

# ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ МАТЕРИАЛОВ С РАЗЛИЧНЫМ ПОКРЫТИЕМ ДЛЯ ОРТОПЕДИЧЕСКИХ ФИКСИРУЮЩИХ КОНСТРУКЦИЙ В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ

Канд. мед. наук А. Е. БАРЫШ, канд. биол. наук С. В. МАЛЫШКИНА

## THE STUDY OF BIOCOMPATIBILITY OF MATERIALS WITH VARIOUS SURFACES FOR ORTHOPEDIC FIXATION APPLIANCES IN FIBROBLAST CULTURE

A. E. BARYSH, S. V. MALYSHKINA

*Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М. И. Ситенко АМН Украины, Харьков, Украина*

**Представлены результаты исследования биосовместимости и цитотоксичности образцов материалов погружных титановых и танталовых фиксирующих устройств с различными оксидными и керамическими покрытиями *in vitro* при культивировании фибробластов. Показано, что исследованные образцы являются биосовместимыми.**

*Ключевые слова: металлические ортопедические фиксирующие конструкции, покрытия, совместимость.*

**The findings of the study of biocompatibility and cytotoxicity of material samples of submerging titan and tantalum fixing appliances with various oxide and ceramic surfaces *in vitro* in fibroblast culture are presented. The investigated samples were shown to be biocompatible.**

*Key words: metallic orthopedic fixation appliances, covering, compatibility.*

Для погружных фиксирующих конструкций, применяющихся в хирургии позвоночника при лечении его заболеваний и повреждений, необходимо их соответствие строгим требованиям, касающимся, в частности, отсутствия нежелательного специфического воздействия на организм материала, из которого они изготовлены. Реакция биологических тканей организма на фиксатор во многих случаях зависит именно от особенностей имплантированного материала (естественные, синтетические или полусинтетические вещества, металлы и т. д.). На сегодняшний день в практике ортопедии-травматологии используют большое количество разнообразных имплантатов из новых материалов, которые должны пройти целый ряд соответствующих исследований. При этом для предварительного скрининга материалов применяют экспресс-метод культуры тканей (метод биоиндикации), который позволяет в достаточно короткий срок сделать вывод о наличии или отсутствии их цитотоксического действия на биологические ткани [1, 2].

При исследовании имплантационных материалов, контактирующих *in vivo* с такими биологическими тканями человека, как кость, суставной хрящ, костный мозг, параоссальные ткани, принято использовать культуру клеток соединительной ткани (фибробластов), костного мозга, мезенхимальных клеток, хрящевого дифферона. При этом предпочтение отдают первичным культурам тканей, так как пересаживаемые клеточные линии генетически и метаболически отличаются от клеток

организма и демонстрируют большую устойчивость к различным неблагоприятным факторам [3]. Поэтому на данном этапе исследований может быть использована подкожно-жировая клетчатка, которая в условиях культивирования *in vitro* дает рост клеток фибробластического дифферона. Кроме того, изучение культуры фибробластов целесообразно ещё и потому, что при проведении токсикологических исследований различных новых материалов или их комбинаций чаще всего их имплантируют в подкожно-жировую клетчатку, т. е. реакция организма опосредуется через систему соединительной ткани, основными структурными элементами которой являются клетки фибробластического дифферона.

Целью настоящей работы явилось изучение биосовместимости и возможного цитотоксического действия материалов с различным покрытием для погружных металлических ортопедических фиксирующих конструкций *in vitro* в культуре фибробластов.

Материалом для исследования стали специально изготовленные металлические образцы в виде дисков диаметром 5 мм и высотой 2 мм с различным покрытием: образцы № 2, 3, 4, 5 — титан с односторонним покрытием из оксида титана; образцы № 6, 7, 8, 9 — титан с односторонним покрытием из корундовой керамики; образцы № 12, 15, 16 — тантал с односторонним покрытием из оксида тантала. Контроль был представлен культурой фибробластов без каких-либо образцов.

Использовали следующие методы исследования.

