УДК 576.535:616-003.93 **DOI: 10.21626/vestnik/2024-2/06** **EDN: OPABPV**

СПОСОБ ЗАПОЛНЕНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ 3D КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА КОЛОНИЯМИ ДЕРМАЛЬНЫХ АУТОФИБРОБЛАСТОВ

© Лазаренко В.А., Липатов В.А., Мишина Е.С., Денисов А.А., Бобровская Е.А.

Курский государственный медицинский университет (КГМУ)
Россия, 305041, Курская область, г. Курск, ул. К. Маркса, д. 3

В данной работе представлена разработанная нами методика трехмерного культивирования выделенных из дермы 20-дневных эмбрионов крысы линии Wistar, фибробластов, заполнения ими матрицы, полученной из рыбьего коллагена методом сублимационной сушки. Способ подходит для создания скаффолдов в регенераторной медицине, экспериментальных моделей с приближенными условиями для последующего их изучения для конфокальной, электронной микроскопии, имплантации тканеинженерной конструкции экспериментальным животным.

Цель – разработка усовершенствованного способа колонизации коллагеновых 3D-матриц культурой дермальных аутофибробластов.

Материалы и методы. 3D-коллагеновая матрица-носитель; экспериментальные животные (крысы линии Вистар), в качестве источника фибробластов использовалась кожа 18-20-дневных эмбрионов, из которой они выделялись методом трипсинизации на холоде, с последующим культивированием при стандартных условиях: 5%, CO_2, 37℃, абсолютная влажность, ростовая среда (DMEM, антибиотики (1%, стрептомицин-пенициллин), глутамин и фетальная телячья сыворотка). Процесс колонизации матрикса культурами клеток состоял из 4 последовательных этапов. Контроль эффективности заполнения осуществляли при помощи электронной микроскопии.

Результаты. В результате предложенного метода стерильную коллагеновую 3D-матрицу заполняли предварительно выделенными клетками дермальных аутофибробластов в количестве 5×10^6 клеток/мл. По результатам сканирующей электронной микроскопии было показано, что межволоконные пространства заполнены живыми клетками фибробластами, единичные из которых находятся на стадии деления.

Заключение. Разработанный нами метод позволил достичь эффективного заселения и адгезии фибробластов к матрице и избежать формирования клеточных конгломератов, улучшил контакт с поверхностью и последующую выживаемость внесенной клеточной культуры. Позволил увеличить скорость получения культуры клеток донора и сократить сроки пробоподготовки перед имплантацией. Метод также позволяет создавать 3D-системы на основе других типов клеток, что открывает большие возможности в реконструктивной хирургии.

Ключевые слова: 3D-коллагеновая матрица; скаффолды; дермальные аутофибробласты; регенеративная медицина; клеточное культивирование.

Лазаренко Виктор Анатольевич – д-р мед. наук, профессор, ректор, зав. кафедрой хирургических болезней института непрерывного образования (ИНО), КГМУ, г. Курск. ORCID iD: 0000-0001-5258-5475. E-mail: kurskmed@mail.ru

Липатов Вячеслав Александрович – д-р мед. наук, профессор, проректор по научной работе и инновационному развитию, профессор кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии, зав. лабораторией экспериментальной хирургии и онкологии НИИ экспериментальной медицины, КГМУ, г. Курск. ORCID iD: 0000-0001-6121-7412. E-mail: drli@yandex.ru

Мишина Екатерина Сергеевна – канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, зав. лабораторией морфологии и клеточных технологий НИИ экспериментальной медицины, КГМУ, г. Курск. ORCID iD: 0000-0003-3835-0594. E-mail: mishinaes@kursksmu.net

Денисов Артём Александрович – ассистент кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии, мл. науч. с. НИИ экспериментальной медицины КГМУ, г. Курск. ORCID iD: 0000-0001-5034-8580. E-mail: denisovaa@kursksmu.net (автор, ответственный за переписку).

Бобровская Елена Анатольевна – д-р мед. наук, профессор кафедры хирургических болезней института непрерывного образования (ИНО), КГМУ, г. Курск. ORCID iD: 0000-0003-3898-5522. E-mail: bobrovskajaea@kursksmu.net

Актуальным вопросом современной медицины и хирургии, в частности, по-прежнему остается разработка эффективных подходов к лечению пациентов с длительно незаживающими ранами органов серозных полостей организма после оперативного вмешательства, пролежневыми дефектами, трофическими язвами различной этиологии, обширными ожогами кожи. Отдельными проблемами являются укрытие культи резецированного органа, а также восстановление структуры полых анатомических образований (холедоха, сосудов, Вирсунгова протока и др.) [1-3].

