

А.А. Расторгуева<sup>1</sup>, Т.А. Астрелина<sup>1</sup>, В.А. Брунчуков<sup>1</sup>, И.В. Кобзева<sup>1</sup>, Ю.Б. Сучкова<sup>1</sup>,  
В.А. Никитина<sup>1</sup>, С.В. Лишчук<sup>1</sup>, Е.А. Дубова<sup>1</sup>, К.А. Павлов<sup>1</sup>, Т.Ф. Маливанова<sup>1</sup>,  
Д.Ю. Усупжанова<sup>1</sup>, О.Г. Михадаркина<sup>1</sup>, А.Д. Кобзев<sup>2</sup>, В.И. Булыгина<sup>2</sup>, А.С. Самойлов<sup>1</sup>

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОЙ АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ЧЕЛОВЕКА В КОМБИНАЦИИ С КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИЕЙ ПРИ МЕСТНЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЯХ

<sup>1</sup> Федеральное медицинское биофизическое центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. М.И. Сеченова, Москва

Контактное лицо: Татьяна Алексеевна Астрелина, e-mail: t\_astrelina@mail.ru

### РЕФЕРАТ

Клеточная терапия является перспективным направлением в медицине, которое может существенно улучшить результаты лечения различных заболеваний, включая местные лучевые поражения (МЛП). Цель исследования – сравнение результатов применения децеллюляризованной амниотической оболочки человека изолировано и совместно с лиофилизатами кондиционированных сред мезенхимальных стромальных клеток (МСК) слизистой десны человека и МСК плацентарной ткани человека и их влияния на регенерацию тканей при МЛП.

**Материал и методы:** В исследование включены 42 лабораторных животных (белые крысы-самцы линии Wistar), разделенные случайным образом на 6 групп: К – контрольная группа без терапии; на 21 сут после облучения группы с применением: Ам+ЛД – аппликационно лиофилизат кондиционированной среды МСК слизистой десны человека (ЛД) под децеллюляризованную амниотическую мембрану, Ам+ЛП – аппликационно лиофилизат кондиционированной среды МСК плацентарной ткани человека (ЛП) под децеллюляризованную амниотическую мембрану, Ам – аппликационно децеллюляризованную амниотическую мембрану, АмКл – аппликационно децеллюляризованную амниотическую мембрану с медицинским клеем БФ-6, Кл – аппликационно медицинский клей БФ-6. Проводили моделирование МЛП у животных на рентгеновской установке ЛНК-268 в дозе 110 Гр и наблюдали до 112-е сут после облучения, проводился мониторинг язвенной поверхности кожи и течение воспалительного процесса МЛП с расчетом площади общей измененной кожи по программному обеспечению ImageTool. Проводили планиметрический и гистологический анализ.

**Результаты:** При сравнении с контролем использование децеллюляризованной амниотической мембраны при МЛП на 77 и 112-е сут после облучения увеличило скорость заживления в 4,6 и 18 раз соответственно; применение децеллюляризованной амниотической мембраны с лиофилизатом кондиционной среды МСК плаценты увеличивало скорость заживления ран в 13,5 и 27 раз соответственно, а децеллюляризованной амниотической мембраны с лиофилизатом МСК слизистой десны человека – к 100 % заживлению. Заживление площади язвенной поверхности МЛП в 83,5 % у животных в группе Ам продемонстрировало эффективность применения изолированной децеллюляризованной амниотической мембраны даже в отсутствие лиофилизатов МСК человека. При этом заживление площади язвенной поверхности МЛП в группе АмКл составило в 20 % случаев, когда децеллюляризованная амниотическая мембрана фиксировалась медицинским клеем БФ-6, что было менее эффективно по сравнению с другими группами.

**Заключение:** Предложенное комбинированное применение децеллюляризованной амниотической мембраны с лиофилизатами кондиционной среды МСК плаценты и слизистой ткани десны человека и изолированное применение децеллюляризованной амниотической мембраны приводило к полной эпителизации язвенной поверхности, выраженному благоприятному течению МЛП III–IV степени у лабораторных животных и сокращению сроков заживления, отсутствию местных или системных осложнений, что можно рассматривать как перспективный метод консервативной терапии МЛП кожных покровов и новый терапевтический подход в лечении незаживающих и хронических ран.

**Ключевые слова:** местные лучевые поражения, децеллюляризованная амниотическая мембрана человек, клеточная терапия, мезенхимальные стромальные клетки, кондиционированная среда, крысы

**Для цитирования:** Расторгуева А.А., Астрелина Т.А., Брунчуков В.А., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Никитина В.А., Лишчук С.В., Дубова Е.А., Павлов К.А., Маливанова Т.Ф., Усупжанова Д.Ю., Михадаркина О.Г., Кобзев А.Д., Булыгина В.И., Самойлов А.С. Оценка эффективности применения децеллюляризованной амниотической мембраны человека в комбинации с клеточной терапией при местных лучевых поражениях // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2024. Т. 69. № 3. С. 5–12. DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-3-5-12

А.А. Rastorgueva<sup>1</sup>, T.A. Astrelina<sup>1</sup>, V.A. Brunchukov<sup>1</sup>, I.V. Kobzeva<sup>1</sup>, Yu.B. Suchkova<sup>1</sup>,  
V.A. Nikitina<sup>1</sup>, S.V. Lishchuk<sup>1</sup>, E.A. Dubova<sup>1</sup>, K.A. Pavlov<sup>1</sup>, T.F. Malivanova<sup>1</sup>,  
D.Yu. Usupzhanova<sup>1</sup>, O.G. Mikhadarkina<sup>1</sup>, A.D. Kobzev<sup>2</sup>, V.I. Bulygina<sup>2</sup>, A.S. Samoilo<sup>1</sup>

## Evaluation of the Effectiveness of The Use of Decellularized Human Amniotic Membrane in Combination with Cell Therapy for Local Radiation Injuries

<sup>1</sup> A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

<sup>2</sup> M.I. Sechenov University, Moscow, Russia

Contact person: T.A. Astrelina, e-mail: t\_astrelina@mail.ru

### ABSTRACT

Cell therapy is a promising direction in medicine, which can significantly improve the results of treatment of various diseases, including local radiation injuries (LRI). The purpose of the study was to compare the results of using decellularized human amniotic membrane isolated

and together with lyophilisates of conditioned media of MSCs from the human gingival mucosa and MSCs from human placental tissue and their effect on tissue regeneration in LRI.

