

УДК 576.54.085.23:611.085
DOI: 10.35693/2500-1388-2019-4-4-68-72

Новые подходы к изучению жизнедеятельности клеток в разных условиях культивирования с оценкой растворенного в питательной среде кислорода

Л.Т. Волова, Е.И. Пугачев, Т.К. Рязанова, И.Ф. Нефедова,
В.В. Болтовская, Н.А. Максименко

Аннотация

Цель — разработать новые подходы к изучению морфофункционального состояния хондробластов, культивируемых при 37°C на 3D-носителе из аллоспонгиозы в разных условиях: в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ и в термостате в герметичной пробирке.

Материал и методы. Исследование проведено на первичных хондробластах, выделенных из хряща суставных поверхностей фаланг добавочных пальцев. Клетки помещались на 3D-носитель — деминерализованную лиофилизированную спонгиозу человека «Лиопласт»®. Культивирование клеток проводили в полной ростовой среде при температуре 37°C в разных условиях: в закрытой системе в термостате и в открытой системе в CO₂-инкубаторе (5% CO₂). Для оценки морфофункционального состояния клеток на поверхности носителя использовали окраску пикросириусом красным, набор флуоресцентных красителей LIVE/DEAD® и растровую электронную микроскопию. Для получения данных о концентрации кислорода в питательной среде применяли модифицированный метод титрования по Винклера.

Результаты. С помощью комплекса морфологических методов подтверждено наличие живых клеток на поверхности аллоспонгиозы через 7 суток культивирования. Клетки имеют веретенновидную или полигональную форму и могут расти в 2 и более слоев. Титриметрический анализ показал снижение содержания растворенного в среде кислорода с клеточно-тканевым материалом через 7 суток культивирования на 72,4% в термостате и 63,5% в CO₂-инкубаторе. В пробирках без клеток с одним только носителем также происходило снижение содержания кислорода на 47,3% в термостате и 66,1% в CO₂-инкубаторе.

Выводы. 1. На основе титриметрического метода Винклера разработан способ оценки содержания растворенного кислорода в питательной среде при выращивании адгезивных клеточных культур на 3D-носителе. 2. Сравнительный анализ содержания растворенного в питательной среде кислорода при культивировании хондробластов на 3D-носителе из аллоспонгиозы в CO₂-инкубаторе и в закрытой пробирке в термостате показал общую тенденцию к снижению концентрации кислорода в течение 7 суток культивирования. 3. Установлен факт снижения концентрации кислорода в течение 7 суток в пробирках с образцами аллоспонгиозы (без клеток). 4. Эффективным и экономически выгодным способом создания тканеинженерных конструкций для хондропластики является заселение 3D-носителя из аллоспон-

гиозы хондробластами ювенильного суставного хряща и последующее культивирование в герметичной пробирке полностью заполненной питательной средой в течение 7 суток.

Ключевые слова: тканеинженерная конструкция, аллоспонгиоза, 3D-носитель для культур клеток, хондробласты, титриметрия, гистологическое исследование.

Конфликт интересов: не заявлен.

Для цитирования:

Волова Л.Т., Пугачев Е.И., Рязанова Т.К., Нефедова И.Ф., Болтовская В.В., Максименко Н.А. Новые подходы к изучению жизнедеятельности клеток в разных условиях культивирования с оценкой растворенного в питательной среде кислорода. Наука и инновации в медицине. 2019;4(4):68-72.

doi: 10.35693/2500-1388-2019-4-4-68-72

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (Самара, Россия)

Сведения об авторах

Волова Л.Т. — д.м.н., профессор, зав. биотехнологическим отделом ИЭМБ и директор НПЦ «Самарский банк тканей».

ORCID: 0000-0002-8510-3118

Пугачев Е.И. — научный сотрудник биотехнологического отдела ИЭМБ. ORCID: 0000-0002-3594-0874

Рязанова Т.К. — к.фарм.н., зав. лабораторией санитарно-химических методов исследований НИИ гигиены. ORCID: 0000-0002-4581-8610

Нефедова И.Ф. — зав. отделом экспериментальной морфологии ИЭМБ. ORCID: 0000-0003-3521-0748

Болтовская В.В. — к.м.н., старший научный сотрудник биотехнологического отдела ИЭМБ. ORCID: 0000-0003-3457-8524

Максименко Н.А. — зам. директора ИЭМБ, главный специалист НПЦ «Самарский банк тканей».