По мнению некоторых авторов, недостаточность традиционных методов лечения часто может быть вызвана локальным патологическим гомеостазом, который обеспечивается собственными потенциальными регенеративными клетками человеческого организма для закрытия раневого дефекта [4]. Одним из альтернативных и перспективных компонентов комплексного лечения этой категории пациентов, по-видимому, является местное применение клеточных технологий для стимуляции репаративной регенерации [5].

Наиболее перспективным представляется разработка и применение полимерных 3D-матриц, полученных методом лиофилизации.

В качестве культивируемых клеток, как правило, используют линии дермальных фибробластов, выделенных с помощью ферментативной дезагрегации ткани. Фибробласты – универсальная биологическая модель для изучения процессов роста, пролиферации клеток и их метаболизма [3, 6, 7].

Современная клеточная инженерия и клеточная трансплантология нуждаются в продуктивных, относительно быстрых и простых методах культивирования клеток для их дальнейшей успешной имплантации в живой организм с целью регенерации поврежденных тканей и органов и восстановления утраченных ими функций. Разработка данной методики позволяет в условиях in vitro повысить качество и ускорить процесс получения тканеинженерной конструкции [8].

Разработка новых эффективных алгоритмов культивирования клеток в трехмерных системах, используемых для конструирования сосудистой, хрящевой, соединительной и других типов тканей, в последнее время стала широко распространенной в связи с высокой частотой встречаемости патологий, уровнем летальности и инвалидизации, к которым они приводят, а также необходимостью хирургического лечения. Трехмерная (3D) модель культивирования – важное звено между in vivo и in vitro за счет способности имитировать естественную сложную клеточную систему тканей различных органов [4, 9, 10].

Цель исследования: разработать усовершенствованный метод заполнения полимерных 3D-матриц культурой дермальных аутофибробластов для последующего применения на моделях травматических повреждений брюшины, а также полых органов брюшной полости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Коллагеновая матрица-носитель; экспериментальные животные (крысы линии Вистар); в качестве источника фибробластов использовалась кожа 18-20-дневных эмбрионов, из которой они выделялись методом трипсинизации на холоде, культивировали при стандартных условиях: 5%, CO2, 37°C, абсолютная влажность; ростовая среда: DMEM, антибиотики (1%, стрептомицин-пенициллин), глутамин и фетальная телячья сыворотка; 3D-матрица на основе коллагена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Стерильные коллагеновые губки в асептических условиях заливали 95% этиловым спиртом (100 г спирта на 1 г материала) для растворения и последующего удаления органических растворителей. Выдерживали в течение 3 часов при постоянном помешивании на орбитальной мешалке. Далее проливали губки избытком PBS, проверяя pH буфера на pH-метре. Отмывку проводили до достижения pH 7,2-7,4 раствора.

Для подготовки заполнения 3D конструкции первым этапом снимали монослой фибробластов с культурального флакона. Для этого сливали среду, в которой культивировались клетки, и заливали их раствором «Версен» (~3ml на 25 см^2) для связывания ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}, инкубировали при 37°C в течение 5 мин. По истечении этого времени в флакон добавляли раствор «Трипсин, 0,25%» (~3ml на 25 см^2) для полноценного открепления от поверхности культуральной посуды. Флакон помещали в инкубатор при 37°C на 30 минут, периодически аккуратно покачивая. Процесс открепления проводили под контролем световой микроскопии.

Вторым этапом, когда клетки полностью отделились от субстрата, вынимали флаконы из инкубатора и открепившиеся фибробласты в растворе «Трипсин+Версен» переносили в центрифужные пробирки 15 мл. Центрифугировали 5 мин., 300 g. (рис. 1, 2).

Третьим этапом после центрифугирования удаляли супернатант, и ресуспендировали осадок в 1 мл полной среды для культивирования. Оценивали жизнеспособность и количество клеток методом вытеснения красителя 0,4% трипанового синего. Определяли количество клеток на электронном счетчике Countess 3 Automated Cell Counter. Разводили суспензию клеток до 5×10^6 клеток/мл (рис. 3).

Четвертым этапом отмытые коллагеновые губки помещали в пластиковые чашки Петри и заполняли средой до полного покрытия средой губки. Вносили суспензию из фибробластов в объеме 5 мл по капле на всю поверхность 3D-матрицы (рис. 4).

Флаконы помещали в инкубатор на 24 часа для осаждения, прикрепления и последующего прорастания клеток в скаффолд. По истечении 24 часов оценивали степень заполнения и прорастания скаффолда культурой клеток.