**Material and methods:** The study included 42 laboratory animals (white male rats of the Wistar line), randomly divided into 6 groups: K – control group without therapy, on the 21st day after irradiation, groups using: Am+LD – application of lyophilisate of the conditioned medium of MSCs of the human gingival mucosa (LD) under the decellularized amniotic membrane, Am+LP – application of lyophilisate of the conditioned medium of MSCs of human placental tissue (LP) under the decellularized amniotic membrane, Am – application of the decellularized amniotic membrane, AmCl – application of the decellularized amniotic membrane with medical glue BF-6, Kl – application of medical glue BF-6. Modeling of LRI in animals was carried out on an LNK-268 X-ray unit at a dose of 110 Gy and observed until the 112th day after irradiation, monitoring of the ulcerative surface of the skin and the course of the inflammatory process of LRI was carried out with calculation of the area of the total changed skin in the ImageTool software. Planimetric and histological analyzes were performed.

**Results:** It was demonstrated that, when compared with the control, the use of decellularized amniotic membrane in LRI on days 77 and 112 after irradiation increased the healing rate by 4.6 and 18 times, respectively; decellularized amniotic membrane with lyophilisate of placental MSC conditioned medium increased the rate of wound healing by 13.5 and 27 times, respectively; and a decellularized amniotic membrane with lyophilisate of MSCs from the human gingival mucosa to 100 % healing. Healing of the ulcer surface area of the LRI in 83.5 % of animals in the Am group demonstrated the effectiveness of using isolated decellularized amniotic membrane even in the absence of human MSC lyophilisates. At the same time, healing of the ulcer surface area of the LRI in the AmCl group was 20 % of cases, where the decellularized amniotic membrane was fixed with BF-6 medical glue, which was less effective compared to other groups.

**Conclusion:** The proposed combined use of decellularized amniotic membrane with lyophilisates of the conditioned medium of mesenchymal stromal cells (MSCs) of the placenta and mucous tissue of the human gums and the isolated use of decellularized amniotic membrane led to complete epithelization of the ulcer surface, a pronounced favorable course of grade IIIb–IV LRI in laboratory animals and a reduction in healing time, the absence of local or systemic complications can be considered as a promising method of conservative treatment for LRI of the skin and a new therapeutic approach in the treatment of non-healing and chronic wounds.

**Keywords:** local radiation injuries, human decellularized amniotic membrane, cell therapy, mesenchymal stromal cells, conditioned medium, rats

**For citation:** Rastorgueva AA, Astrelina TA, Brunchukov VA, Kobzeva IV, Suchkova YuB, Nikitina VA, Lishchuk SV, Dubova EA, Pavlov KA, Malivanova TF, Usupzhanova DYu, Mikhadarkina OG, Kobzev AD, Bulygina VI, Samoilov AS. Evaluation of the Effectiveness of The Use of Decellularized Human Amniotic Membrane in Combination with Cell Therapy for Local Radiation Injuries. Medical Radiology and Radiation Safety. 2024;69(3):5–12. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-3-5-12

## Введение

Клеточная терапия является перспективным направлением в медицине, которое может существенно улучшить результаты лечения различных заболеваний, включая местные лучевые поражения [1]. Одним из направлений в разработке клеточных технологий для лечения кожных ран в настоящее время является использование мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и их продуктов, в частности кондиционированной среды МСК [2–5]. Использование кондиционированной среды МСК в сочетании с амниотической мембраной может значительно повысить эффективность лечения и ускорить процесс регенерации тканей [6, 7]. Кроме того, применение клеточных технологий позволяет избежать многих побочных эффектов, связанных с использованием традиционных методов лечения [8].

Амниотическая мембрана (Ам) может служить поддерживающей матрицей, обеспечивающей клеточный каркас и необходимые условия для размещения и функционирования клеток и их микроокружения [6, 8–10].

Кондиционированная среда МСК содержит разнообразные факторы роста, цитокины и экзосомы, способствующие восстановлению, регенерации клеток и тканей, снижению воспаления и стимуляции пролиферации клеток [2–5].

Исследования применения регенеративных технологий (использование амниотической мембраны и кондиционированной среды) являются актуальными, перспективными и имеют большой потенциал для лечения местных лучевых поражений (МЛП).

Цель настоящего исследования – сравнение результатов применения децеллюляризованной амниотической оболочки человека изолировано и совместно с лиофилизатами кондиционированных сред МСК слизистой десны человека и МСК плацентарной ткани человека и их влияния на регенерацию тканей при МЛП.

## Материал и методы

В исследование включены 42 лабораторных животных (белые крысы-самцы линии Wistar с массой тела  $210,0 \pm 30,0$  г. в возрасте 8–12 нед), полученных в специализированном питомнике лабораторных животных «Пушино», имеющих соответствующее ветеринарное свидетельство и прошедших карантин. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» и с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Исследование одобрено на секции Ученого совета (выписка № 53 от 25.11.2020) и локальным биоэтическим комитетом ГНЦ ФМБЦ им А.И. Бурназяна ФМБА России (Протокол № 11 от 10.11.2021).

