множество слоев внеклеточного матрикса ламинированы вместе путем сушки.
8. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 7, отличающийся тем, что он высушен с помощью тепла и/или под вакуумом.

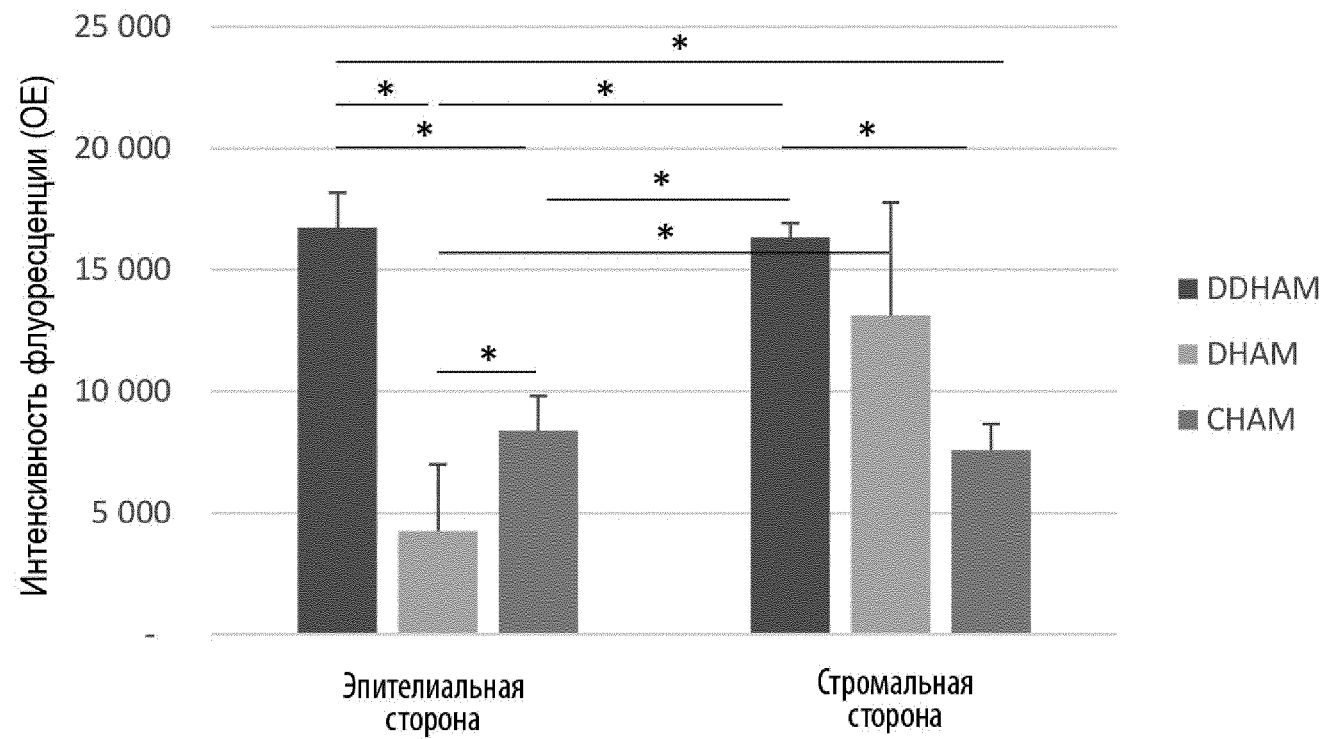
9. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по любому из пп. 1 – 8, отличающийся тем, что он является дегидратированным.
10. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 9, отличающийся тем, что он включает менее чем около 20% воды по сухой массе.
11. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 9, отличающийся тем, что он включает менее чем около 15% воды по сухой массе.
12. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 9, отличающийся тем, что он включает около 10% воды по сухой массе.
13. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по любому из пп. 9 – 12, отличающийся тем, что он включает от около 40% до около 70% общего коллагена по сухой массе.
14. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 13, отличающийся тем, что он включает от около 45% до около 60% общего коллагена по сухой массе.
15. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 13, отличающийся тем, что он включает от около 50% до около 55% общего коллагена по сухой массе.
16. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по любому из пп. 9 – 15, отличающийся тем, что коллаген представляет собой в основном коллаген I типа и коллаген III типа.
17. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по любому из пп. 9 – 16, отличающийся тем, что он включает от около 8% до около 24% эластина по сухой массе.

18. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 17, отличающийся тем, что он включает от около 12% до около 20% эластина по сухой массе.
19. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 17, отличающийся тем, что он включает от около 15% до около 20% эластина по сухой массе.
20. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по любому из пп. 9 – 19, отличающийся тем, что он включает менее чем около 1% гликозаминогликана по сухой массе.
21. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 20, отличающийся тем, что он включает менее чем около 0,5% гликозаминогликана по сухой массе.
22. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по любому из пп. 9 – 21, отличающийся тем, что он включает менее чем около 1% фибронектина по сухой массе.
23. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 22, отличающийся тем, что он включает менее чем около 0,5% фибронектина по сухой массе.
24. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по любому из пп. 9 – 23, отличающийся тем, что он включает менее чем около 1% ламинина по сухой массе.
25. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 24, отличающийся тем, что он включает менее чем около 0,5% ламинина по сухой массе.
26. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по любому из пп. 1 – 25, отличающийся тем, что амниотическая мембрана представляет собой амниотическую мембрану человека.

27. Продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по п. 26, отличающийся тем, что амниотическая мембрана получена после доношенной беременности.
28. Трансплантат ткани глаза, включающий продукт, представляющий собой тканевый трансплантат, по любому из пп. 1 – 27.
29. Трансплантат ткани глаза по п. 28, отличающийся тем, что он имеет приблизительно круглую форму.
30. Трансплантат ткани глаза по п. 28, отличающийся тем, что он включает изогнутую часть в форме части сферы.
31. Трансплантат ткани глаза по п. 30, отличающийся тем, что форма придается путем сушки продукта, представляющего собой тканевый трансплантат, на шаблоне.
32. Способ лечения заболевания или повреждения глаза у субъекта, включающий этап приведения глаза субъекта в контакт с продуктом, представляющим собой тканевый трансплантат, по любому из пп. 1 – 27, или трансплантатом ткани глаза по любому из пп. 28 – 31, с обеспечением тем самым лечения субъекта.
33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что повреждение глаза включает истирание.
34. Способ по п. 32, отличающийся тем, что повреждение глаза включает химическое воздействие.
35. Способ по п. 32, отличающийся тем, что повреждение глаза включает порез или разрыв.
36. Способ по любому из пп. 32 – 35, отличающийся тем, что заболевание или повреждение глаза включает заболевание или повреждение роговицы.

37. Способ по любому из пп. 32 – 36, отличающийся тем, что лечение включает восстановление поврежденной ткани.
38. Способ по любому из пп. 32 – 36, отличающийся тем, что лечение включает сокращение рубцовой ткани или сокращение образования рубцовой ткани по сравнению с глазом, не подвергавшимся лечению.
39. Способ по любому из пп. 32 – 36, отличающийся тем, что лечение включает повышенную миграцию эпителиальных клеток по сравнению с глазом, не подвергавшимся лечению.
40. Способ по любому из пп. 32 – 36, отличающийся тем, что лечение включает повышенную адгезию эпителиальных клеток по сравнению с глазом, не подвергавшимся лечению.
41. Способ по любому из пп. 32 – 36, отличающийся тем, что лечение включает повышенную пролиферацию эпителиальных клеток по сравнению с глазом, не подвергавшимся лечению.
42. Способ по любому из пп. 32 – 36, отличающийся тем, что лечение включает повышенное покрытие эпителиальными клетками по сравнению с глазом, не подвергавшимся лечению.
43. Способ по любому из пп. 32 – 42, отличающийся тем, что субъектом является млекопитающее.
44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что субъектом является человек.

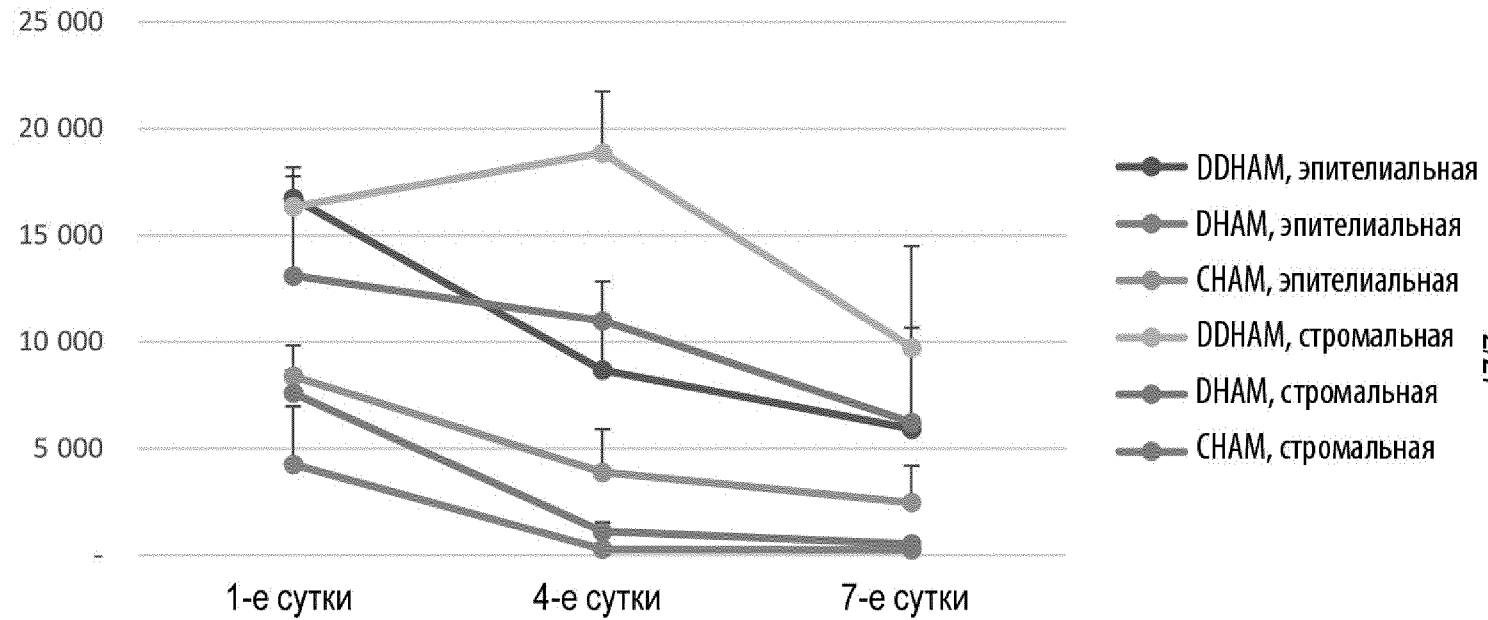
Адгезия клеток в зависимости от стороны и амниотической мембраны