**Культивирование клеток.** Для изучения биосовместимости и возможного цитотоксического действия исследуемых имплантируемых материалов использовали первичную культуру фибробластов, полученную из подкожно-жировой клетчатки лабораторных крыс [4]. Работу с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией защиты лабораторных животных [5]. Суспензию выделенных клеток центрифугировали при 750 об/мин в течение 15 мин, после чего ресуспендировали клетки. Определение числа живых клеток в подготовленном для культивирования концентрате, а также снятых со стёкол клеток в соответствии со сроками культивирования проводили с 0,1% раствором кристаллвиолета, подсчитывая их количество в камере Горяева. Погибшие клетки определяли при окрашивании клеточной суспензии 0,1% раствором трипанового синего. Общее количество живых и нежизнеспособных клеток определяли по специальной формуле [6]. Посевное количество клеток составило  $2 \times 10^4$  на 1 мл среды 199. Культивирование фибробластов производили по методу монослойной культуры в термостате в стерильных условиях при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 5 суток, исследуя состояние культуры на 3-е и 5-е сутки. Такой срок наблюдения был избран в связи с тем, что при культивировании в монослойной культуре на 3–4-е сутки в культуре фибробластов чётко определяется зональное расположение клеток, а нарушение зональности является одним из параметров, которые могут характеризовать влияние внешних факторов на культивированные клетки [7]. Что касается второго избранного срока наблюдения (5-е сутки), то принимали во внимание то, что именно в эти сроки (5–7-е сутки) культуры фибробластов выходят из стадии стабильного роста и вступают в стадию дегенерации культуры.

Образцы исследуемых материалов после стерилизации размещали на покровных стёклах в чашках Петри с питательной средой, где культивировались клетки.

Культивирование фибробластов проводили также с вытяжкой: питательную среду 199 с образцами исследуемых материалов на протяжении 7 суток выдерживали в термостате при температуре  $37^\circ\text{C}$  в расчёте 2 образца на 5 мл питательной среды. Полученную вытяжку добавляли в исследуемые культуры на 2-е сутки культивирования во время смены питательной среды. До конца культивирования питательную среду не меняли.

**Цитологические методы.** Для характеристики структурной организации культивированных клеток (форма клеток, состояние их ядер и цитоплазмы, наличие митозов) культуры на стёклах окрашивали азур-эозином по Романовскому.

Количество клеток в культурах по срокам культивирования оценивали после снятия их со стёкол путём трипсинизации. Общее количество

клеток подсчитывали после окрашивания кристаллвиолетом, а погибшие клетки определяли при добавлении к суспензии клеток 0,1% раствора трипанового синего в соотношении 1:1. Количество клеток в камере Горяева обсчитывали по специальной формуле [6].

Полученные данные были приведены в соответствие с международной системой единиц и обработаны методом вариационной статистики с использованием прикладного пакета Statistica 5.11 for Windows, а уровень достоверности принят 95%.

**Анализ реакции культивированных фибробластов с образцами исследуемых материалов с разными покрытиями (3-и сутки).** При цитологическом исследовании состояния культивированных фибробластов в культурах с образцами материалов и в контрольной культуре отличий не было выявлено. На стёклах исследуемых культур определялись клетки фибробластического дифферона, которые неплотным слоем располагались практически по всему стеклу (рис. 1). В естественном размещении клеток на стёклах определялись три зоны. В центре стекла клетки располагались более компактно, формируя тяжи. Во второй зоне наблюдались лишь отдельные тяжи клеток и множественные клетки, расположенные поодиночке. На периферии стекла плотность клеток была наименьшей. Во всех зонах к этому времени отмечалось значительное количество клеток с митозами (рис. 2).

Фибробласты на стекле имели полигональную форму — продолговатую, веретеновидную и звёздчатую. Их цитоплазма имела небольшие отростки. Ядра были крупными с неплотным гипохромным хроматином. В ядрах большинства клеток определялись 2–3 ядрышка. Структурная организация клеток свидетельствовала об их принадлежности к молодым фибробластам.

На периферии стёкол как в исследуемых, так и в контрольных культурах, кое-где отмечали клетки с пикнотичными ядрами и вакуолизированной цитоплазмой. Для объективизации данных относительно количества погибших клеток и общего числа клеток в культурах было проведено их количественное определение в разных опытных и контрольных сериях, результаты которого приведены в табл. 1.

При сравнении числа клеток в культурах не было установлено достоверных отличий как в общем количестве клеток, так и в количестве нежизнеспособных клеток в опытной и контрольной культурах. Процент погибших клеток в контрольной культуре составил 4,8%, в исследуемых культурах колебался в пределах от 5,3% (образец № 8) до 11,8% (образец № 2). Установленное количество погибших клеток в опытных и контрольной культурах находится в границах нормы для первичных культур [7].