При проведении сканирующей электронной микроскопии было показано, что межволоконные пространства заполнены отростчатыми клетками с округлым ядром. Клетки практически равномерно заполняют коллагеновую матрицу, многие из них распластаны и плотно

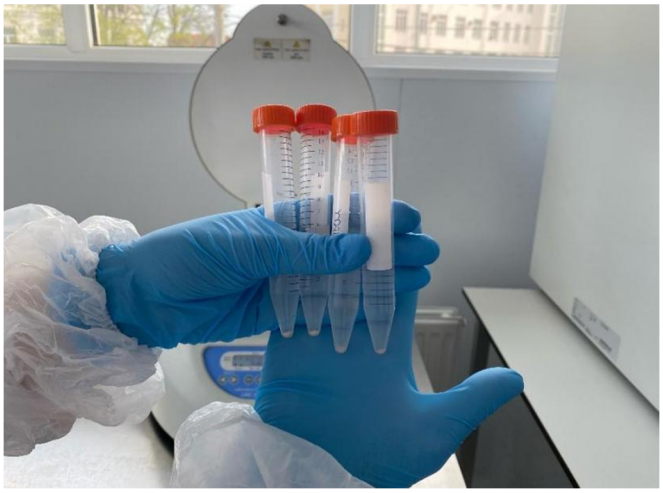

Рис. 1. Второй этап: перенос открепившихся фибробластов в центрифужные пробирки.

Fig. 1. Second stage: transfer of detached fibroblasts into centrifuge tubes.

Рис. 2. После центрифугирования: на дне пробирок осадок из фибробластов.

Fig. 2 After centrifugation: fibroblast sediment at the bottom of the test tubes.

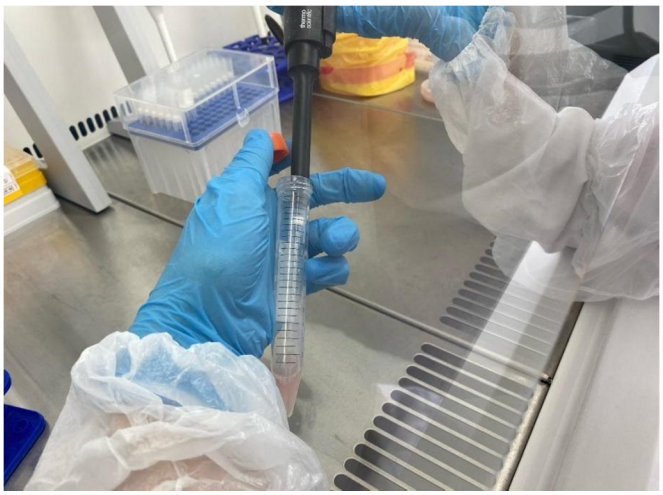

Рис. 3. Ресуспендирование осадка после центрифугирования.

Fig. 3. Resuspension of sediment after centrifugation.

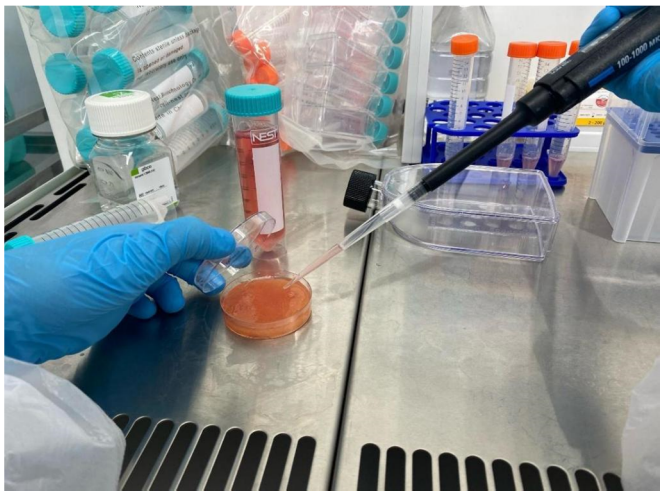

Рис. 4. Внесение культуры клеток в 3D-матрицу.

Fig. 4. Introduction of cell culture into a 3D matrix.