Автор для переписки

Пугачев Евгений Игоревич

Адрес: ул. Коммунистическая, 7/1, кв. 17, г. Самара, Россия, 443030.

E-mail: evgenesius@mail.ru

Тел.: 8 (996) 739 98 30.

ТИК — тканеинженерная конструкция;

ДИ — доверительный интервал.

Рукопись получена: 02.11.2019

Рецензия получена: 27.11.2019

Решение о публикации принято: 28.11.2019

New approaches to the study of cell vital activity cultivated in different growing conditions with analysis of oxygen in the medium

Larisa T. Volova, Evgeni I. Pugachev, Tatyana K. Riazanova, Irina F. Nefedova,
Violetta V. Boltovskaya, Natalya A. Maksimenko

Abstract

Objectives – to develop new approaches to the study of morphofunctional state of chondroblasts, cultured at 37°C on a 3D carrier in different environments: in a CO₂ incubator with 5% of CO₂ and in a thermostat in an air-proof tube.

Material and methods. The study cell culture – chondroblasts, isolated from the cartilage of the articular surfaces of the extra-fingers' phalanges. 3D carrier for cells – the demineralized lyophilized human spongiosa Lioplast®. The resulting tissue-engineered structures were grown in a complete cell culture medium at 37°C under different conditions: in a closed system in thermostat and in an open system in CO₂ incubator (5% CO₂). To assess the morphofunctional state of the cells on the surface of the 3D carrier, the picosirius red staining, a LIVE/DEAD® fluorescent dye kit, and scanning electron microscopy were used. The oxygen concentration in the culture medium was evaluated by the modified Winkler titration method.

Results. The complex of morphological methods revealed the presence of living cells on the surface of human spongiosa within the 7-day period of cultivation. The cells either are fusiform or have a polygonal form and have a capacity to grow in 2 or more layers. The titrimetric analysis has demonstrated a decline in the concentration of dissolved oxygen in the medium with cellular tissue material in 7 days of cultivation. The concentration declined by 72.4% in a thermostat and by 63.5% in a CO₂ incubator. In the tests tubes which contained only the medium and no cells, there was a similar decline in oxygen concentration by 47.3% in a thermostat and by 66.1% in a CO₂ incubator.

Conclusion. 1. A method of measuring the amount of dissolved oxygen in a culture medium, during the adhesive cell cultivation on a 3D carrier, was developed, based on the Winkler titration method. 2. A comparative analysis of the amount of dissolved oxygen in the medium in the process of chondroblast cultivation on a 3D human spongiosa carrier, both in a CO₂ incubator and in a closed test tube, revealed an overall tendency to a decrease in the concentration of oxygen within 7 days of cultivation. 3. A decrease in oxygen concentration in the test tubes with human spongiosa samples (without cells), within the 7 days of cultivation, was registered.

4. An efficient and cost-saving method of graft manufacturing for the purposes of chondroplasty is the transfer of juvenile joint cartilage chondroblasts to 3D human spongiosa carriers and their further cultivation in air-proof test tubes completely filled with medium within a period of 7 days.

Keywords: tissue-engineered structures, spongiosa, 3D carrier, chondroblasts, titrimetry, histological research.

Conflict of interest: nothing to disclose.

Citation

Volova LT, Pugachev EI, Riazanova TK, Nefedova IF, Boltovskaya VV, Maksimenko NA. **New approaches to the study of cell vital activity cultivated in different growing conditions with analysis of oxygen in the medium.** *Science & Innovations in Medicine*. 2019;4(4):68-72. doi: 10.35693/2500-1388-2019-4-4-68-72
Samara State Medical University (Samara, Russia)

Information about authors

Larisa T. Volova – PhD, Professor, the Head of Biotechnology Department of IEMB, director of Samara Tissue Bank.
ORCID: 0000-0002-8510-3118

Evgeni I. Pugachev – research associate of the Biotechnology Department of IEMB. ORCID: 0000-0002-3594-0874

Tatyana K. Riazanova – PhD, the Head of the laboratory of sanitary methods of Institute of Hygiene. ORCID: 0000-0002-4581-8610

Irina F. Nefedova – the Head of the Experimental morphology Department of IEMB.
ORCID: 0000-0003-3521-0748

Violetta V. Boltovskaya – PhD, senior research associate of the Biotechnology Department of IEMB.
ORCID: 0000-0003-3457-8524

Natalya A. Maksimenko – Deputy director of IEMB, senior specialist of Samara Tissue Bank.