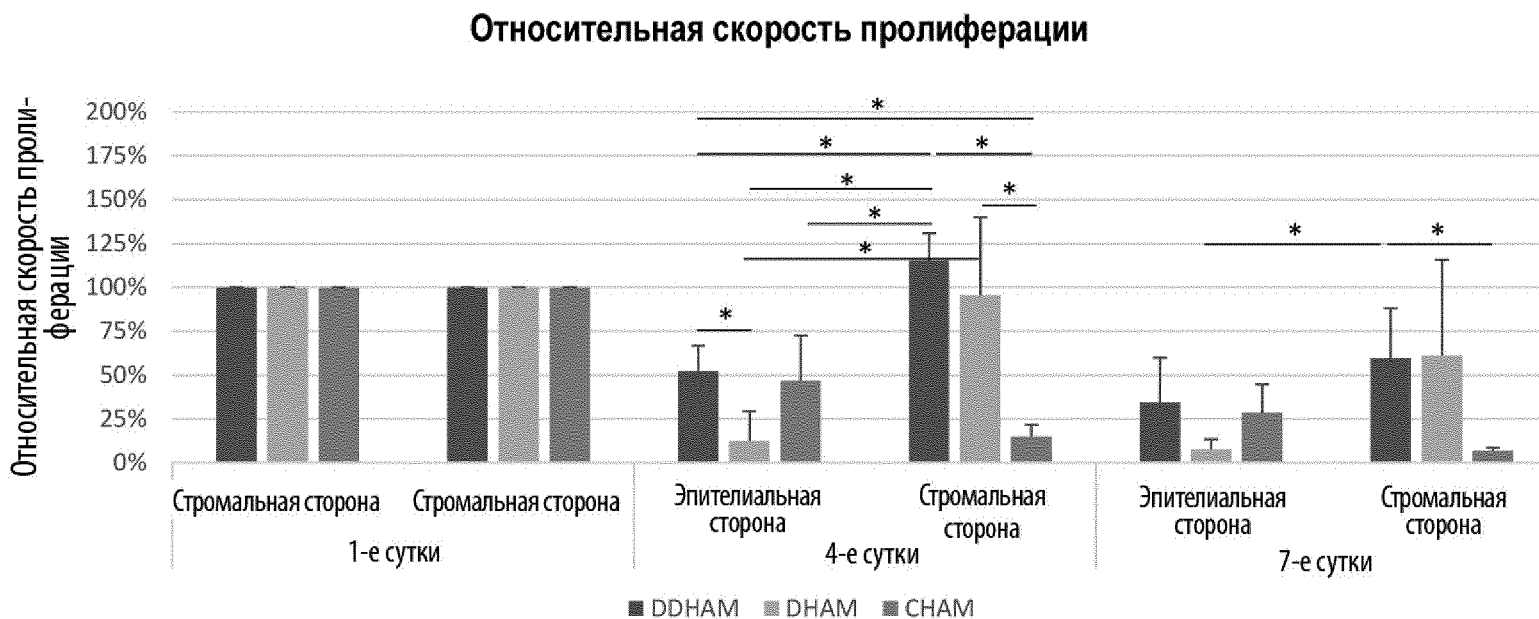
Фиг. 1

Пролиферация клеток

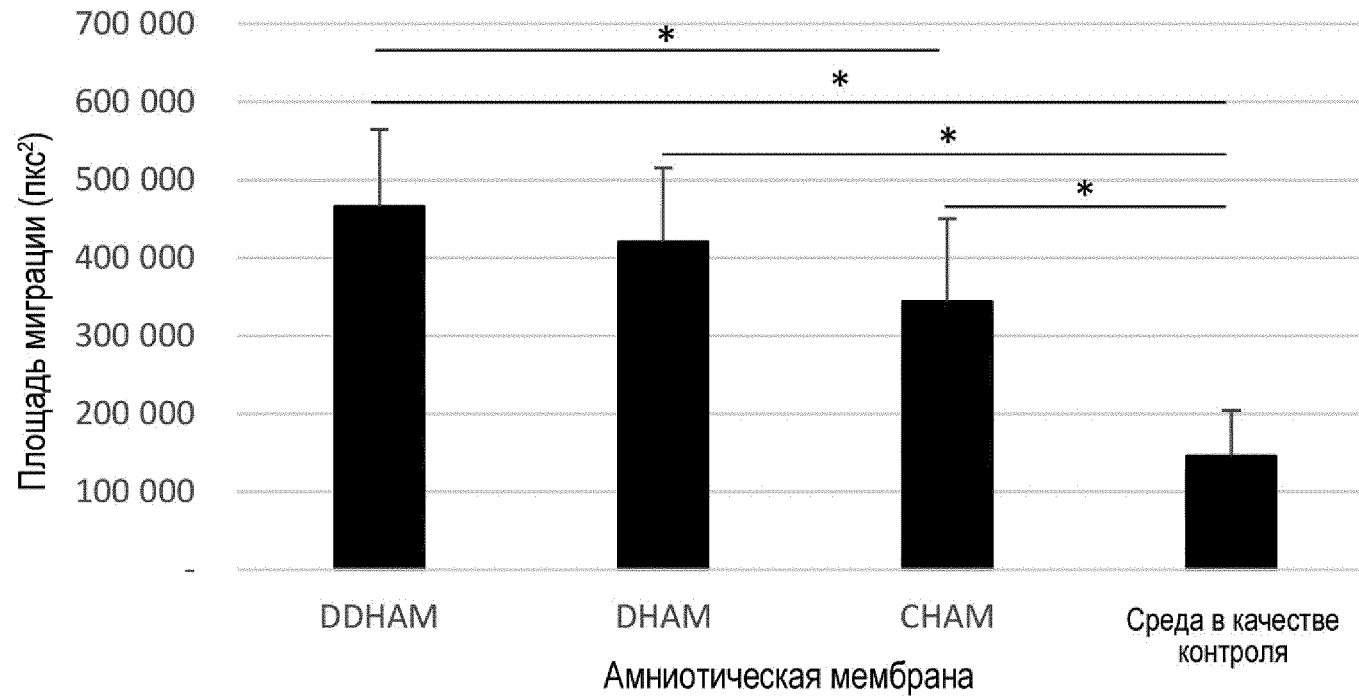
Фиг. 2



ФИГ. 3

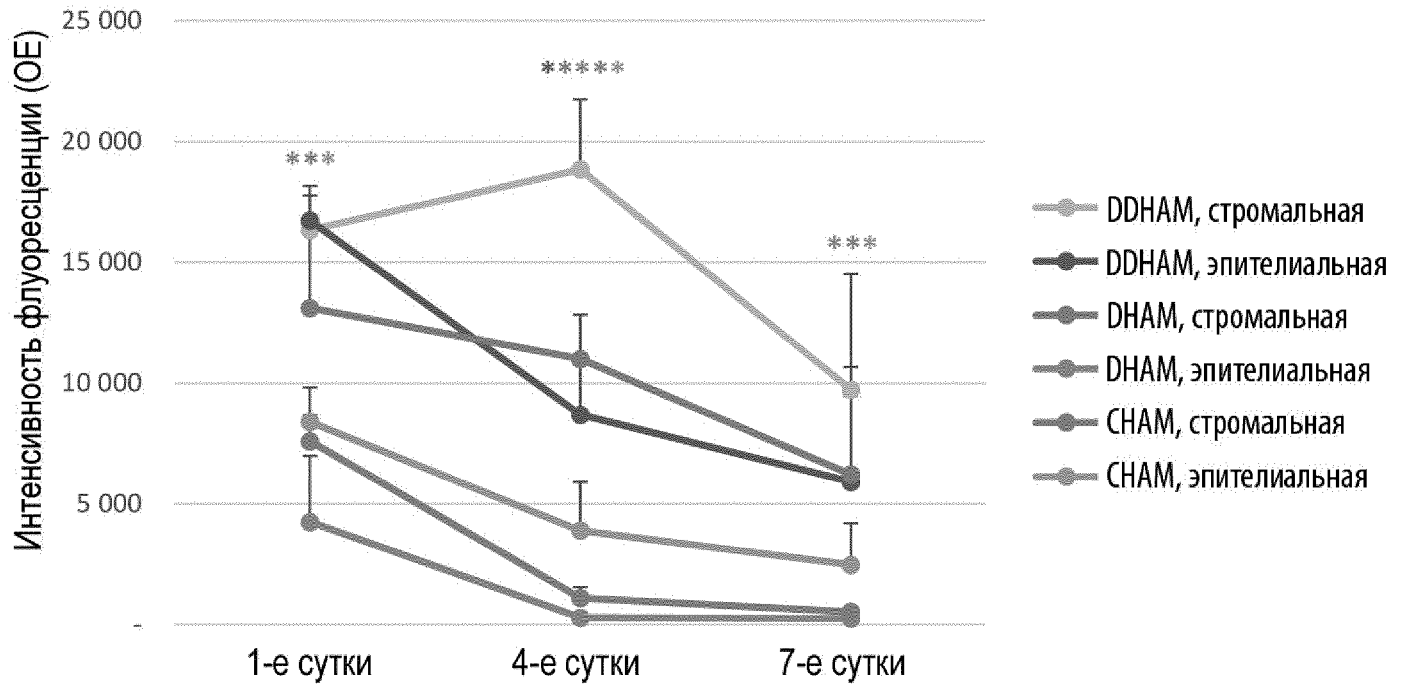


Площадь миграции в зависимости от амниотической мембраны