В зависимости от проводимой терапии лабораторные животные разделяли случайным образом на 6 групп:

- 1-ая группа ( $n=7$ ) (К) – контрольная группа (после облучения животные не получали специфического лечения).
- 2-ая группа ( $n=7$ ) (Ам+ЛД) – после облучения на язвенную поверхность МЛП аппликационно наносили лиофилизат кондиционированной среды МСК слизистой десны человека (ЛД) под децеллюляризованную амниотическую мембрану, фиксированную узловыми швами на 21-е сут.
- 3-ая группа ( $n=7$ ) (Ам+ЛП) – после облучения на язвенную поверхность МЛП аппликационно наносили лиофилизат кондиционированной среды МСК плацентарной ткани человека (ЛП) под децеллюляризованную амниотическую мембрану, фиксированную узловыми швами на 21-е сут.
- 4-ая группа ( $n=7$ ) (Ам) – после облучения на язвенную поверхность МЛП аппликационно наносили децеллюляризованную амниотическую мембрану, фиксированную узловыми швами на 21-е сут.

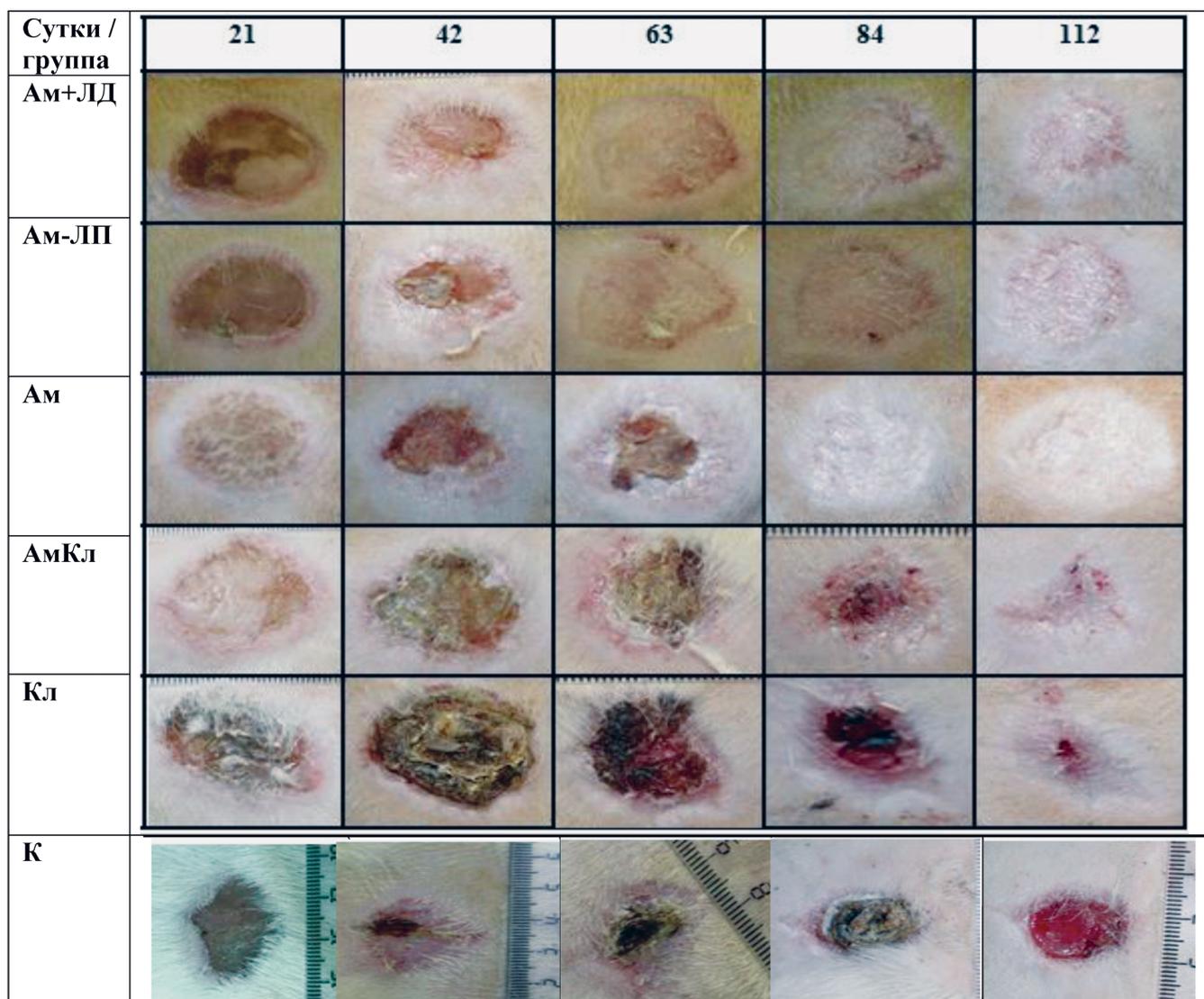


Рис. 1. Визуальная динамика заживления МЛП у крыс

Fig.1. Visual dynamics of MLP healing in rats

- 5-ая группа ( $n=7$ ) АмКл– на язвенную поверхность МЛП аппликационно наносили децеллюляризованную амниотическую мембрану с фиксацией медицинским клеем БФ-6 (Кл) на 21-е сут.
- 6-ая группа ( $n=7$ ) (Кл) – на язвенную поверхность МЛП аппликационно наносили медицинский клей БФ-6 на 21-е сут.

Каждое лабораторное животное наблюдали на 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105, 112-е сут после моделирования МЛП. При осмотре проводился мониторинг язвенной поверхности кожи и течение воспалительного процесса МЛП. Проводили измерение язвенной поверхности кожи (длина и ширина) МЛП с помощью линейки и цифрового фотоаппарата для дальнейшего расчета площади общей измененной кожи с использованием программного обеспечения ImageTool.

Вывод животных из эксперимента осуществляли на 112-е сут после облучения.

#### Моделирование МЛП

Моделирование МЛП тяжелой степени проводили на рентгеновской установке ЛНК-268 (РАП100-10) (ООО «Диагностика-М», Россия) с режимом радиационного

воздействия в дозе 110 Гр с алюминиевым фильтром 0,1 мм, напряжением 30 кВп, током пучка 6,1 мА, мощностью дозы 21,4 Гр/мин, погрешностью отпуска  $\pm 5\%$ , неопределенностью измерения дозы  $\pm 6\%$  по предложенной раннее методике [2]. Расстояние от источника излучения до зоны облучения составляло 15 см. Данная методика приводила к короткому латентному периоду и хронической язве кожи у лабораторных животных. После облучения животных рассаживали по индивидуальным стерильным боксам с автономной системой вентиляции Smart Flow (Tecniplast Group, Италия), обеспечивая свободный доступ к воде и еде.