Corresponding Author

Evgeniy I. Pugachev
Address: ap. 17, 7/1 Kommunisticheskaya st.,
Samara, Russia, 443030.
E-mail: evgenius@mail.ru
Phone: 8 (996) 739 98 30.

Received: 02.11.2019

Revision Received: 27.11.2019

Accepted: 28.11.2019

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы возрастает необходимость в разработке новых технологий выращивания различных клеточных культур на 2D- и 3D-носителях, а также в оценке жизнедеятельности клеток на таких матрицах-носителях. Такая тенденция обусловлена поиском оптимальных условий культивирования клеток для дальнейшего использования их в регенеративной медицине [1].

Многие ученые сходятся во мнении, что задачи по стимуляции пролиферации клеточной линии, дифференцировки в нужном направлении, а также точечной доставки клеток в организм реципиента при трансплантации ложатся именно на носители [2]. В настоящее время для лечения поврежденной хрящевой ткани разрабатываются тканеинженерные конструкции (ТИК) на основе хондробластов, мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из различных источников (жировой ткани, пуповины, костного мозга) [3, 4]. Как правило, в качестве носителей для клеток используют

биodeградируемые материалы из альгинатов, хитозана, коллагенов или твердые каркасы из керамики, коралла, всевозможных соединений кальция с напылением биологически активных веществ (факторов пролиферации и дифференцировки) [5–7].

Особый интерес представляют ТИК на основе природных наноструктурированных материалов, такие как разработанный в НПЦ «Самарский банк тканей» СамГМУ клеточный продукт на основе аллогенных хондробластов из ювенильного хряща суставных поверхностей фаланг добавочных пальцев (удаленных у детей с полидактилией) и 3D-бионесителя из деминерализованной лиофилизированной губчатой формации костной ткани человека.

В силу своей пористой структуры и химического состава носитель для клеток из человеческой аллоспонгиозы не только является уникальным каркасом, обеспечивающим транспорт клеток в область повреждения, но и служит своеобразным «биореактором» для хондробластов, стимулирующим их деление и дифференцировку [8].

Однако на данный момент недостаточно сведений о морфологическом состоянии хондробластов, а также особенностях их адаптации в условиях культивирования на 3D-носителе из аллоспонгиозы.

■ ЦЕЛЬ

Выполнить морфологическое исследование культуры хондробластов на бионosite из аллоспонгиозы и сравнительный анализ растворенного в питательной среде кислорода (важного дыхательного субстрата для клеток) в условиях стандартного культивирования в открытой системе (37°C, 5% CO₂) и в закрытой системе (37°C, герметичная емкость).

■ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для создания ТИК использовали следующие материалы (**рисунок 1**): культура хондробластов из хряща суставных поверхностей фаланг добавочных пальцев, удаленных у детей с полидактилией (патент РФ №2627817, от 11.08.2017 г.); 3D-носитель из лиофилизированной человеческой аллоспонгиозы Лиопласт®, изготовленной в Самарском банке тканей СамГМУ (патент РФ №2366173 от 15.05.2008 г.).

Посев хондробластов на 3D-носитель из аллоспонгиозы Лиопласт®. Хондробласты получали из хряща межфаланговых суставов добавочных пальцев, удаленных у детей с полидактилией. Клеточную культуру на 15 пассаже высевали в количестве 5×10⁴ на губчатый 3D-носитель объемом 27 мм³ (блок 3×3×3 мм). Полученные таким образом ТИК помещали в пробирки с полной ростовой средой (по 2 шт. в пробирку) и культивировали в разных условиях в течение 7 суток при 37°C: в пробирке с вентилируемой крышечкой при 5% CO₂ и в герметично закрытой пробирке, полностью заполненной питательной средой. Контролем послужил носитель без клеток, помещенный в аналогичные условия.

Растровая электронная микроскопия. Исследование ТИК было выполнено на кафедре металловедения, порошковой металлургии и наноматериалов СамГТУ на растровом электронном микроскопе JEOL JSM-6390A Analysis Station (Япония).