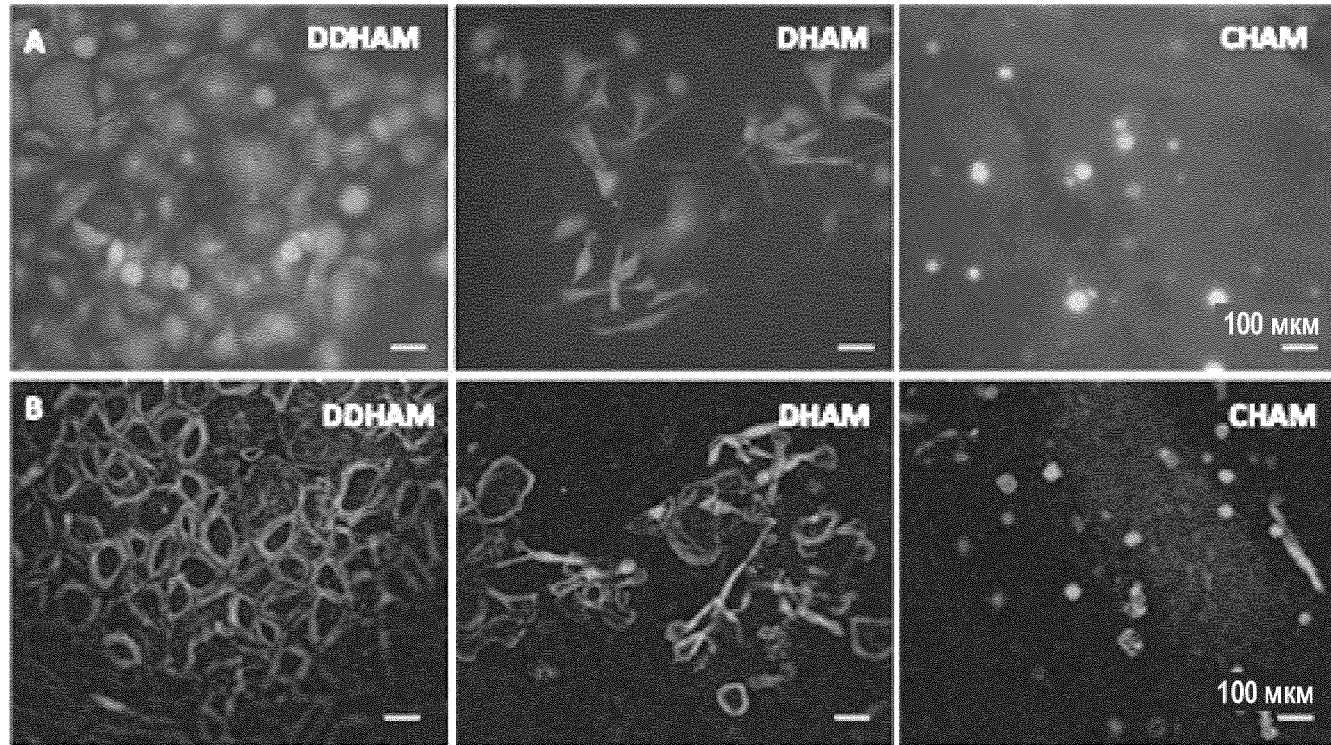


ФИГ. 4

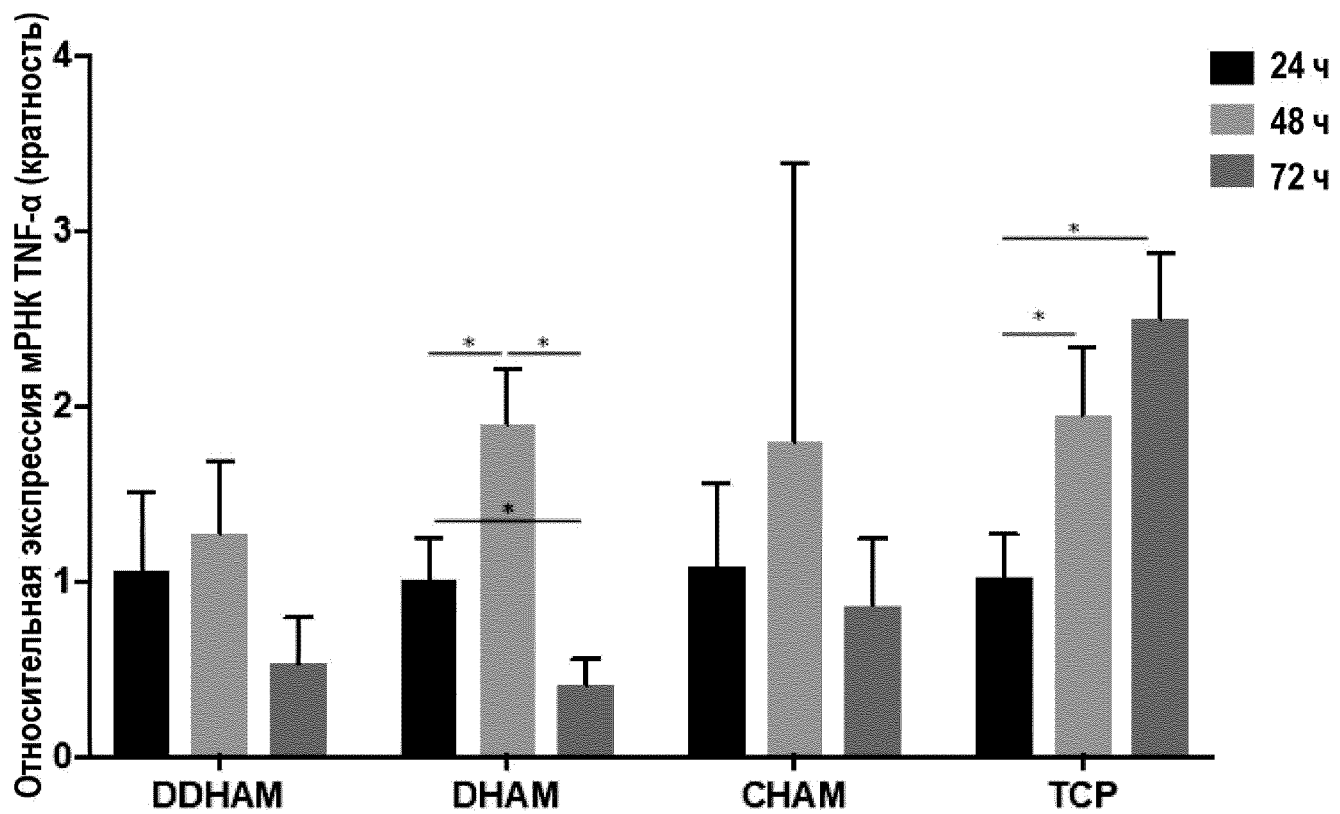
ФИГ. 5



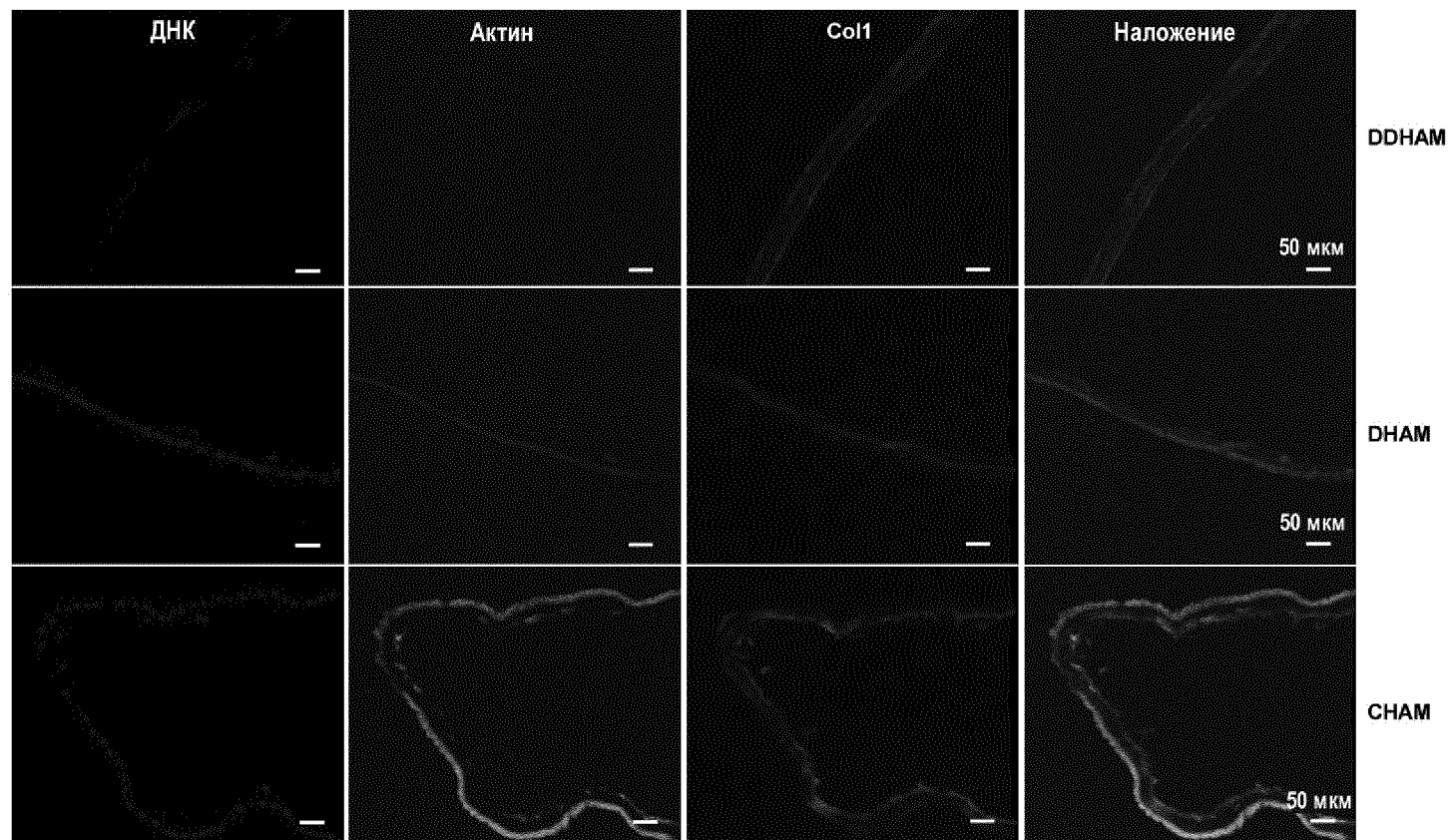
Фиг. 6

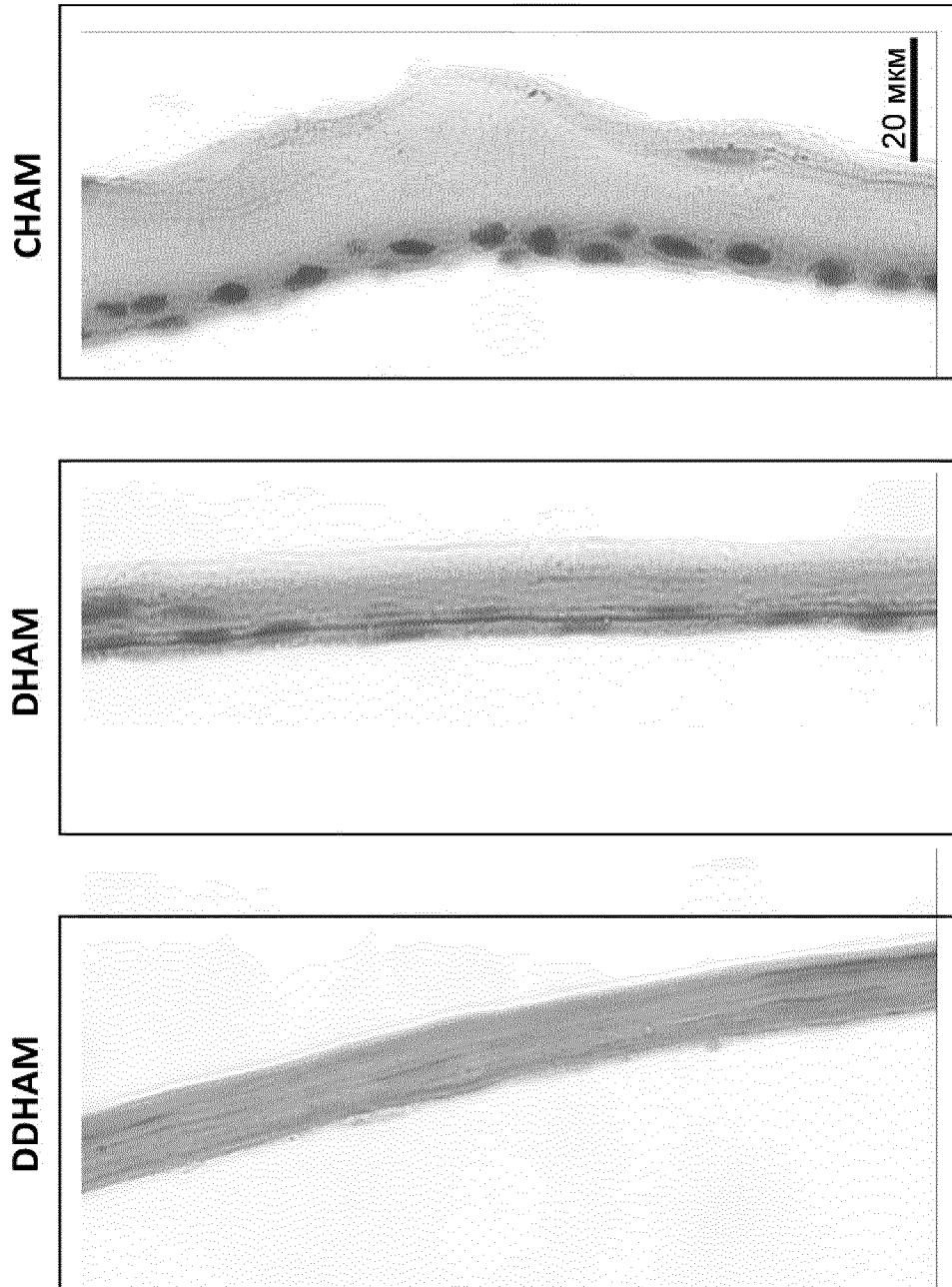