#### Получение децеллюляризированной амниотической мембраны человека

Амниотические мембраны получали от плацент здоровых рожениц в возрасте от 22 до 39 лет (средний возраст составил  $29 \pm 3,7$  года) при отсутствии стандартных противопоказаний к донорам с одноплодной, физиологически протекавшей беременностью, закончившейся нормальными родами после подписания добровольного информированного согласия.

После выделения амниона в стерильных условиях, осуществляли его децеллюляризацию согласно ранее

разработанной методике получения бесклеточного матрикса амниотической мембраны с сохранными структурными компонентами внеклеточного матрикса [11].

### Получение лиофилизата кондиционированной среды

В исследовании использовали кондиционированную среду (КС) от персонифицированных образцов МСК слизистой десны человека, находящиеся на длительном криохраниении в биобанке. Все МСК (на 3 пассаже) культивировались в среде без ксеногенных компонентов – хепо-free (Stem Cell, Канада) с добавлением 100 Ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина; 2 мМ глутамина. МСК культивировали до 5 пассажа. Проводили тестирование полученной клеточной суспензии (оценивали количество, иммунофенотип и жизнеспособность). Забор КС МСК проводили в стерильные пробирки на 3–5-м пассаже при достижении 80–90 % конfluenceности. Для получения концентрата кондиционной среды из культуральной среды МСК использовали лабораторную систему фильтрации в тангенциальном потоке LabScale (США). Проводили лиофилизацию КС на лиофильной сушке Genesis SQ EL-85 фирмы VirTis (США). Для клинического лиофилизата кондиционной среды разводили физиологическим раствором до дозы соответствующей концентрации МСК (2 млн на 1 кг) на введение.

### Планиметрический анализ

Фотографии с МЛП кожи лабораторных животных анализировали в программе ImageTool. Для расчёта площади выделенного повреждения МЛП кожи животного задавали необходимый масштаб изображения.

### Гистологическое исследование

Биоптаты иссеченных образцов пораженных участков кожи (область раневого дефекта с прилежащей кожей и подлежащими мышцами) на 112-е сут после облучения фиксировали в 10 %-м нейтральном формалине. Гистологическое исследование биоптатов кожи МЛП проводили с применением окраски гематоксилин-эозином по стандартной методике на световом микроскопе при увеличениях от  $\times 40$  до  $\times 200$ .

Статистический анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007, Statistica 8.0, ImageTool.

### Результаты и обсуждение

#### Результаты планиметрического анализа

На 21-е сут у всех животных отмечали появление отслоившегося некротизированного эпидермиса (язва), покрывающего раневую поверхность кожи МЛП. В группе Ам+ЛД площадь язвенной поверхности кожи была достоверно больше по сравнению со всеми остальными группами ( $p \leq 0,05$ ) (табл. 1).

До 42-х сут исследования во всех группах отмечалась динамика уменьшения площади язвенной поверхности кожи МЛП животных и была меньше в группе Ам+ЛД по сравнению с остальными группами ( $p \leq 0,05$ ).

Начиная с 42-х сут исследования наблюдали тенденцию уменьшения площади язвенной поверхности кожи МЛП животных в группах Ам+ЛД, Ам+ЛП, Ам, Кл по сравнению с контрольной группой (К).

На 112-е сут полное заживление язвенной поверхности кожи МЛП отмечали в группе с применением децеллюляризованного амниона и лиофилизата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека (Ам+ЛД) в 100 % случаев, в группе Ам – в 83,5 %

Таблица 1

Средняя площадь язвы кожи животных в каждой группе на контрольные сут), см<sup>2</sup>  
The average area of an animal skin ulcer in each group on the control day.), cm<sup>2</sup>

Сут / группа	21	42	56	77	112
К	3,91±0,20	1,90±0,28	3,07±0,53	3,91±0,97	2,15±0,57
Ам	3,94±0,26*	1,46±0,24	1,15±0,34	0,85±0,39	0,12±0,08*
Кл	3,31±0,32	2,74±1,18*	3,17±1,14	1,94±0,42	0,50±0,17*
АмКл	3,19±0,16	1,99±0,21	1,68±0,44	1,86±0,42	1,67±0,80
Ам+ЛД	5,20±0,19*	1,10±0,21	0,3±0,25*	0,0±0,0	0,0±0,0*
Ам+ЛП	3,89±0,26*	1,91±0,31	0,57±0,34	0,29±0,32	0,08±0,09*

Примечание: \* –  $p \leq 0,05$

случаев, в группе Ам+ЛП – в 60 %, в группе АмКл – в 20 %, а в группах К и Кл не было ни одного животного с полностью затянувшимся язвенным дефектом.

### Результаты гистологических исследований

На 112-е сут после облучения при гистологическом исследовании отмечали уменьшение дермы, увеличение количества зачатков волосяных фолликулов и количества сосудов микроциркуляторного русла в группе Ам+ЛД по сравнению с другими группами, в которых эти изменения были не столь выражены. В контрольной группе лабораторных животных (К) отмечалась неполная регенерация с образованием рубцовой ткани. (рис. 2). Истончение дермы отмечали: у всех животных (100 %) в группе Ам+ЛД; у 20 % животных в группе Ам+ЛП; у 67 % в группе Кл, при этом у остальных животных (33 %) этой группы были выявлены признаки гиперплазии.

В группах АмКл и Кл отмечались немногочисленные внутриэпидермальные лимфоциты в 80 и 67 % случаев соответственно.