Биообъекты после культивирования в течение 7 суток отмывали, фиксировали 2,5-процентным водным

раствором глутарового альдегида и проводили по батарее спиртов возрастающей концентрации. Непосредственно перед микроскопированием поверхность образцов напыляли золотом или углеродом для улучшения электропроводности материала.

Флуоресцентная микроскопия. Хондробласты, прикрепленные к поверхности 3D-носителя из аллоспонгиозы после 7-дневного культивирования, окрашивали с помощью The Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Assay Kit, Thermo Fisher Scientific (США) по протоколу производителя. Calcein AM дает зеленую флуоресценцию живых клеток (515 нм), а ethidium homodimer-1 – красную флуоресценцию мертвых клеток (635 нм). После окраски образцы исследовали на микроскопе с флуоресцентным модулем Leica DMIL LED (Германия).

Гистологическое исследование. ТИК после культивирования в течение 7 суток фиксировали в 10-процентном формалине, обезжизняли в спиртах восходящей крепости, затем заливали в парафин и изготавливали серийные срезы толщиной 7–10 мкм. Препараты окрашивали пикросириусом красным и изучали на световом микроскопе Olympus BX41 с камерой Jenoptik ProgRes® CF (Германия).

Определение кислорода в питательной среде (йодометрическое титрование по Винклеру). Содержание кислорода, растворенного в питательной среде, определяли титриметрическим методом (йодометрическое титрование по Винклеру). Метод основан на способности гидроксида марганца (II) окисляться до гидроксида марганца (IV) в щелочной среде, количественно связывая при этом кислород. В кислой среде гидроксид марганца (IV) снова переходит в гидроксид марганца (II), окисляя при этом эквивалентное связанному кислороду количество йода, выделившийся йод оттитровывают тиосульфатом натрия.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование ТИК на растровом электронном микроскопе

На **рисунке 2** отчетливо видны клетки веретеновидной формы, распластанные на поверхности (трабекулах) носителя. Отростки клеток анастомозируют друг с

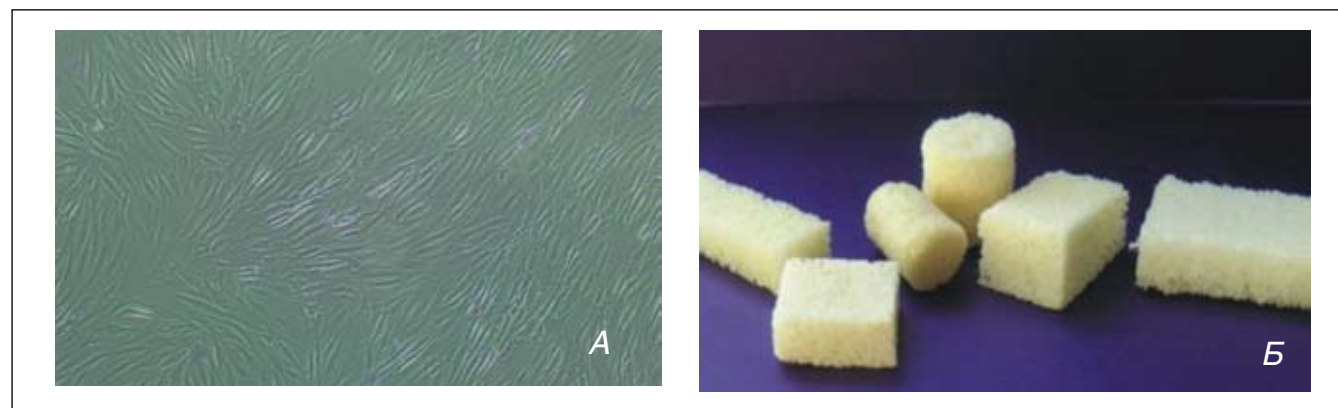


Рисунок 1. Компоненты ТИК: А – хондробласты из хряща межфаланговых суставов человека. Нативный препарат. Увеличение 100; Б – деминерализованная лиофилизированная аллоспонгиоза Лиопласт®

Figure 1. Components of tissue-engineered structures: А – chondroblasts of the cartilage of the articular surfaces of human phalanges. Native preparation. 100x magnification; Б – demineralized lyophilized human spongia Lioplast®