Фиг. 7



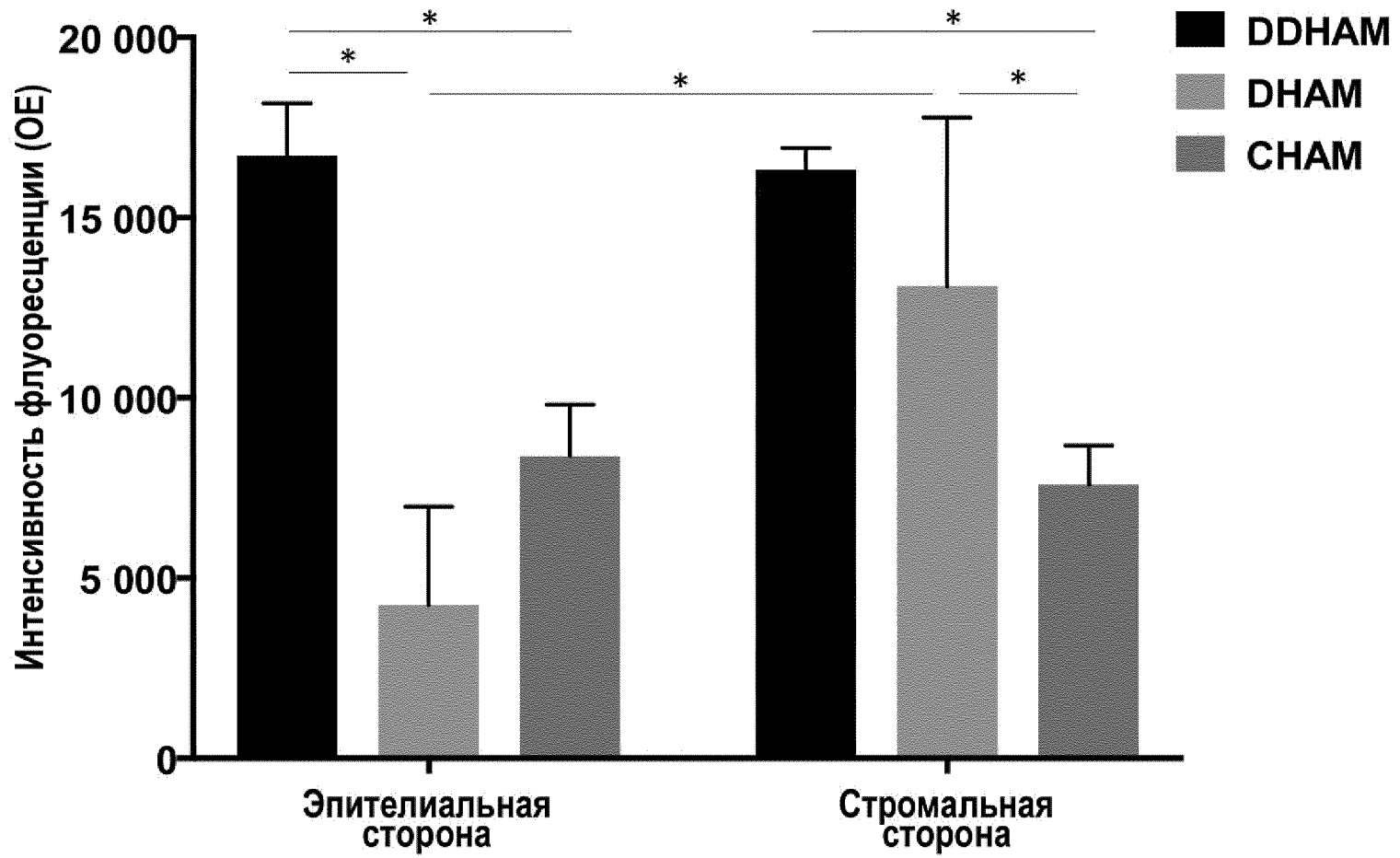
ФИГ. 8А



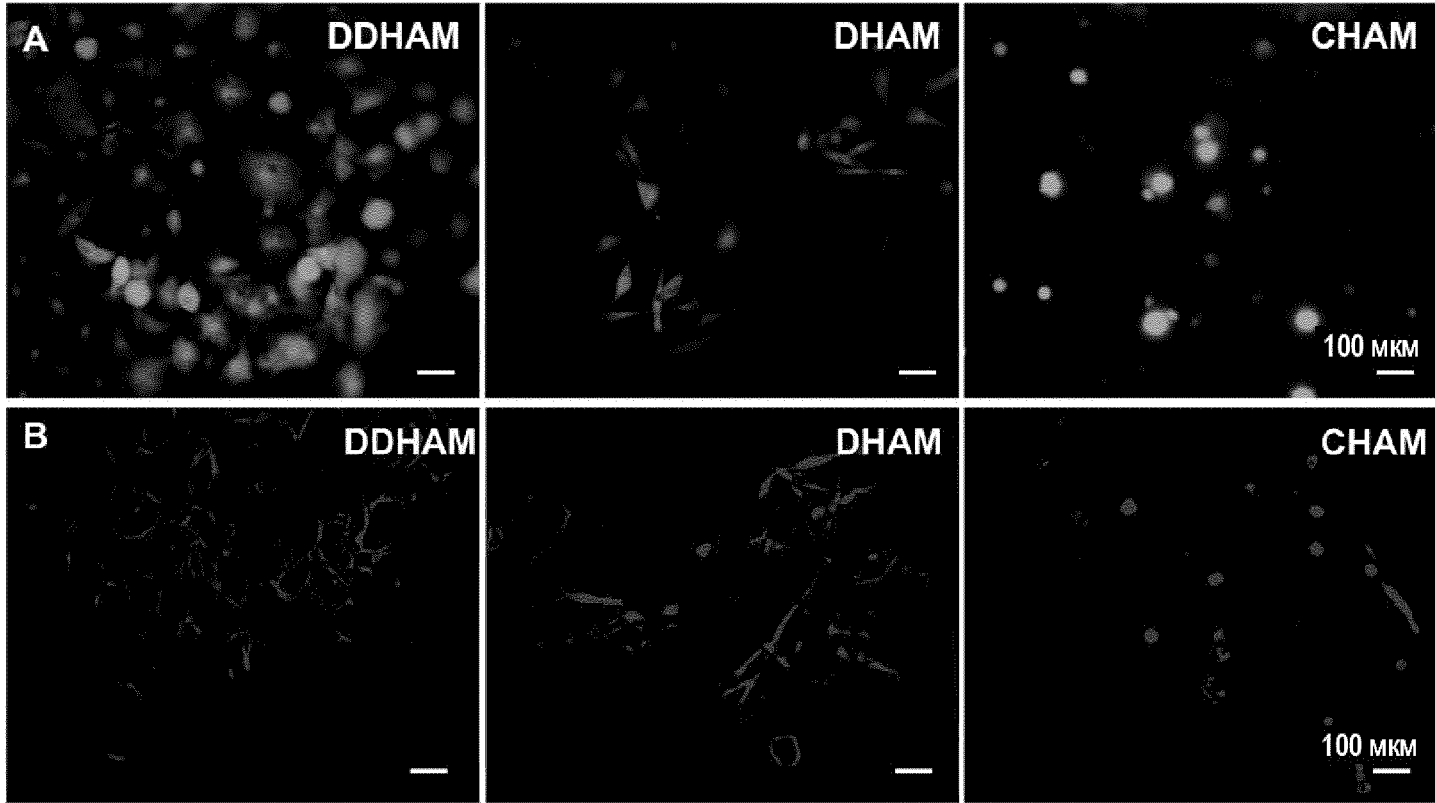


Фиг. 8В

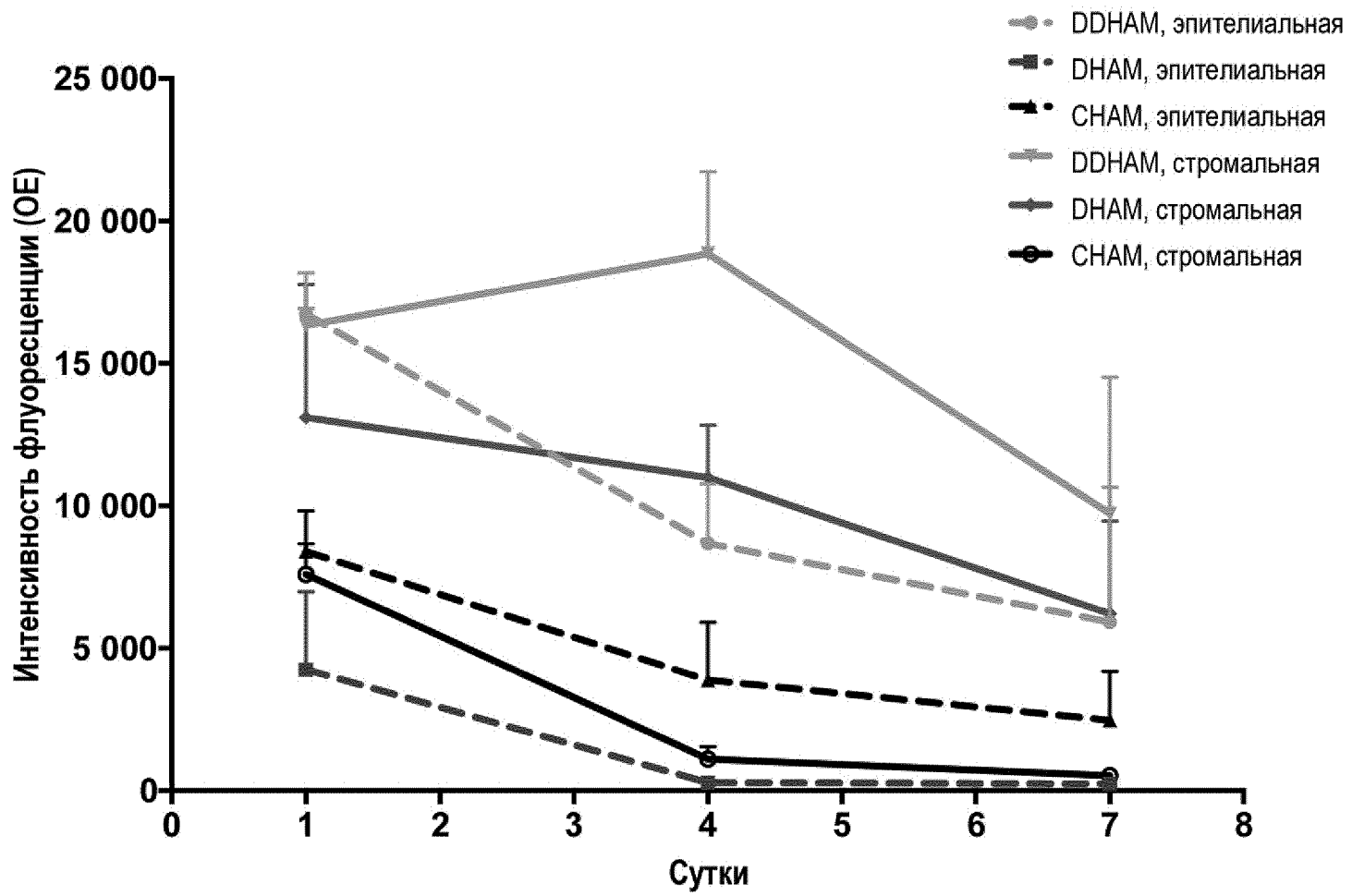
Фиг. 9



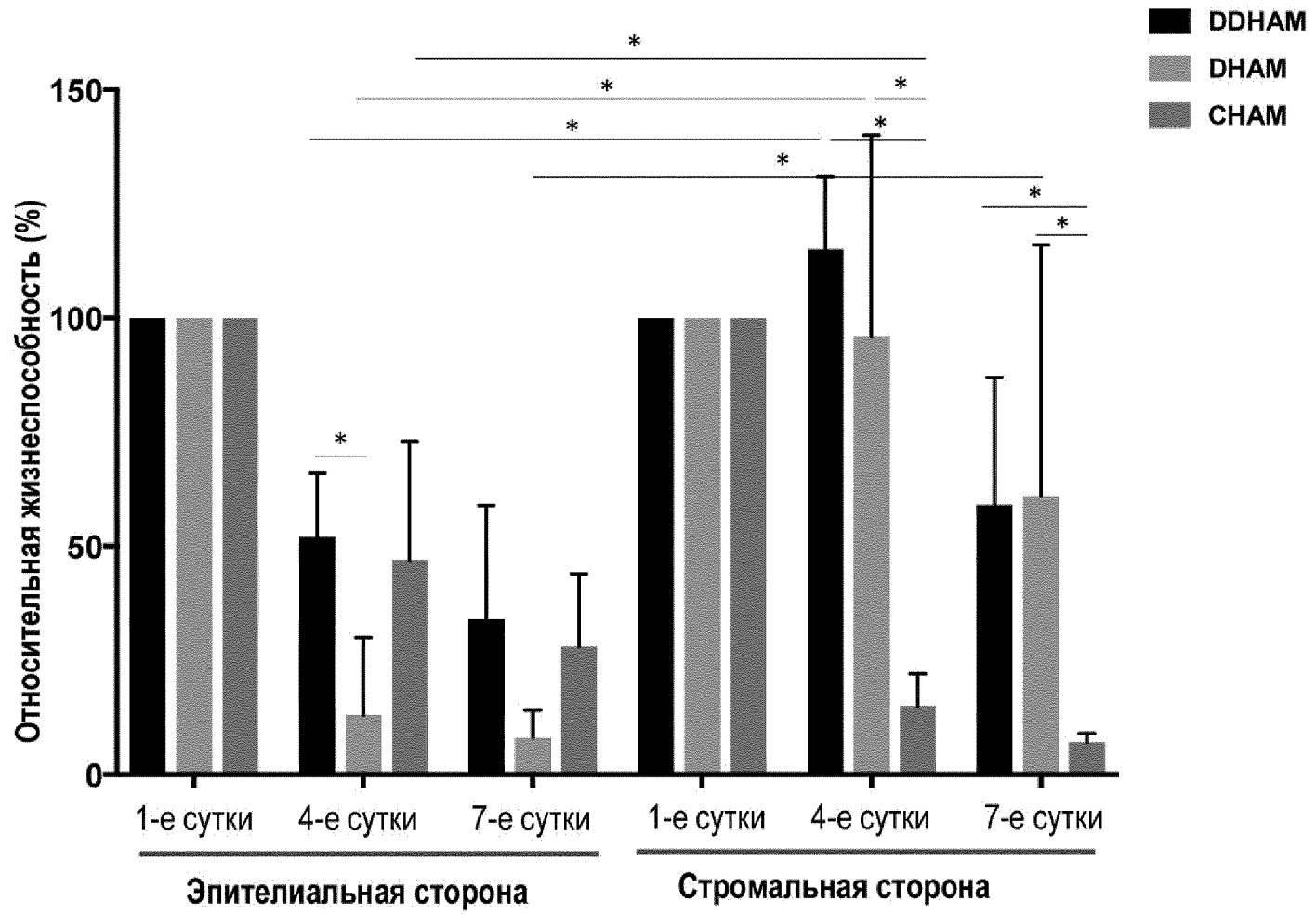