Во всех группах (К, Ам+ЛД, Ам+ЛП, Ам, АмКл, Кл) наблюдалась умеренно выраженная лимфоцитарная инфильтрация и фиброз дермы, кроме того, в группах АмКл и Кл выявлено большое количество нейтрофилов и замещение дермы грануляционной тканью.

Больше всего волосяных фолликулов (40 %) было обнаружено в группе Ам+ЛД. В остальных группах выявлены единичные волосяные фолликулы: в группе Ам+ЛП – 20 %, в группах Ам и АмКл – 16,5 % случаев.

При гистологическом исследовании отмечали пролиферацию сосудов микроциркуляторного русла в небольшом количестве в группах Ам (16,5 %) и АмКл (20 %).

Известно, что МСК и их кондиционированные среды являются потенциальными источниками паракринных факторов (эпидермальный рост. фактор, фактор роста кератиноцитов, инсулиноподобный фактор роста 1, VEGF- $\alpha$ , эритропоэтин, фактор 1) и усиливать ангиогенез (VEGF, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, фактор роста гепатоцитов, хемотаксический фактор моноцитов. белок-1, интерлейкин 6 и трансформирующий фактор роста (TGF)  $\beta 1$ ) при лечении хронических ран ускоряя процесс [12–15]. Децеллюляризованная амниотическая мембрана человека является каркасом клеточной адгезии, миграции и пролиферации, обладает иммуномодулирующими и иммунными, антимикробными, противорубцовыми и противовоспалительными свойствами, усиливает фиброгенез и ангиогенез и увеличивает отложение внеклеточного матрикса [16–17]. Амниотическая мембрана человека содержит большое количество цитокинов

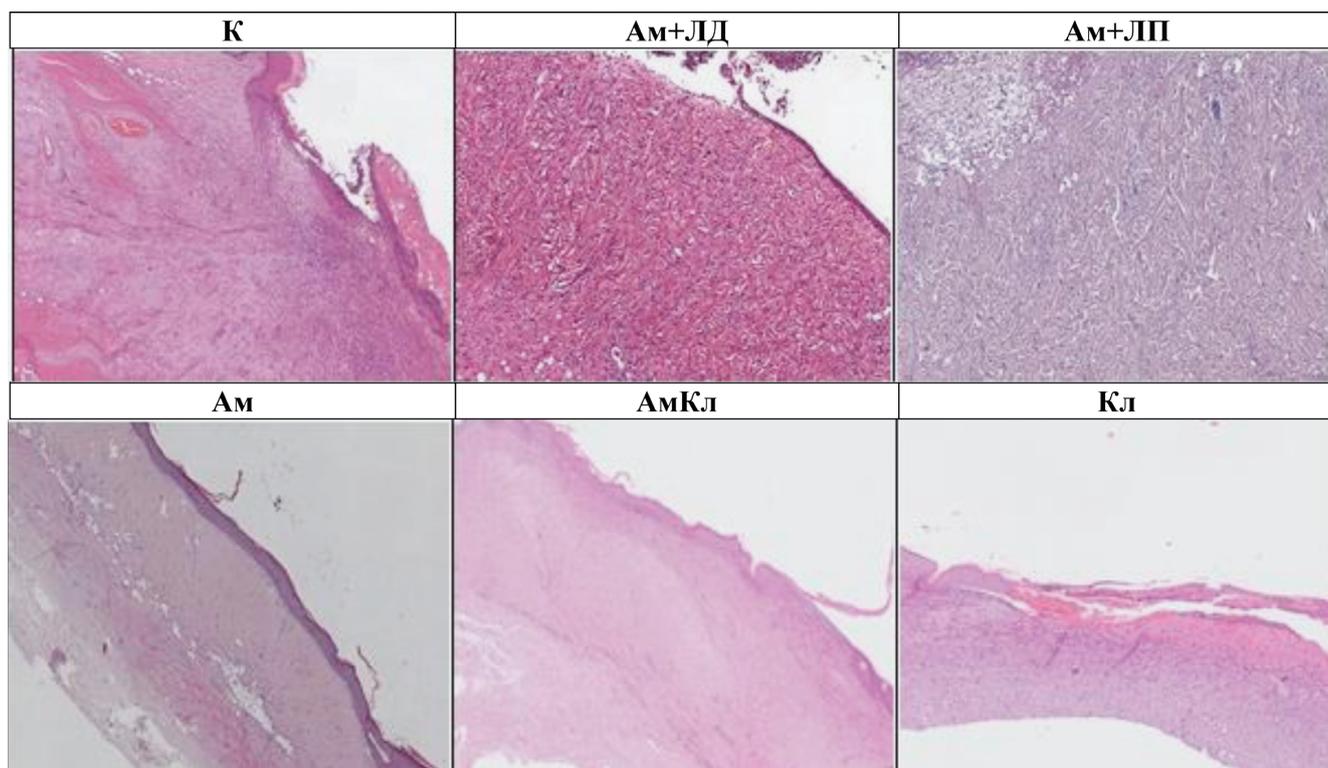


Рис. 2. Морфологические изменения в ране на 112-е сутки после нанесения МЛП. Увеличение  $\times 40$ , окраска гематоксилин-эозин  
 Fig. 2. Morphological changes in the wound on the 112th day after application of MLP. Magnification  $\times 40$ , hematoxylin-eosin staining

и факторов роста, включая эпидермальный фактор роста, основной фактор роста фибробластов, фактор роста кератиноцитов, VEGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , фактор роста тромбоцитов, фактор роста гепатоцитов и нервов. фактор роста [18]. В настоящем исследовании показано, что применение децеллюляризованной амниотической мембраны человека с лиофилизатами кондиционированной среды МСК эффективно при заживлении МЛП и может быть использовано для лечения незаживающих и хронических ран.

В ранее проведенном единственном исследовании [12] показано, что использование децеллюляризованной амниотической мембраны при МЛП на 80-е сут после облучения увеличило скорость заживления в 2,5 раза; использование децеллюляризованной амниотической мембраны с МСК костного мозга или лиофилизированными МСК костного мозга увеличивало скорость заживления ран в 4 раза.