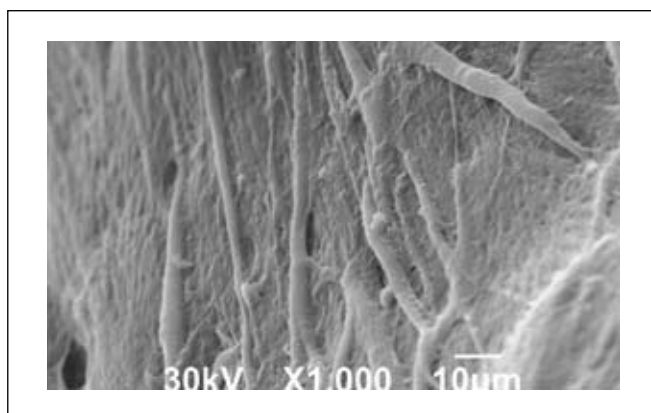


Рисунок 2. Хондробласты, прикрепленные к поверхности 3D-носителя из аллоспонгиозы. 7 суток культивирования. Растровая электронная микроскопия.

Figure 2. The chondroblasts, attached to the surface of the 3D media of spongiosa. 7 days of cultivation. Scanning electron microscopy.

другом. Наблюдается общее продольное направление роста клеток.

Исследование гистологических препаратов ТИК

Окраска Live/Dead® демонстрирует жизнеспособность хондробластов на 3D-носителе из спонгиозы, что подтверждается зеленым свечением клеток (**рисунок 3А**), и дополняет полученные фотографии гистологических препаратов, окрашенных пикросириусом красным, где был показан характер роста хондробластов на носителе через 7 суток культивирования ТИК.

На поверхности носителя наблюдаются клетки как фибробластоподобной, так и полигональной формы (**рисунок 3Б**). Ядра в таких клетках занимают значительную часть пространства в цитоплазме. За счет укороченных отростков клетки могут располагаться компактно и формировать два и более слоя. Причем такая картина роста характерна для ТИК из обеих исследуемых групп: выращенных и в вентилируемой пробирке в CO_2 -инкубаторе (37°C и $5\% \text{CO}_2$), и в герметичной пробирке в обычном термостате (37°C).

Анализ растворенного в питательной среде кислорода

Анализ содержания растворенного в питательной среде кислорода показал, что в обеих группах сравнения («Термостат» и « CO_2 -инкубатор») имеется тенденция к снижению содержания кислорода в питательной среде (**таблица 1**).

Изменения в контрольных и опытных группах за 7 дней эксперимента. Содержание кислорода в пробирках с ТИК через 7 дней культивирования снизилось на 72,4% – в термостате и 63,5% – в CO_2 -инкубаторе. Кроме того, в пробирках без клеток, с одним только носителем, также происходило снижение содержания растворенного кислорода, которое составило 47,3% – в термостате и 66,1% – в CO_2 -инкубаторе.

Сравнение контрольных и опытных образцов внутри групп сравнения. Содержание кислорода в пробирках с носителем и в пробирках с ТИК в группе из термостата было примерно на одном уровне в начале эксперимента и составило 5,03 мкг/мл – с носителем,