ΦNF 10



ФИГ. 11А

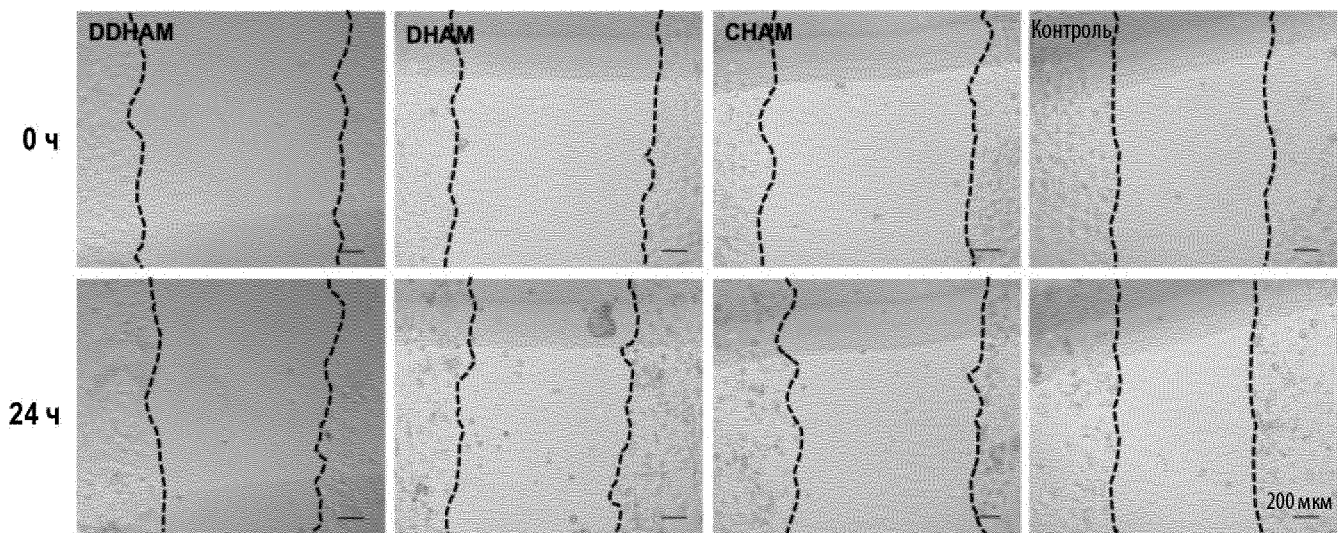


ФИГ. 11В



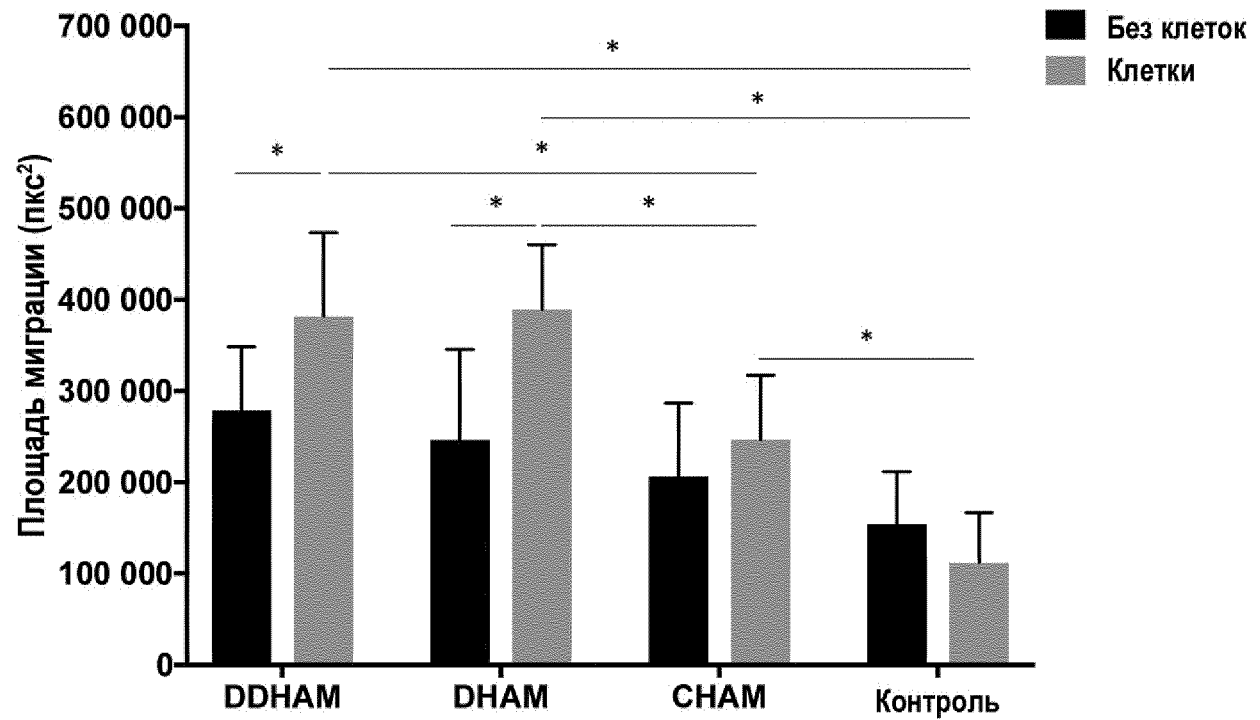
Фиг. 12А

A.

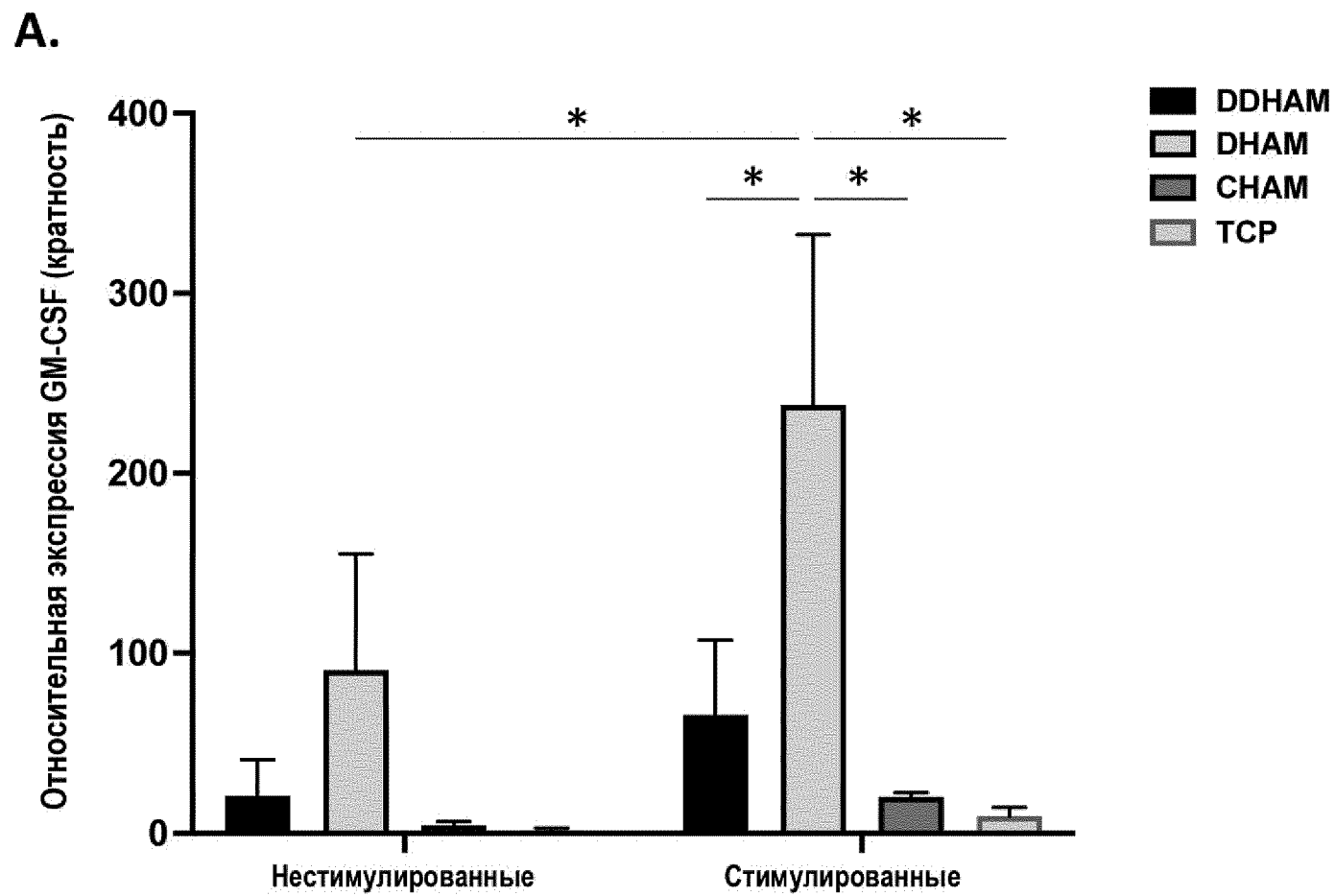


Фиг. 12В

В.