При исследовании состояния культур с вытяжкой, которая была получена при 7-суточной

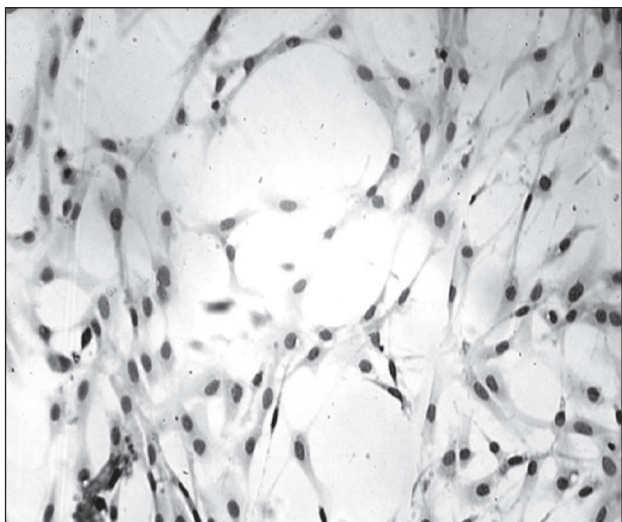


Рис. 1. Клетки фибробластического дифферона, равномерно расположенные по стеклу с образцами материала № 7. Окраска азур-эозином по Романовскому. Ув. 50.

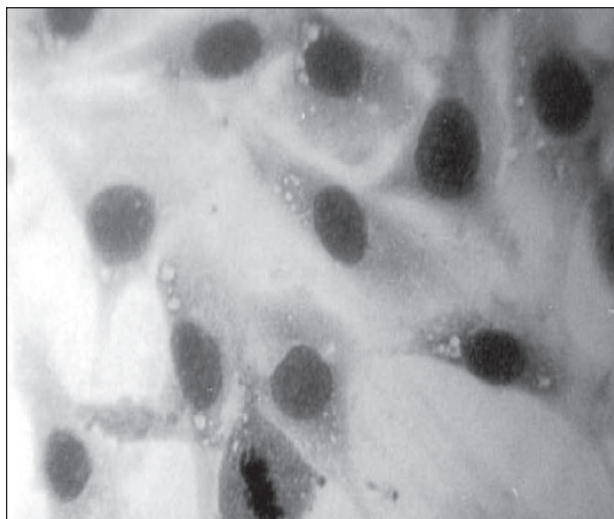


Рис. 2. Клетки с митозом в культуре с образцом № 7. Окраска азур-эозином по Романовскому. Ув. 200.

выдержке исследуемых образцов фиксирующих конструкций с покрытием не было выявлено разницы в характеристиках плотности расположения клеток на стеклах ни в опытных, ни в контрольных чашках. Четко определялись зоны более плотного и сеткообразного расположения клеток фибробластического дифферона, а также зоны мигрирующих отдельных клеток на периферии. Преобладали молодые формы клеток, имевшие типичную структурную организацию для клеток фибробластического дифферона. Отмечено значительное количество делившихся клеток. Кроме того, определялись отдельные клетки (особенно на периферии), имевшие нарушения их структурной организации в виде пикноза ядра, разрыва цитолеммы и вакуолизации цитоплазмы. Общее количество клеток, снятых со стекла и погибших в опытных культурах, не отличалось от контрольной серии (табл. 2).

*Анализ реакции культивированных фибробластов с образцами исследуемых материалов с разными покрытиями (5-е сутки).* К данному сроку исследования отмечалось достоверное повышение плотности клеток на стеклах как в контрольной культуре фибробластов, так и в опытных, культивированных с образцами исследуемых материалов с покрытием (табл. 1). Фибробласты, преимущественно продолговатой формы, полностью заполняли стекло (рис. 3). Границы отмеченных на 3-и сутки зон расположения клеток практически не определялись, однако плотность клеток оставалась более выраженной в центре стекла в зоне компактного расположения клеток. Местами клетки напластовывались одним слоем на другой. На некотором расстоянии клеточные пролифераты формировали извилистые фигуры. Плотность клеток была значительной и на периферии стек-