В настоящем исследовании показано, что при сравнении с контролем использование децеллюляризованной амниотической мембраны при МЛП на 77 и 112-е сут после облучения увеличило скорость заживления в 4,6 и 18 раз соответственно; применение децеллюляризованной амниотической мембраны с лиофилизатом кондиционной среды МСК плаценты увеличивало скорость заживления ран в 13,5 и 27 раз соответственно, а децеллюляризованной амниотической мембраны с лиофилизатом МСК слизистой десны человека приводило к 100 %-му заживлению (рис. 3). Полученные результаты демонстрируют возможное значительное положительное действие паракринных факторов децеллюляризованной амниотической мембраны изолированно и усиление действия при комбинации с кондиционными средами МСК на заживление и эффективность консервативной терапии МЛП.

Заживление площади язвенной поверхности МЛП в 83,5 % у животных в группе Ам продемонстрировало эффективность применения изолированной децеллюляризованной амниотической мембраны даже в отсутствие лиофилизатов МСК человека. При этом заживление площади язвенной поверхности МЛП в группе АмКл составило в 20 % случаев, где децеллюляризованная амниотическая мембрана фиксировалась медицинским клеем БФ-6, что было менее эффективно по сравнению с другими группами.

Как показано в нашем исследовании, при использовании децеллюляризованной амниотической мембраны человека изолированно и в комбинации с лиофилизатами кондиционной среды МСК воспалительная реакция была незначительная и экссудация отсутствовала, что, очевидно, связано с ее выраженными противовоспалительными и барьерными свойствами.

Следует отметить, что полное заживление язвенной поверхности (100 %) МЛП на 112-е сут отмечали у животных в группе Ам+ЛД, в группе Ам+ЛП – у 60 %, что свидетельствовало о полноценной направленной миграции продуктов жизнедеятельности МСК слизистой десны человека в область повреждения, вероятно под действием провоспалительных цитокинов, которые активно участвуют в заживлении.

Результаты гистологического исследования группы Ам+ЛД свидетельствуют о клеточной регенерации, активной пролиферации сосудов микроциркуляторного русла, а также об увеличении количества волосных фолликулов в МЛП у лабораторных животных по сравнению с другими группами.

В контрольной группе животных, не получавших терапию и в группе с использованием клея БФ отмечали неполную репаративную регенерацию и образование толстой, грубой рубцовой ткани.

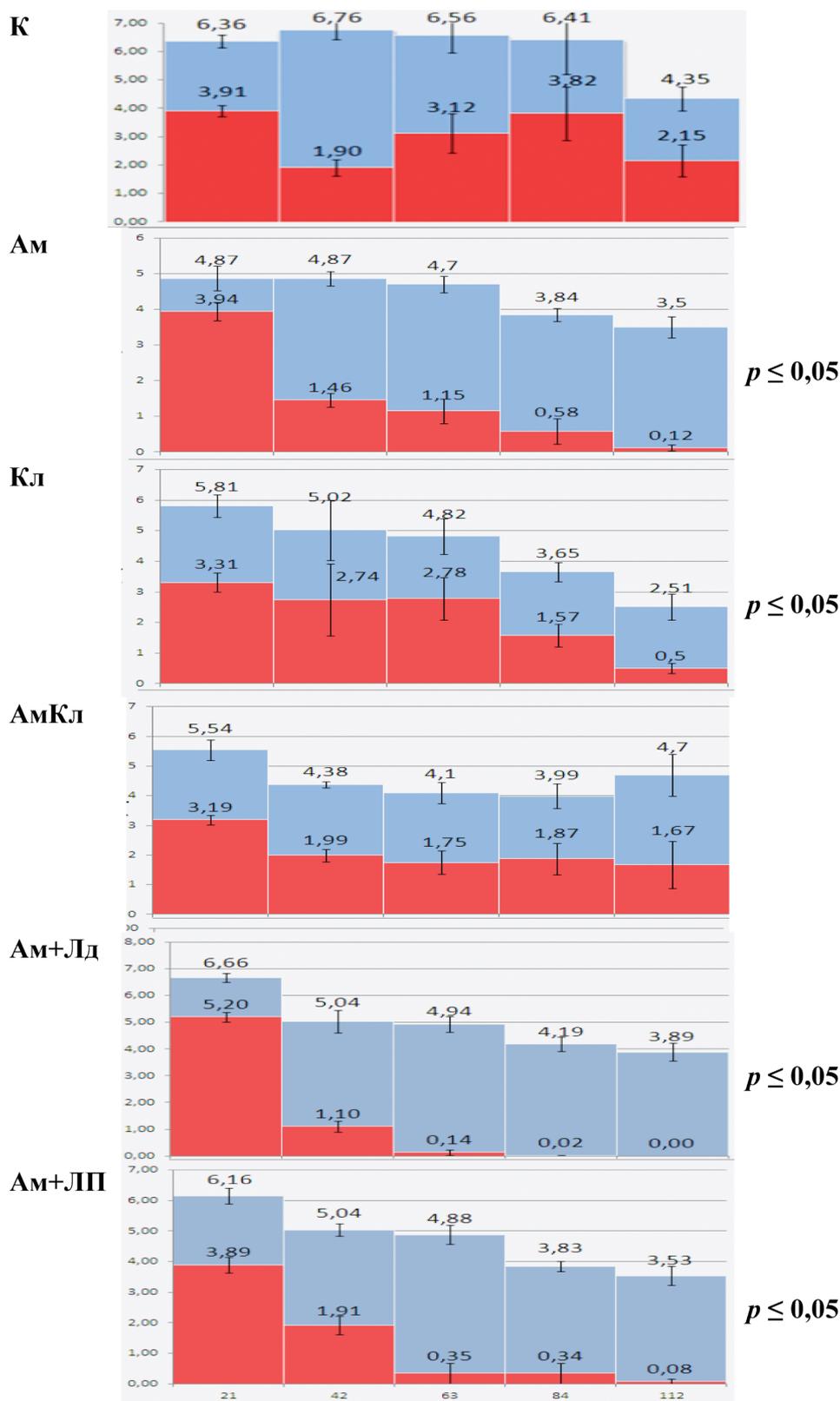


Рис. 3. Динамика развития МЛП кожи у животных с 21 до 112 сут (на оси абсцисс X – сутки эксперимента, на оси ординат Y – площадь поражения, см². Синим цветом обозначена площадь общей измененной поверхности, красным – площадь язвенной поверхности)