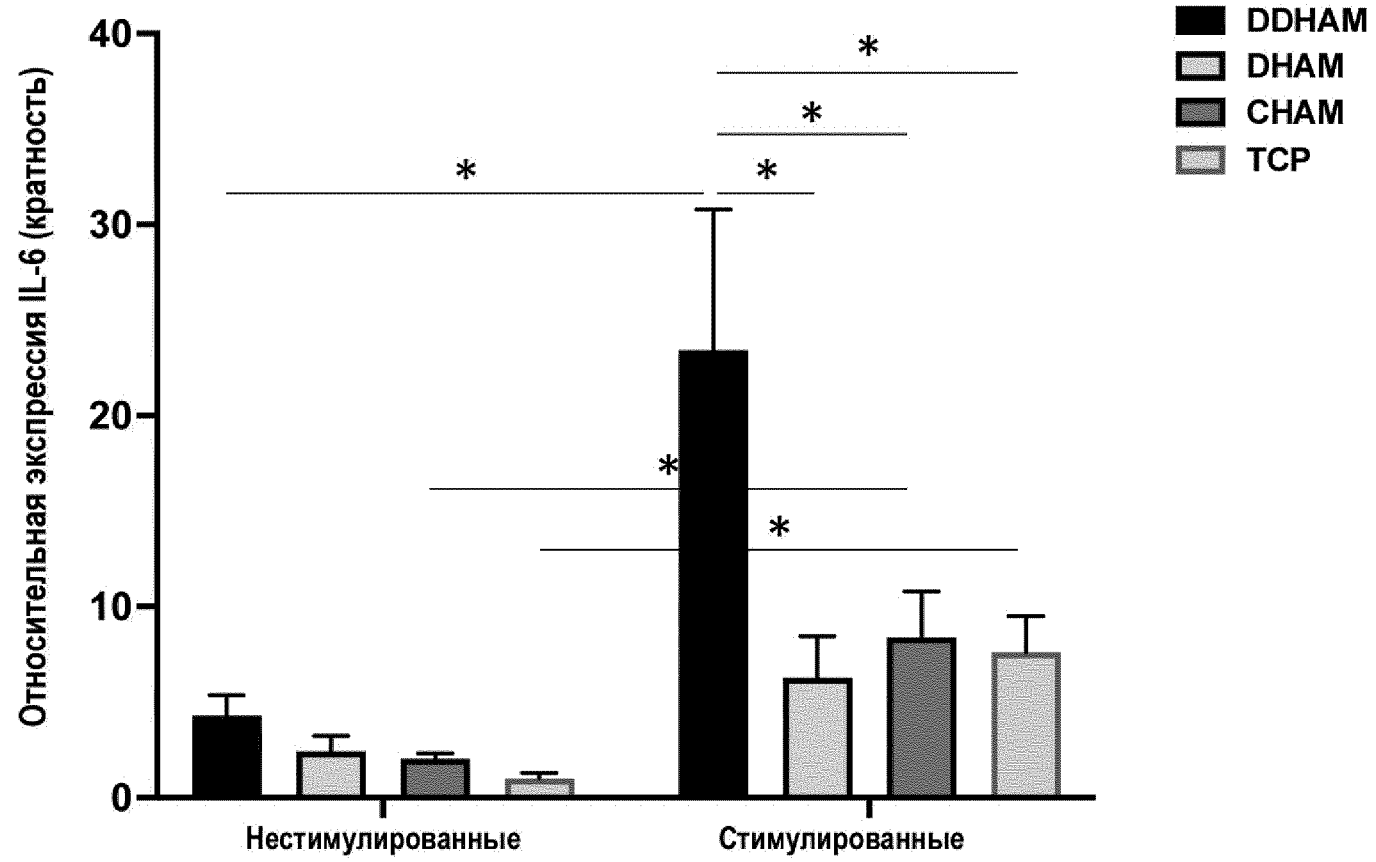


ФИГ. 13А

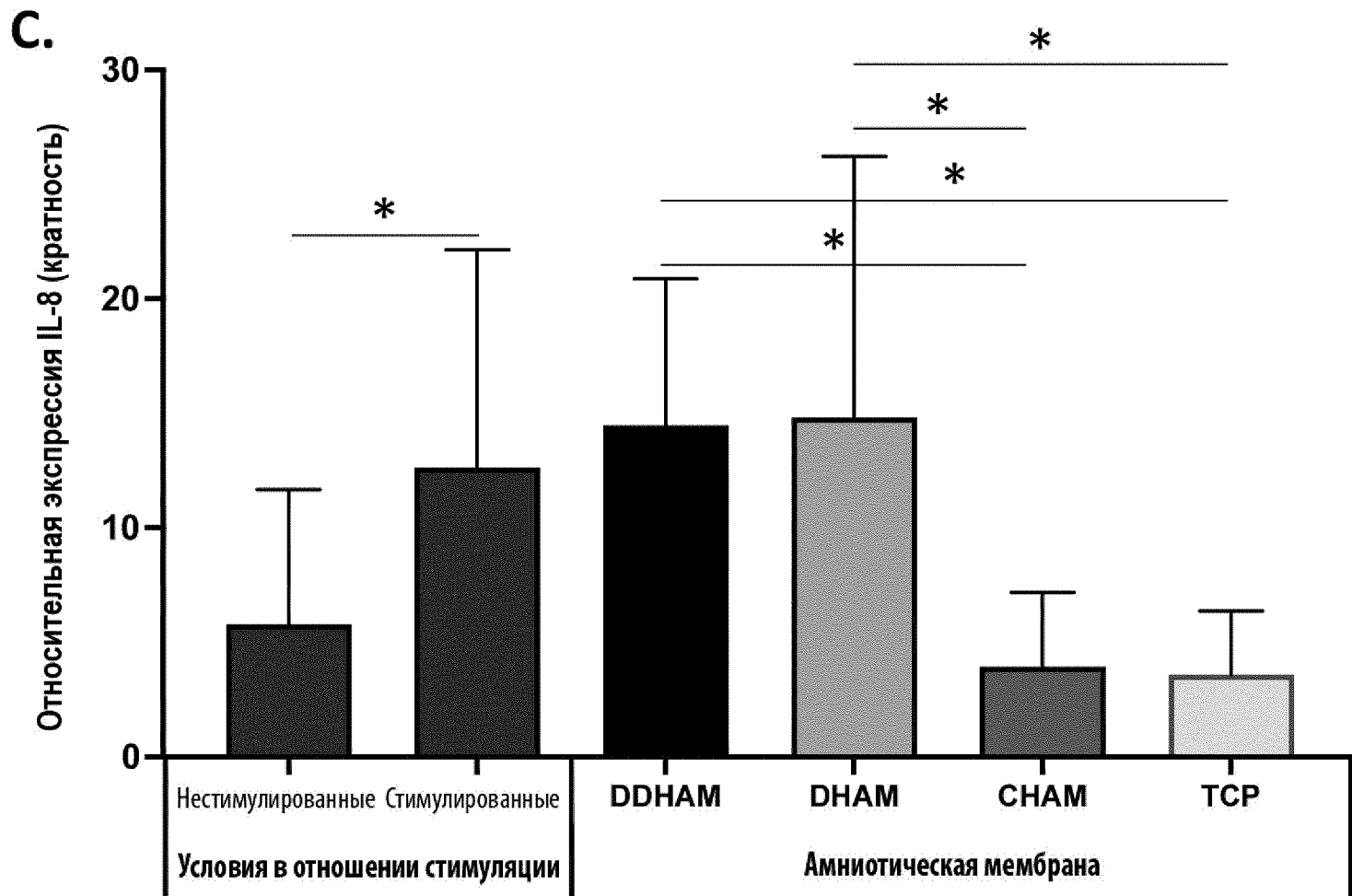


ФИГ. 13В

В.