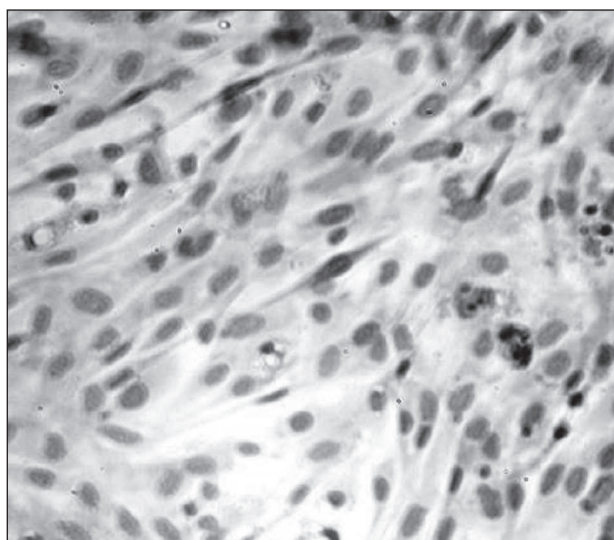


Рис. 3. Плотное расположение фибробластов на стекле в опытной культуре (образец № 7). Окраска азур-эозином по Романовскому. Ув. 50

ла, где клетки располагались в виде небольших скоплений и поодиночке. На стеклах к этому сроку доминировали зрелые формы фибробластов, имевшие веретенообразную форму и небольшое плотное ядро. Отмечено уменьшение количества делившихся клеток. Увеличилось число клеток с пикнотичными ядрами, имелись клетки с вакуолизацией и деструкцией цитоплазмы. Такие клетки отмечались не только на периферии культур. Однако, как свидетельствуют данные количественного анализа, их количество не отличалось от контрольной культуры (табл. 1).

Количество погибших клеток в контрольной культуре составило 7,9%, а в опытных культурах колебалось в границах от 6,3% (образец № 6) до

Количество клеток в культурах с образцами материалов с разным покрытием ( $n = 7$ )

Серии опытов	3-и сутки		5-е сутки	
	Общее количество клеток	Погибшие клетки (абс. и отн. кол-во)	Общее количество клеток	Погибшие клетки (абс. и отн. кол-во)
Контроль — культура фибробластов	$2,34 \times 10^4 + 2,35 \times 10^3$	$1,17 \times 10^3 + 1,77 \times 10^2$ 5 %	$3,77 \times 10^4 + 1,97 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$3,06 \times 10^3 + 2,15 \times 10^2$ 8 %
Опыт — культура + образец №5	$2,06 \times 10^4 + 2,1 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$2,12 \times 10^3 + 1,83 \times 10^2$ 10 %	$3,31 \times 10^4 + 1,59 \times 10^2$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$4,68 \times 10^3 + 4,67 \times 10^2$ 14 %
Опыт — культура + образец №15	$2,54 \times 10^4 + 1,99 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,58 \times 10^3 + 1,61 \times 10^2$ 6 %	$3,85 \times 10^4 + 1,94 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$3,65 \times 10^3 + 2,82 \times 10^2$ 9 %
Опыт — культура + образец №16	$2,62 \times 10^4 + 2,67 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,78 \times 10^3 + 2,05 \times 10^2$ 6 %	$3,95 \times 10^4 + 2,02 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$2,92 \times 10^3 + 2,49 \times 10^2$ 7 %
Опыт — культура + образец №8	$2,43 \times 10^4 + 1,75 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,32 \times 10^3 + 1,83 \times 10^2$ 5 %	$3,73 \times 10^4 + 2,25 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$3,06 \times 10^3 + 2,13 \times 10^2$ 8 %
Опыт — культура + образец №2	$2,18 \times 10^4 + 2,12 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$2,56 \times 10^3 + 1,99 \times 10^2$ 11 %	$3,27 \times 10^4 + 2,78 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$4,71 \times 10^3 + 5,82 \times 10^2$ 14 %
Опыт — культура + образец №6	$2,58 \times 10^4 + 1,81 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,65 \times 10^3 + 1,91 \times 10^2$ 6 %	$4,05 \times 10^4 + 1,46 \times 10^3$ $p < 0,001; p_1 > 0,05$	$2,51 \times 10^3 + 2,67 \times 10^2$ 6 %
Опыт — культура + образец №4	$2,18 \times 10^4 + 1,44 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,66 \times 10^3 + 2,25 \times 10^2$ 7 %	$3,43 \times 10^4 + 2,17 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$3,42 \times 10^3 + 3,73 \times 10^2$ 9 %
Опыт — культура + образец №9	$2,18 \times 10^4 + 2,32 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,57 \times 10^3 + 1,53 \times 10^2$ 7 %	$3,48 \times 10^4 + 1,72 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$3,94 \times 10^3 + 3,36 \times 10^2$ 11 %
Опыт — культура + образец №12	$2,58 \times 10^4 + 2,37 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,55 \times 10^3 + 1,17 \times 10^2$ 6 %	$3,86 \times 10^4 + 1,97 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$2,78 \times 10^3 + 2,23 \times 10^2$ 7 %
Опыт — культура + образец №3	$2,16 \times 10^4 + 2,46 \times 10^3$ $p_1 < 0,01$	$1,75 \times 10^3 + 1,92 \times 10^2$ 8 %	$3,55 \times 10^4 + 2,39 \times 10^3$ $p < 0,01$	$3,69 \times 10^3 + 3,38 \times 10^2$ 10 %
Опыт — культура + образец №7	$2,41 \times 10^4 + 1,89 \times 10^3$ $p_1 < 0,01$	$1,35 \times 10^3 + 1,48 \times 10^2$ 5 %	$3,80 \times 10^4 + 2,32 \times 10^3$ $p < 0,01$	$3,19 \times 10^3 + 2,87 \times 10^2$ 8 %