Fig. 3. Dynamics of development of skin MLP in animals from 21 to 112 days (on the x-axis X is the day of the experiment, on the y-axis Y is the affected area, cm². Blue indicates the area of the total changed surface, red indicates the area of the ulcerative surface)

**Заключение**

Предложенное комбинированное применение децеллюляризированной амниотической мембраны с лиофилизатами кондиционной среды мезенхимальных стромальных клеток (МСК) плаценты и слизистой ткани десны человека и изолированное применение децеллюляризированной амниотической мембраны приводило к полной

эпителизации язвенной поверхности, выраженному благоприятному течению МЛП тяжелой степени у лабораторных животных и сокращению сроков заживления, отсутствию местных или системных осложнений, что можно рассматривать как перспективный метод консервативной терапии МЛП кожных покровов и новый терапевтический подход в лечении незаживающих и хронических ран.

**СПИСОК ИСТОЧНИКОВ**

1. Диагностика, лечение местных лучевых поражений и их отдаленных последствий: Федеральные клинические рекомендации ФКР ФМБА России 2.6.7. М., 2015
2. Брунчуков В.А., Астрелина Т.А., Никитина В.А. и др. Применение мезенхимальных стромальных клеток плаценты при местных лучевых поражениях кожи // *Гены и клетки*. 2019. Т. 14. С.41.
3. Расторгуева А.А., Астрелина Т.А., Брунчуков В.А. и др. Эффективность применения МСК крыс и человека и их кондиционированных сред при местных лучевых поражениях на модели лабораторных животных // *Гены и клетки*. 2022. № 3, Т. 17. С.194.
4. Brunchukov V.A., Astrelina T.A., Nikitina V.A., et al. Experimental Treatment of Radiation Skin Lesions with Mesenchymal Stem Cells and Their Conditioned Media // *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2020. V.65. No.1. P.5-12. doi:10.12737/1024-6177-2020-65-1-5-12.
5. Rastorgueva AA, Astrelina TA, Brunchukov VA, et al. Application of Cellular Technologies in the Treatment of Local Radiation Injuries // *Abstract Book IRPA15*. 15th International Congress of the International Radiation Protection Association. 18-22 January, 2021, Seoul, Korea. OS6.3 (T6.4-0084) P.328-333.
6. Кобзева И.В., Астрелина Т.А., Брунчуков В.А. и др. Трансплантация децеллюляризированной амниотической мембраны человека при местных лучевых поражениях // *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2022. Т.67, №6. С.5-11.
7. Chen P, Lu M, Wang T, et al. Human Amniotic Membrane as a Delivery Vehicle for Stem Cell-Based Therapies // *Life Sci*. 2021. V.1. No.272. P.119157. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119157. Epub 2021 Jan 29. PMID: 33524418.
8. Leal-Marín S, Kern T, Hofmann N, et al. Human Amniotic Membrane: a Review on Tissue Engineering, Application, and Storage // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2021. V.109. No.8. P.1198-1215. doi: 10.1002/jbm.b.34782. Epub 2020 Dec 14. PMID: 33319484.
9. Пантелеев А.А., Сытина Е.В., Чабан Е.А., Пальцев М.А. Использование амниотической оболочки плода человека в бионженерии кожных покровов // *Молекулярная медицина*. 2016. Т.14, №5. 49-54.
10. Jahanafrooz Z, Bakhshandeh B, Behnam Abdollahi S, et al. Human Amniotic Membrane as a Multifunctional Biomaterial: Recent Advances and Applications // *J Biomater Appl*. 2023. T.37. №8. C.1341-1354. doi: 10.1177/08853282221137609. Epub 2022 Nov 4. PMID: 36331116.
11. Самойлов А.С., Астрелина Т.А., Брумберг В.А., Брунчуков В.А., Кобзева И.В., Маливанова Т.Ф., Осташкин А.С. Способ получения бесклеточного матрикса амниотической мембраны для последующей реконструкции дефектов тканей: Патент на изобретение №2751353RU от 13.07.2021. М., 2021.
12. Kakabadze Z., Chakhunashvili D., Gogilashvili K., Ediberidze K., Chakhunashvili K., Kalandarishvili K., Karalashvili L. Bone Marrow Stem Cell and Decellularized Human Amniotic Membrane for the Treatment of Nonhealing Wound after Radiation Therapy // *Exp Clin Transplant*. 2019. V.17. No.1. P.92-98. doi: 10.6002/ect.MESOT2018.O29.
13. Asanuma H, Meldrum DR, Meldrum KK. Therapeutic Applications of Mesenchymal Stem Cells to Repair Kidney Injury // *J Urol*. 2010. V.184. No.1. P.26-33.
14. Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Accelerates Skin Wound Healing: an in Vitro Study of Fibroblast and Keratinocyte Scratch Assays // *Exp Cell Res*. 2010. V.316. No.7. P.1271-1281.
15. Kwon HM, Hur SM, Park KY, et al. Multiple Paracrine Factors Secreted by Mesenchymal Stem Cells Contribute to Angiogenesis // *Vascul Pharmacol*. 2014. V.63. No.1. P.19-28.
16. Koob TJ, Lim JJ, Masee M, Zabeck N, Denoziere G. Properties of Dehydrated Human Amnion/Chorion Composite Grafts: Implications for Wound Repair and Soft Tissue Regeneration // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014. V.102. No.6. P.1353-1362.
17. Guo Q, Lu X, Xue Y, et al. A new Candidate Substrate for Cell-Matrix Adhesion Study: the Acellular Human Amniotic Matrix // *J Biomed Biotechnol*. 2012. V.2012. P.306083.
18. Mrugala A, Sui A, Plummer M, et al. Amniotic Membrane is a Potential Regenerative Option for Chronic Non-Healing Wounds: a Report of Five Cases Receiving Dehydrated Human Amnion/Chorion Membrane Allograft // *Int Wound J*. 2016. V.13. No.4. P.485-492.