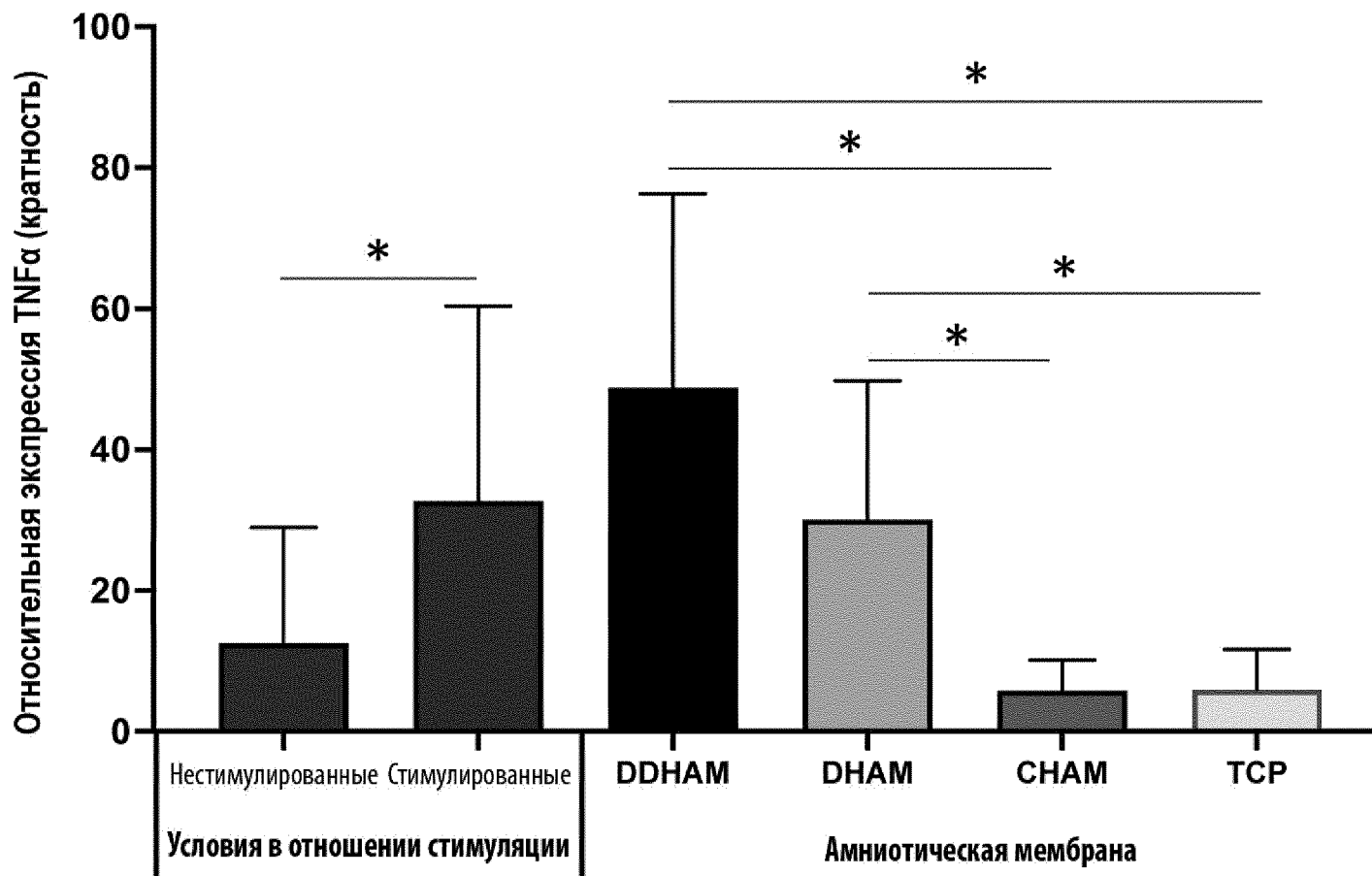


ФИГ. 13С

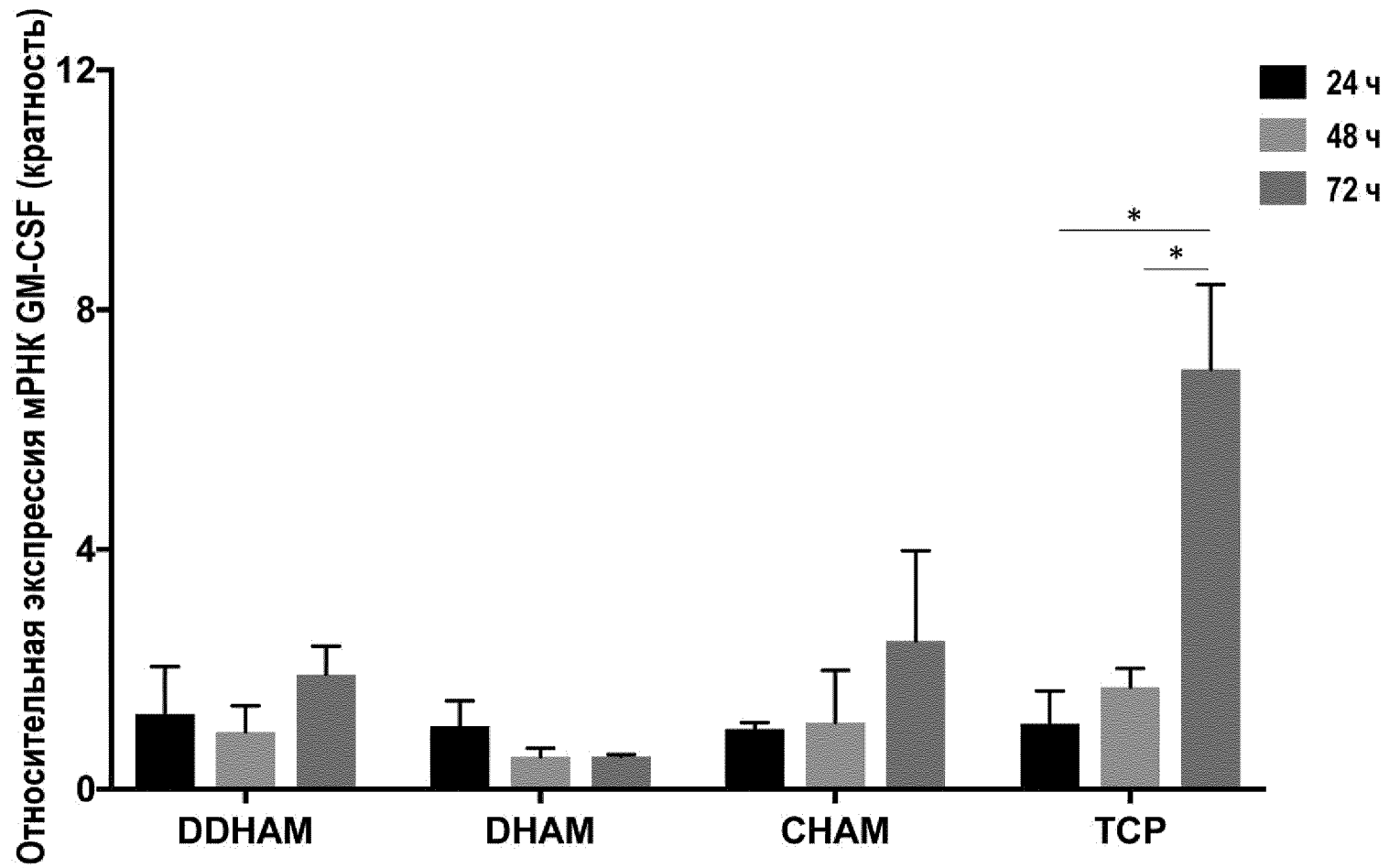


Фиг. 13D

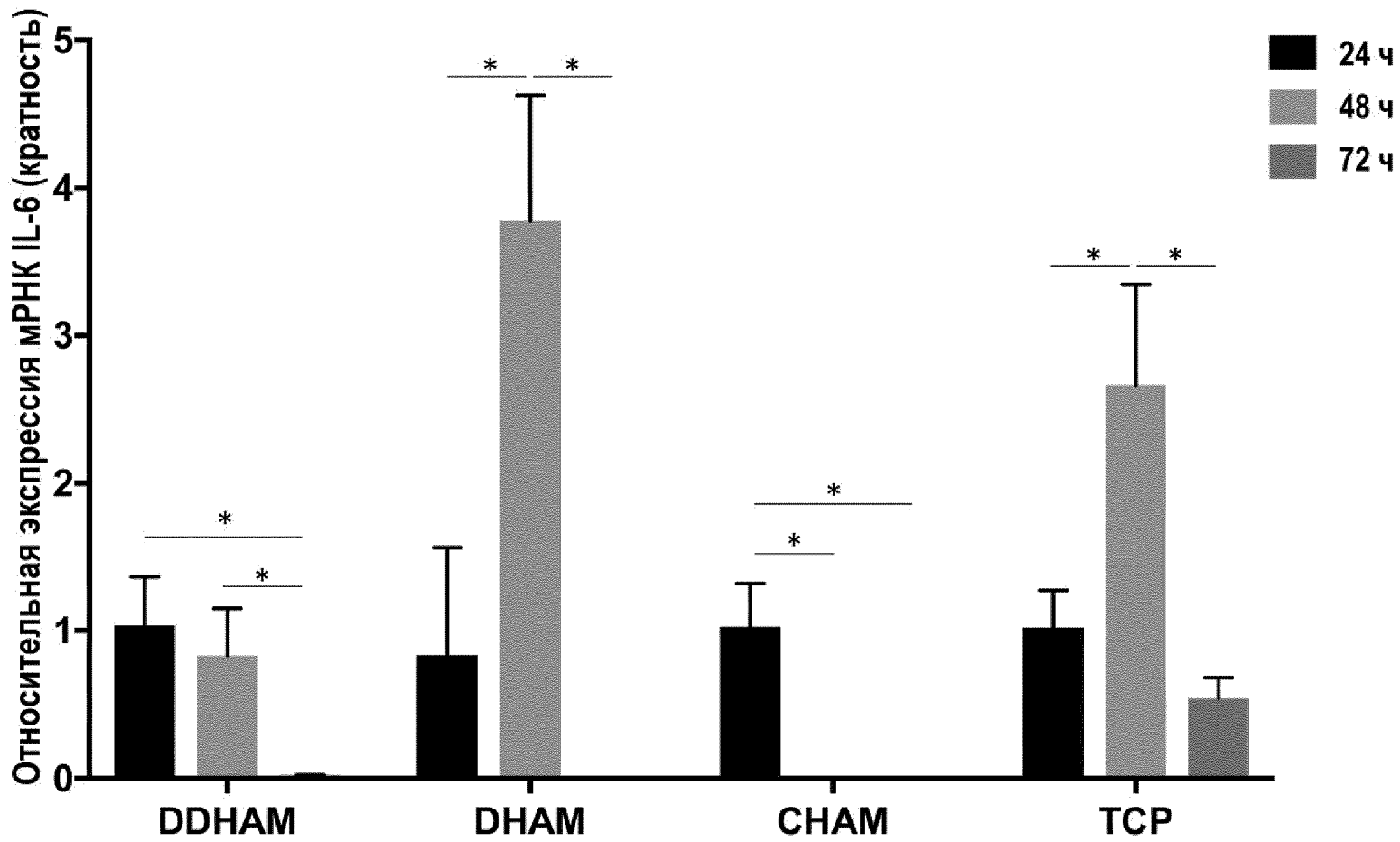
D.