$p$  — достоверные отличия относительно показателей предыдущего срока исследования;  $p_1$  — отличия относительно показателей в контрольной культуре на данный срок исследования. То же в табл. 2.

14,2 % (образец № 2). Обращает на себя внимание тот факт, что наибольшее количество погибших клеток (14,2 %) было зафиксировано для образца, изготовленного из титана.

При исследовании культур фибробластов, культивированных с вытяжкой из образцов исследуемых материалов с покрытием, отличий в характере расположения клеток на стёклах, цитологической характеристике клеток в культурах опытных и контрольной серий не было отмечено. Клетки, представлявшие собой преимущественно зрелые фибробласты, в культурах сохраняли свой фенотип. Общее количество клеток и число погибших клеток достоверно не отличалось от показателей предшествующих серий и от данных контрольной серии (табл. 2).

Количество погибших клеток в контрольной культуре составило 8 %, а в опытных культурах колебалось в границах от 7 % (образец № 6) до 14 % (образец № 5), что не превышает допустимых границ для первичных культур.

Следовательно, цитологические характери-

стики фибробластов в культурах, сохранение фенотипа клеток в соответствии со сроками наблюдения, прирост клеток в культурах, характер их расположения на стёклах, общее количество клеток в культурах и число деструктивно изменённых и погибших клеток свидетельствуют о том, что культуры фибробластов на 5-е сутки как в контрольной, так и в опытных сериях находятся в стадии стабильного роста, а наличие в питательной среде образцов исследуемых материалов с покрытием или вытяжки из образцов не оказывает на клетки цитотоксического действия. Это является подтверждением того, что исследуемые образцы материалов с покрытиями являются биосовместимыми. Количество погибших клеток в опытных культурах не превышало 14 %. В то же время при культивировании фибробластов в первичных культурах число погибших клеток в эти же сроки могло достигать 15 %.

Результаты проведенного исследования состояния культур фибробластов в присутствии металлических (титановых и танталовых) образцов

Таблица 2

Количество клеток в культурах с вытяжкой из образцов с разным покрытием ( $n = 7$ )