**REFERENCES**

1. Diagnosis, Treatment of Local Radiation Injuries and Their Long-Term Consequences. Federal Clinical Guidelines. FKR FMBA of Russia 2.6.7. Moscow, 2015.
2. Brunchukov V.A., Astrelina T.A., Nikitina V.A., et al. The Use of Placental Mesenchymal Stromal Cells for Local Radiation Lesions of the Skin. *Genes and Cells*. 2019;14:41 (In Russ.).
3. Rastorgueva A.A., Astrelina T.A., Brunchukov V.A., et al. The Effectiveness of the Use of Rat and Human MSCs and Their Conditioned Media for Local Radiation Injuries in a Laboratory Animal Model. *Genes and cells*. 2022;3;17:194 (In Russ.).
4. Brunchukov V., Astrelina T., Nikitina V., et al. Experimental Treatment of Radiation Skin Lesions with Mesenchymal Stem Cells and Their Conditioned Media. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2020;65;1:5-12. doi:10.12737/1024-6177-2020-65-1-5-12.
5. Rastorgueva A.A., Astrelina T.A., Brunchukov V.A., et al. Application of Cellular Technologies in the Treatment of Local Radiation Injuries. Abstract book IRPA15. 15 th International Congress of the International Radiation Protection Association. January 18-22, 2021 in Seoul, Korea. Korea, P. 328-333.
6. Kobzeva I.V., Astrelina T.A., Brunchukov V.A., et al. Transplantation of Decellularized Human Amniotic Membrane for Local Radiation Injuries. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2022;67;6:5-11 (In Russ.).
7. Chen P., Lu M., Wang T., et al. Human Amniotic Membrane as a Delivery Vehicle for Stem Cell-Based Therapies. *Life Sci*. 2021;1;272:119157. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119157.
8. Leal-Marín S., Kern T., Hofmann N., et al. Human Amniotic Membrane: A Review on Tissue Engineering, Application, and Storage. *J. Biomed Mater Res. B. Appl. Biomater*. 2021;109;8:1198-1215. doi: 10.1002/jbm.b.34782.
9. Panteleyev A.A., Sytina E.V., Chaban E.A., Paltsev M.A. Use of Human Fetal Amniotic Membrane in Skin Bioengineering. *Molecular Medicine*. 2016;14;5:49-54 (In Russ.).
10. Jahanafrooz Z., Bakhshandeh B., Behnam Abdollahi S., et al. Human Amniotic Membrane as a Multifunctional Biomaterial: Recent Advances and Applications // *J. Biomater Appl*. 2023. V.37. No. 8. P. 1341-1354. doi: 10.1177/08853282221137609.
11. Samoilov A.S., Astrelina T.A., Brumberg V.A., Brunchukov V.A., Kobzeva I.V., Malivanova T.F., Ostashkin A.S. A Method

- for Obtaining an Acellular Matrix of the Amniotic Membrane for Subsequent Reconstruction of Tissue Defects. Patent for Invention No. 2751353RU dated 07/13/2021] (In Russ.).
12. Kakabadze Z., Chakhunashvili D., Gogilashvili K., Ediberidze K., Chakhunashvili K., Kalandarishvili K., Karalashvili L. Bone Marrow Stem Cell and Decellularized Human Amniotic Membrane for the Treatment of Nonhealing Wound after Radiation Therapy. *Exp. Clin. Transplant.* 2019;17;1:92-98. doi: 10.6002/ect.MESOT2018.O29.
  13. Asanuma H., Meldrum D.R., Meldrum K.K. Therapeutic Applications of Mesenchymal Stem Cells to Repair Kidney Injury. *J. Urol.* 2010;184;1:26-33.
  14. Walter M.N., Wright K.T., Fuller H.R., MacNeil S., Johnson W.E. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Accelerates Skin Wound Healing: an in Vitro Study of Fibroblast and Keratinocyte Scratch Assays. *Exp. Cell. Res.* 2010;316;7:1271-1281.
  15. Kwon H.M., Hur S.M., Park K.Y., et al. Multiple Paracrine Factors Secreted by Mesenchymal Stem Cells Contribute to Angiogenesis. *Vascul. Pharmacol.* 2014;63;1:19-28.
  16. Koob T.J., Lim J.J., Masee M., Zabek N., Denoziere G. Properties of Dehydrated Human Amnion/Chorion Composite Grafts: Implications for Wound Repair and Soft Tissue Regeneration. *J. Biomed Mater Res. B Appl. Biomater.* 2014;102;6:1353-1362.
  17. Guo Q., Lu X., Xue Y., et al. A New Candidate Substrate for Cell-Matrix Adhesion Study: the Acellular Human Amniotic Matrix. *J. Biomed Biotechnol.* 2012;2012:306083.
  18. Mrugala A., Sui A., Plummer M., et al. Amniotic Membrane Is a Potential Regenerative Option for Chronic Non-Healing Wounds: a Report of Five Cases Receiving Dehydrated Human Amnion/Chorion Membrane Allograft. *Int. Wound J.* 2016;13;4:485-492.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 гг. и на период до 2035 г.».

**Участие авторов.** Статья подготовлена с равным участием авторов.

**Поступила:** 20.01.2024. Принята к публикации: 27.02.2024.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Financing.** The study was carried out with financial support from the Federal Target Program “Ensuring Nuclear and Radiation Safety for 2016–2020 and for the period until 2035”.

**Contribution.** Article was prepared with equal participation of the authors.

**Article received:** 20.01.2024. Accepted for publication: 27.02.2024.