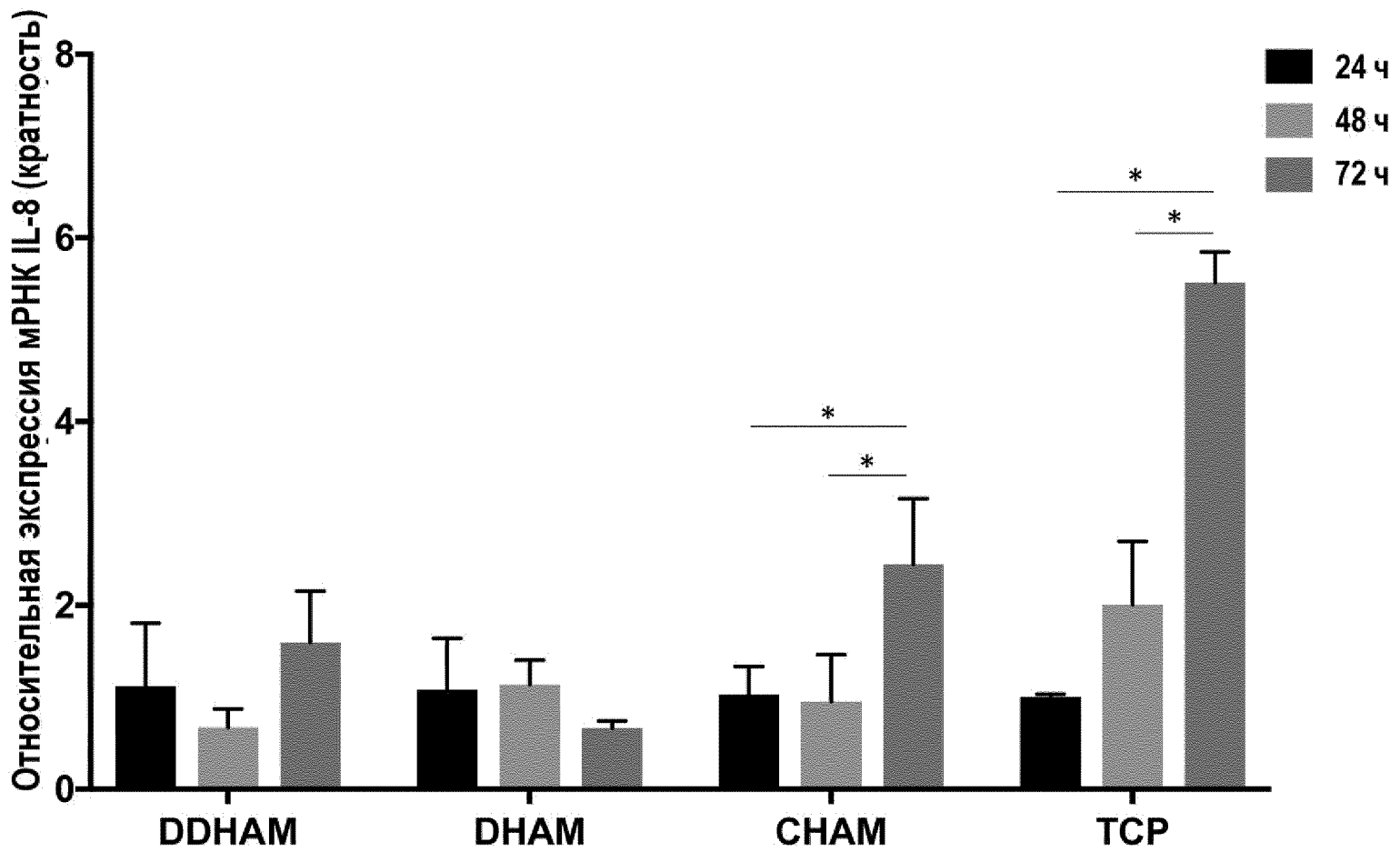
Фиг. 14А



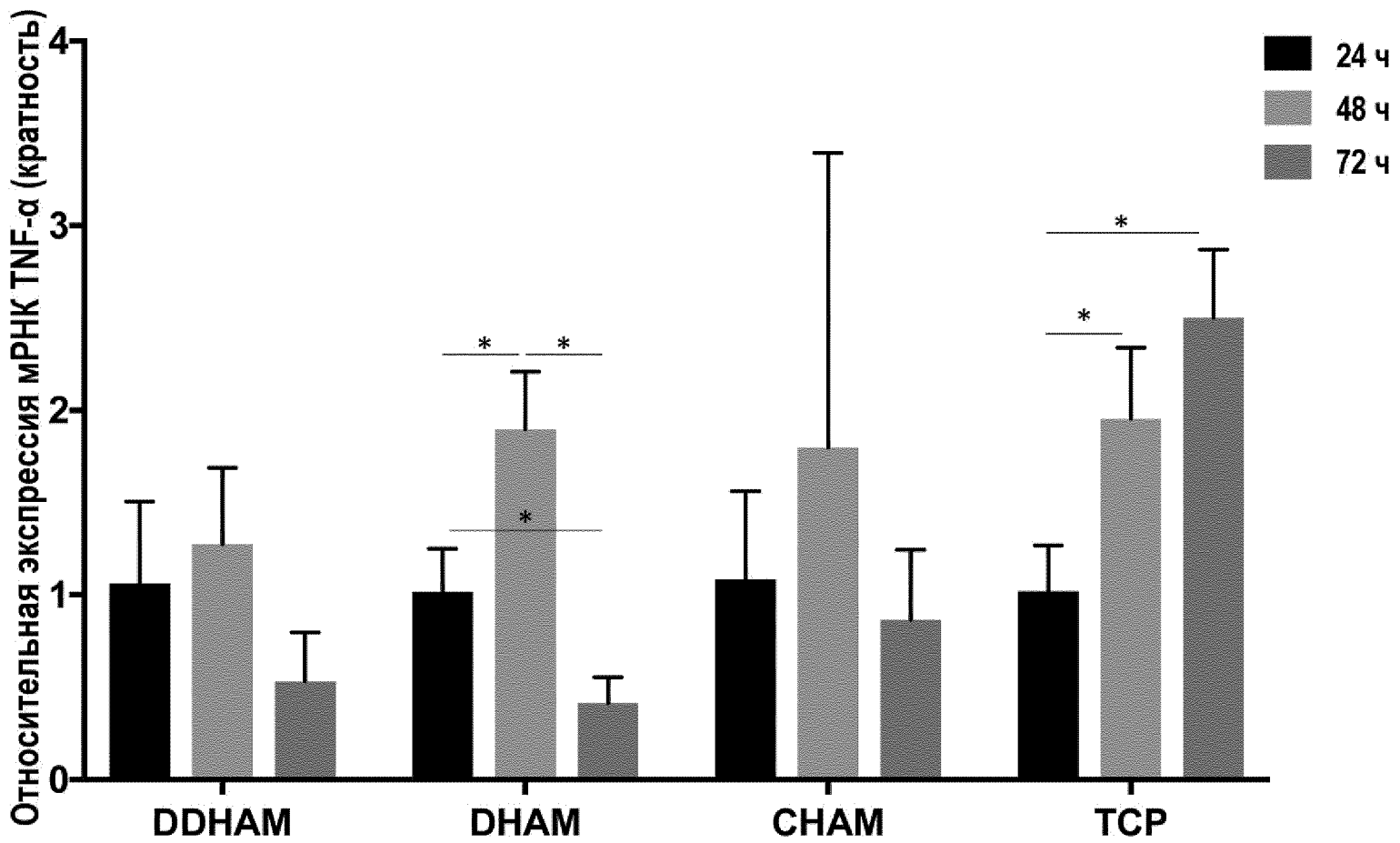
Фиг. 14В



Фиг. 14С

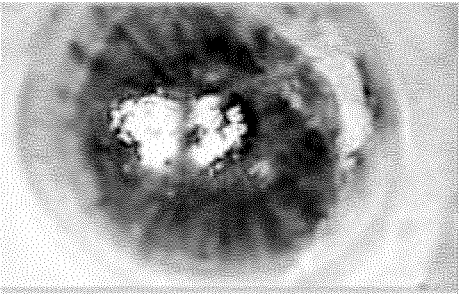


Фиг. 14D

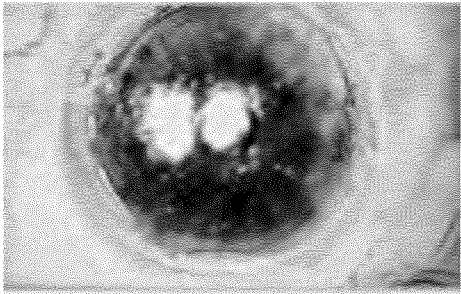


ΦNF: 15A - 15F

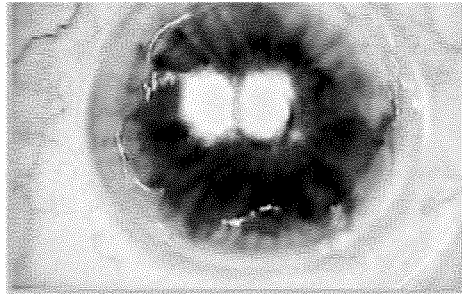
A



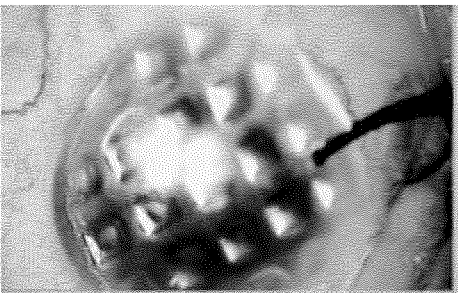
B



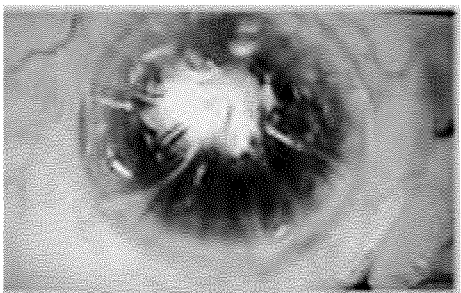
C



D



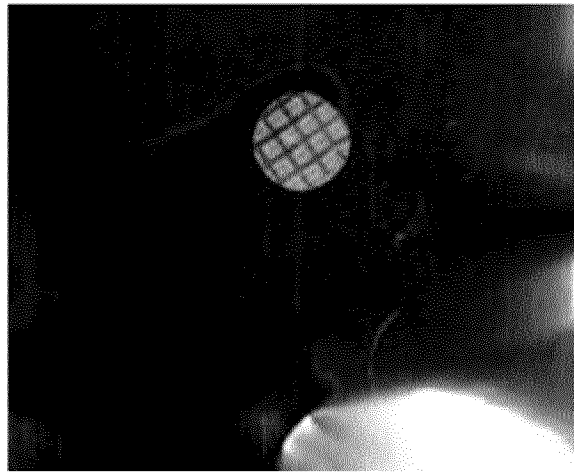
E



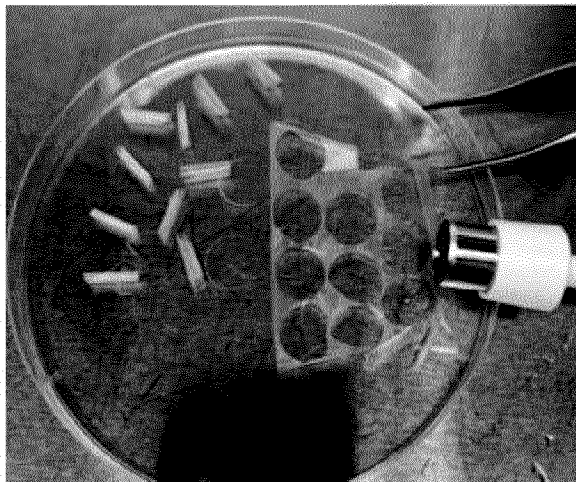
F



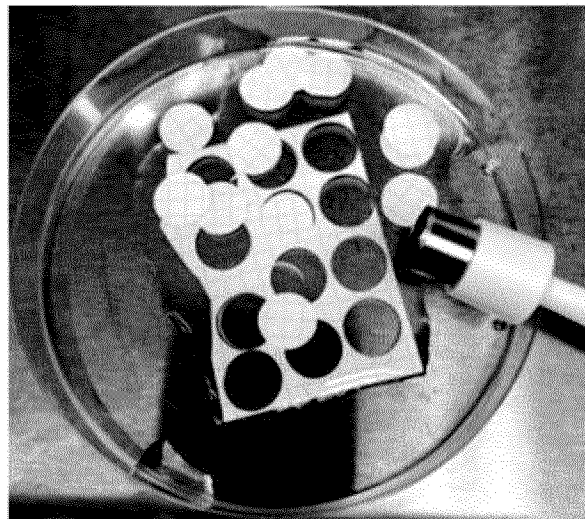
A



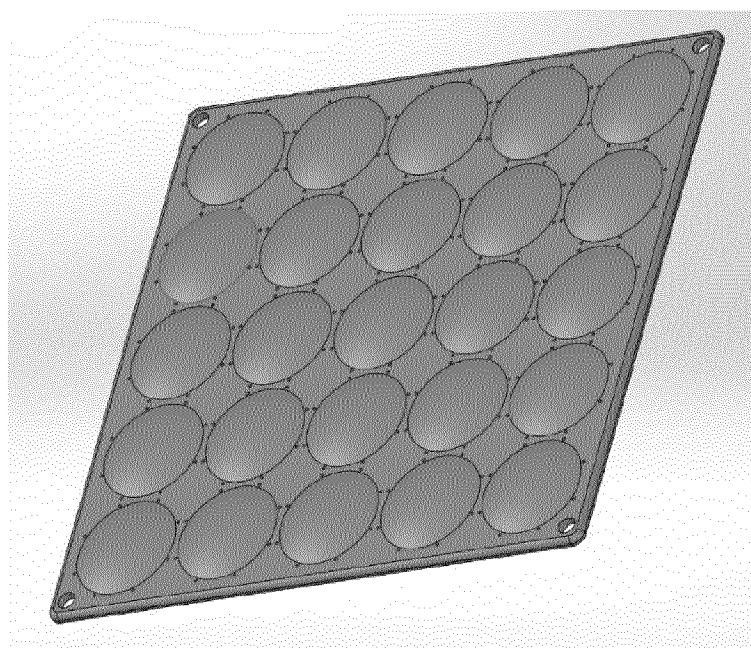
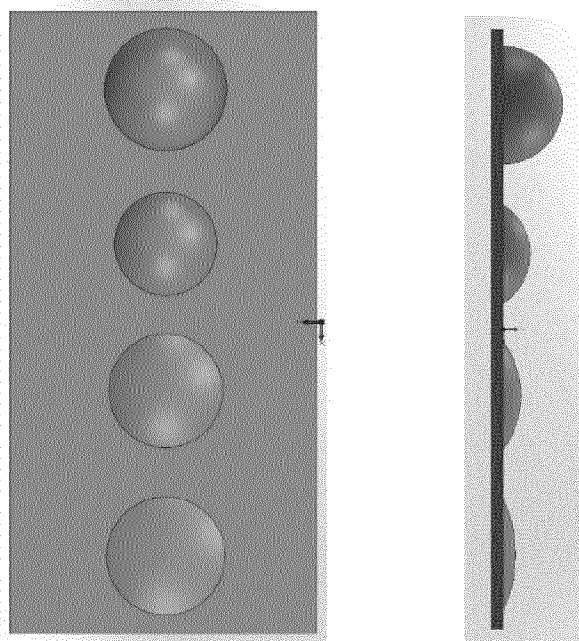
B



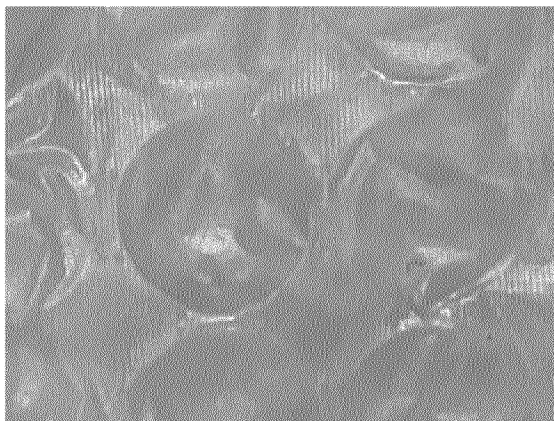
C



Фиг. 16А - 16С



Фиг. 17



Фиг. 18