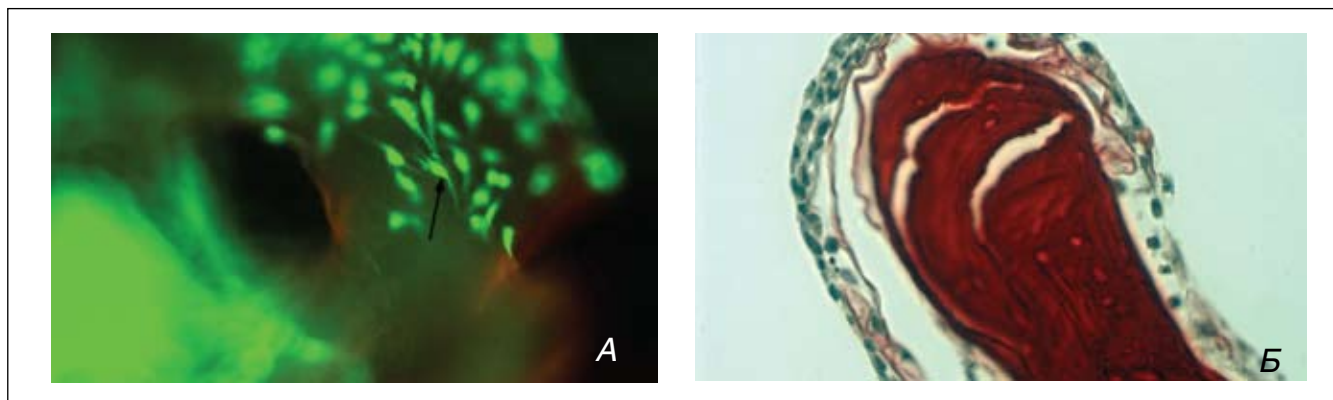


Рисунок 3. ТИК через 7 суток культивирования: А – живые, светящиеся зеленым клетки на поверхности аллоспонгиозы. Окраска – набор флюорофоров Live/Dead; Б – хондробласты, растущие на поверхности 3D-носителя. Окраска – пикросириус красный. Увеличение 400.

Figure 3. Tissue-engineered structures after 7 days of cultivation: A – alive cells, glowing green, on the surface of spongiosa. Staining – a LIVE/DEAD® fluorescent dye kit, B – chondroblasts growing on the surface of the 3D carrier. Staining – picosirius red. 400x magnification.

Период отбора проб / параметр		Термостат		CO_2 -инкубатор	
		Носитель без клеток	ТИК	Носитель без клеток	ТИК
День 0	Среднее (95% ДИ)	5,03 (4,37-5,69)	5,29 (4,69-5,89)	4,81 (4,21-5,41)	5,29 (4,69-5,89)
День 1	Среднее (95% ДИ)	3,39 (3,09-3,69)†	3,48 (3,04-3,92) †	4,73 (4,31-5,15)	5,16 (4,63-5,69)
День 7	Среднее (95% ДИ)	2,65 (2,31-2,99) †‡	1,46 (1,00-1,92)*†‡	1,63 (1,17-2,09)‡	1,93 (1,57-2,29)†‡
Разница средних значений содержания кислорода (95% ДИ)	День 1 по сравнению с Днем 0	-1,65 ((-2,30)-(-1,00))	-1,81 ((-2,18)-(-1,44))	-0,08±0,34 ((-0,42)-0,26)	-0,13 ((-0,46)-0,20)
	День 7 по сравнению с Днем 1	-0,74 ((-1,00)-(-0,48))	-2,03 ((-2,47)-(-1,59))*	-3,40 ((-3,85)-(-2,95))	-3,23 ((-3,59)-(-2,87))
	День 7 по сравнению с Днем 0	-2,39 ((-2,74)-(-2,04))	-3,83 ((-4,25)-(-3,41))*	-3,48 ((-3,87)-(-3,09))	-3,36 ((-3,62)-(-3,10))

Примечание: ДИ – доверительный интервал; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; † – $p < 0,05$ по сравнению со значением в День 0; ‡ – $p < 0,05$ по сравнению со значением в День 1.

Таблица 1. Содержания кислорода в питательной среде при культивировании хондробластов на носителе в разных условиях (мкг/мл)
Table 1. Oxygen concentration in the culture medium when cultivating chondroblasts on a carrier under different conditions (mcg/ml)

5,29 мкг/мл — с ТИК. Уже через 1 день культивирования эти показатели резко снизились и составили 3,39 мкг/мл — с носителем и 3,48 мкг/мл — с ТИК. К 7-м суткам культивирования также было зафиксировано снижение концентрации кислорода. При этом наблюдалась более выраженная достоверная разница между контрольными и опытными образцами: 2,65 мкг/мл — с носителем, 1,46 мкг/мл — с ТИК.

Содержание кислорода в контрольных и опытных пробирках в группе из CO₂-инкубатора отличалось уже в начале эксперимента и составило 4,81 мкг/мл — с носителем и 5,29 мкг/мл — с ТИК. Через 1 день культивирования эти показатели практически не изменились (4,73 мкг/мл — с носителем, 5,16 мкг/мл — с ТИК), а спустя 7 дней они упали до 1,63 мкг/мл и 1,93 мкг/мл в соответствующих группах.