Серии опытов	3-и сутки		5-е сутки	
	Общее количество клеток	Погибшие клетки (абс. и отн. кол-во)	Общее количество клеток	Погибшие клетки (абс. и отн. кол-во)
Контроль — культура фибробластов	$2,45 \times 10^4 + 1,74 \times 10^3$	$1,49 \times 10^3 + 1,82 \times 10^2$ 6 %	$3,86 \times 10^4 + 2,08 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$3,28 \times 10^3 + 1,5 \times 10^2$ 8 %
Опыт — культура + образец № 5	$2,18 \times 10^4 + 2,84 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$2,33 \times 10^3 + 1,67 \times 10^2$ 10 %	$3,45 \times 10^4 + 2,89 \times 10^3$ $p < 0,05; p_1 > 0,05$	$5,17 \times 10^3 + 3,06 \times 10^2$ 14 %
Опыт — культура + образец № 15	$2,61 \times 10^4 + 2,17 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,54 \times 10^3 + 1,74 \times 10^2$ 5,0 %	$3,89 \times 10^4 + 3,46 \times 10^3$ $p < 0,05; p_1 > 0,05$	$4,08 \times 10^3 + 3,72 \times 10^2$ 10 %
Опыт — культура + образец № 16	$2,72 \times 10^4 + 2,5 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,98 \times 10^3 + 2,32 \times 10^2$ 7,0 %	$3,83 \times 10^4 + 2,13 \times 10^3$ $p < 0,05; p_1 > 0,05$	$3,18 \times 10^3 + 1,91 \times 10^2$ 8 %
Опыт — культура + образец № 8	$2,57 \times 10^4 + 1,19 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,62 \times 10^3 + 1,36 \times 10^2$	$3,86 \times 10^4 + 2,36 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$3,09 \times 10^3 + 2,28 \times 10^2$
Опыт — культура + образец № 2	$2,21 \times 10^4 + 1,61 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$2,74 \times 10^3 + 1,59 \times 10^2$ 6 %	$3,46 \times 10^4 + 2,58 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$4,5 \times 10^3 + 2,79 \times 10^2$ 13 %
Опыт — культура + образец № 6	$2,51 \times 10^4 + 2,31 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,67 \times 10^3 + 1,77 \times 10^2$ 6,0 %	$4,09 \times 10^4 + 1,84 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$3,12 \times 10^3 + 2,13 \times 10^2$ 7 %
Опыт — культура + образец № 4	$2,14 \times 10^4 + 2,01 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,91 \times 10^3 + 1,5 \times 10^2$ 8,0 %	$3,46 \times 10^4 + 1,39 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$4,43 \times 10^3 + 3,32 \times 10^2$ 12 %
Опыт — культура + образец № 9	$2,26 \times 10^4 + 2,02 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,72 \times 10^3 + 1,53 \times 10^2$ 7,0 %	$3,53 \times 10^4 + 1,48 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$4,06 \times 10^3 + 3,86 \times 10^2$ 11 %
Опыт — культура + образец № 12	$2,63 \times 10^4 + 1,93 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,45 \times 10^3 + 1,47 \times 10^2$ 5,0 %	$3,91 \times 10^4 + 1,74 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$3,13 \times 10^3 + 3,06 \times 10^2$ 8 %
Опыт — культура + образец № 3	$2,23 \times 10^4 + 1,84 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,76 \times 10^3 + 1,49 \times 10^2$ 7 %	$3,61 \times 10^4 + 2,25 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$4,01 \times 10^3 + 3,46 \times 10^2$ 11 %
Опыт — культура + образец № 7	$2,51 \times 10^4 + 1,93 \times 10^3$ $p_1 > 0,05$	$1,51 \times 10^3 + 1,88 \times 10^2$ 6 %	$3,79 \times 10^4 + 2,28 \times 10^3$ $p < 0,01; p_1 > 0,05$	$3,11 \times 10^3 + 1,67 \times 10^2$ 8 %

с разным покрытием (оксид титана, корундовая керамика, оксид тантала) и вытяжки из образцов свидетельствуют о том, что опытные образцы не оказывают цитотоксического действия на структурную организацию культивированных на протяжении 5 суток фибробластов, их рост и проли-

феративную активность, а также являются биосовместимыми.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ООО «Инмайстерс» за сотрудничество и техническую помощь в проведении данного исследования.

## Литература

1.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate cement: «in vitro» cytotoxicity / L. A. dos Santos, R. G. Carrdeguas, S. O. Rogero et al. // *Biomaterials*.— 2002.— Vol. 23.— P. 2035–2042.
2. Guenther K., Scharf H.P., Puhl W. Cytotoxicity testing in cell culture of bone substitute materials and ceramics // *J. Bone Joint Surg.*— 1993.— Vol. 75-B (Suppl. II).— P. 106.
3. Evaluation of the TiMo12Zr6Fe2 alloy for orthopaedic implants: in vitro biocompatibility study by using primary human fibroblasts and osteoblasts / L. Trentani, F. Pelillo, F. C. Pavesi et al. // *Biomaterials*.— 2002.— Vol. 23.— P. 2863–2869.
4. Влияние трипсина, иммобилизованного на полиуретановых подложках, на рост фибробластов крысы в культуре тканей / Г. А. Пхакадзе, Н. А. Галатенко, Т. Э. Липатова и др. // *Укр. биохим. журн.*— 1979.— Т. 51.— № 4.— С. 355–562.
5. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // Council of Europe.— Strasbourg, 1986.— № 123.— 52 p.
6. Методические рекомендации по получению, культивированию и использованию в научных и производственных лабораториях первичных, перевиваемых и диплоидных культур животного происхождения.— М., 1981.— 27 с.
7. Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы.— М.: Мир, 1989.— 323 с.

Поступила 05.07. 2006