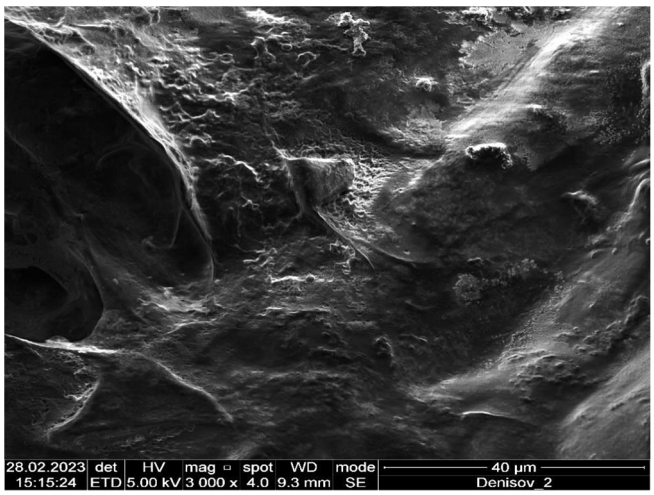

Рис. 5. Прикрепленные фибробласты после заселения в коллагеновую матрицу. Первые сутки инкубации.

Fig. 5. Attached fibroblasts after colonization into a collagen matrix. First day of incubation.

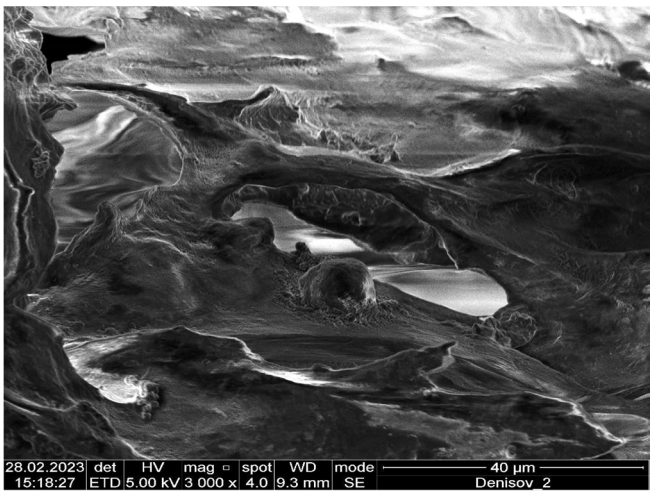

Рис. 6. Прикрепленные фибробласты после заселения в коллагеновую матрицу. Вторые сутки инкубации.

Fig. 6. Attached fibroblasts after colonization into a collagen matrix. Second day of incubation.

прилегают к коллагеновым волокнам матрицы (рис. 5). Интересно отметить, что единичные клетки находятся в стадии деления и образуют симпласты друг с другом (рис. 6).

Основная цель – поиск и разработка усовершенствованного метода заселения коллагеновых 3D-матриц. В работе в качестве клеточного компонента трехмерной системы культивирования использовалась первичная культура фибробластов, полученных из эмбрионов крысы.

Методика, используемая в литературных источниках [4, 7, 8], основана на нанесении суспензии клеток в объеме культуральной среды (20-40 мкл) на поверхность 3D-матрицы. Дальше их выдерживают примерно 6 часов в стандартных условиях, чтобы клетки прочно прикрепились, и доливают среду до необходимого объема.

Разработанный нами метод позволил достичь эффективного заселения и адгезии фибробластов к матрице и избежать формирования клеточных конгломератов, улучшил контакт с поверхностью и последующую выживаемость внесенной клеточной культуры. Позволил увеличить скорость получения культуры клеток донора и уменьшить сроки проведения имплантации. Данная методика также позволяет создавать 3D-системы на основе других типов клеток, осуществлять контроль степени адгезии, жизнеспособности клеток посредством электронной, световой микроскопии. Использовать полученные тканеинженерные конструкции для моделирования патологических процессов и тестирования фармакологических субстанций, а также развивать предложенный нами метод культивирования, реализуя задачу восстановления архитектуры повреждений эпителиальной ткани in vivo.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (Разработка новых биополимерных медицинских изделий для замещения дефектов внутренних органов, No 1023022200045–7–3.2.11).

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование выполнено под контролем регионального Этического комитета при ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 15.12.2022 г.) в соответствии с российскими и международными нормативными актами: приказ Минздрава РФ от 01.04.2016 N 199Н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики»; - ГОСТ 31891-2012 «Применение Принципов GLP к исследованиям in vitro» – ГОСТ 33215-2014 от 07.01.2016 г. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур»; – ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами»; «Руководство по содержанию и использованию животных для экспериментов и в научных целях». FELASA, 2007 г. – Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях (соответствует требованиям Европейской экономической зоны).