Сравнение аналогичных образцов из разных групп сравнения. В начале эксперимента (день 0) показатели кислорода в среде с ТИК в группах сравнения («Термостат» и «CO₂-инкубатор») были идентичны и составили 5,29 мкг/мл. Через сутки показатели в этих группах отличались: 3,48 мкг/мл — в термостате, 5,16 мкг/мл — в CO₂-инкубаторе. Через 7 суток концентрация кислорода в пробирках с ТИК составила 1,46 мкг/мл — в термостате и 1,93 мкг/мл — в CO₂-инкубаторе.

В пробирках с носителем без клеток в начале эксперимента концентрация кислорода составила 5,03 мкг/мл — в термостате и 4,81 мкг/мл — в CO₂-инкубаторе. Через сутки в пробирках из CO₂-инкубатора изменений практически не было (4,73 мкг/мл), а в термостате

концентрация кислорода в пробах снизилась и составила 3,39 мкг/мл. Спустя 7 суток концентрация кислорода в пробирках с пустым носителем составила 2,65 мкг/мл — в термостате и 1,63 мкг/мл — в CO₂-инкубаторе.

■ ВЫВОДЫ

1. На основе титриметрического метода Винклера разработан способ оценки содержания растворенного кислорода в питательной среде при выращивании адгезивных клеточных культур на 3D-носителе.

2. Сравнительный анализ содержания растворенного в питательной среде кислорода при культивировании хондробластов на 3D-носителе из аллоспонгиозы в CO₂-инкубаторе и в закрытой пробирке в термостате показал общую тенденцию к снижению концентрации кислорода в течение 7 суток культивирования.

3. Установлен факт снижения концентрации кислорода в течение 7 суток в пробирках с образцами аллоспонгиозы (без клеток).

4. Эффективным и экономически выгодным способом создания тканеинженерных конструкций для хондропластики является заселение 3D-носителя из аллоспонгиозы хондробластами ювенильного суставного хряща и последующее культивирование в герметичной пробирке, полностью заполненной питательной средой, в течение 7 суток. ■

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Saburina IN, Repin VS. 3D-cultivation: from cells to regenerative tissue. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2010;5(2):75–86. (In Russ.). [Сабурина И.Н., Репин В.С. 3D-культивирование: от отдельных клеток к регенерационной ткани. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2010; 5(2):75–86].
2. Krishna L, Dhamodaran K, Jayadev C, et al. Nanostructured scaffold as a determinate of stem cell fate. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Dec 30;7(1):188. doi: 10.1186/s13287-016-0440-y
3. Surguchenko VA, Ponomareva AS, Kirsanova LA, et al. Development of tissue engineering constructs of cartilage tissue *in vitro*. 2013;15(3):66–72. (In Russ.). [Сургученко В.А., Пономарева А.С., Кирсанова Л.А. и др. Формирование тканеинженерной конструкции хрящевой ткани в условиях *in vitro*. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2013;15(3):66–72].
4. Shishackaya EI, Nikolaeva ED, Shumilova AA, et al. Cultivation of multipotent mesenchymal stromal bone marrow cells on resorbable Bioplastotan. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2013;8(1):57–65. (In Russ.). [Шишацкая Е.И., Николаева Е.Д., Шумилова А.А. и др. Культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на носителе из резорбируемого биопластотана. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2013;8(1):57–65].
5. Ho MH, Kuo PY, Hsieh HJ, Hsieh TY, et al. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. *Biomaterials*. 2004;25:129–138. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00483-6
6. Cao W, Wang A, Jing D, Gong Y, et al. Novel biodegradable films and scaffolds of chitosan blended with poly (3-hydroxybutyrate). *Jornal of Biomaterials' Science Polymers*. 2005;16(11):1379–94. doi: 10.1163/156856205774472308
7. Shi DH, Cai DZ, Zhou CR, et al. Development and potential of a biomimetic chitosan/type II collagen scaffold for cartilage tissue engineering. *Chin Med J (Engl)*. 2005 Sep 5;118(17):1436–43.
8. Pugachev EI. Comparative analysis of the proliferative activity of chondroblasts on a 3D bio-carrier under different cultivation conditions. *Materialy konferencii*. Samara, 2017. (In Russ.). [Пугачев Е.И. Сравнительный анализ пролиферативной активности хондробластов на 3D-бионosite в разных условиях культивирования. *Материалы конференции*. Самара, 2017]. http://www.samsmu.ru/files/news/2017/201017/asp_read_2017.pdf