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРОВ

Лазаренко В.А., Липатов В.А. – разработка концепции и дизайна; Мишина Е.С., Бобровская Е.А. – анализ и интерпретация данных; Денисов А.А. – сбор данных, анализ и интерпретация данных, написание текста, редактирование.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кунеев И.К., Иванова Ю.С., Нащекина Ю.А. Разработка метода трехмерного культивирования мезенхимных стволовых (стромальных) клеток человека с использованием матрицы из целлюлозы. *Цитология.* 2023;65(2):170–180 [Kuneyev I.K., Ivanova Yu.S., Nashchekina Yu.A. Development of a method for three-dimensional cultivation of human mesenchymal stem (stromal) cells using a cellulose matrix. *Tsitologiya.* 2023;65(2):170–180 (in Russ.)]. DOI: 10.31857/S0041377123020037. EDN: LWOREJ.
2. Копелев П.В., Нащекина Ю.А., Александрова С.А. Оценка жизнеспособности хондроцитов кролика при культивировании на полилактидных скаффолдах, предназначенных для тканевой инженерии хрящевой ткани. *Бюллетень инновационных технологий.* 2017;1(2):31–35 [Kopelev P.V., Nashchokina Yu.A., Alexandrova S.A. Assessment of the viability of rabbit chondrocytes during cultivation on polylactide scaffolds intended for tissue engineering of cartilage tissue. *Bulletin of innovative technologies.* 2017;1(2):31–35 (in Russ.)]. EDN: YPLYWN.
3. Петерсен Е.В., Чудакова Д.А., Скорова Е.Ю., Решетов И.В. Практическое применение биотехнологий трехмерного клеточного культивирования в онкологии и персонализированной терапии. *Биотехнология.* 2020;36(3):3–15 [Petersen E.V., Chudakova D.A., Skokova E.Yu., Reshetov I.V. Practical application of biotechnologies of three-dimensional cell cultivation in oncology and personalized therapy. *Биотехнология.* 2020;36(3):3–15 (in Russ.)]. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-3-15. EDN: WLZKJC.
4. Волкова И.М., Коровина Д.Г. Трёхмерные матриксы природного и синтетического происхождения для клеточной биотехнологии. *Биотехнология.* 2015;31(2):8–26 [Volkova I.M., Korovina D.G. Three-dimensional matrices of natural and synthetic origin for cellular biotechnology. *Biotekhnologiya.* 2015;31(2):8-26 (in Russ.)]. EDN: TZQMTD.

5. Домнина А.П., Новикова П.В., Фридлянская И.И., Шилина М.А., Зенин В.В. Никольский Н.Н. Индукция децидуальной дифференцировки в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках. *Цитология.* 2015;57(12):880–884 [Domnina A.P., Novikova P.V., Fridlyanskaya I.I., Shilina M.A., Zenin V.V. Nikolsky N.N. Induction of decidual differentiation in endometrial mesenchymal stem cells. *Tsitologiya.* 2015;57(12):880–884 (in Russ.)]. EDN: VCOJDF.
6. Ширяева А.И., Косякова К.Г., Сидоров С.П., Фатеев И.В., Кузьмин А.А. Клеточные культуры как перспективная биологическая модель в токсикологических исследованиях. *Medline.ru. Российский биомедицинский журнал.* 2019;20(16):176–182 [Shiryaeva A.I., Kosyakova K.G., Sidorov S.P., Fateev I.V., Kuzmin A.A. Cell cultures as a promising biological model in toxicological studies. *Medline.ru. Rossiyskiy biomeditsinskiy zhurnal.* 2019;20(16):176–182 (in Russ.)]. EDN: XCGNQX.
7. Денисов А., Пашкевич С. Трехмерное культивирование клеток и биопринтинг. *Наука и инновации.* 2023;11(249):27–31 [Denisov A., Pashkevich S. Three-dimensional cell culture and bioprinting. *Nauka i innovatsii.* 2023;11(249):27–31 (in Russ.)]. DOI: 10.29235/1818-9857-2023-11-27-31. EDN: CJCZCP.
8. Yatsenko A.A., Ustinov E.M., Leonov D.V., Kislitskiy V.M., Tseluyko S.S., Kushnarev V.A., Artemieva A.S. Cultivation of melanoma cells in vitro on a 3D scaffold prepared on the basis of gelatin. *Cell and Tissue Biology.* 2020;14(6):474-480. DOI: 10.1134/S1990519X20060097. EDN: KFKKEX.
9. Надеждин С.В., Бурда Ю.Е., Зубарева Е.В. Пролиферативная активность мезенхимальных стволовых клеток при заселении трехмерной титановой матрицы. *Гены и Клетки.* 2017;12(3):174 [Nadezhdin S.V., Burda Yu.E., Zubareva E.V. Proliferative activity of mesenchymal stem cells during colonization of a three-dimensional titanium matrix. *Genes & cells.* 2017;12(3):174 (in Russ.)]. EDN: YZLCNV.
10. Никольский В.И., Сергацкий К.И., Шеремет Д.П., Шабров А.В. Скаффолд-технологии в восстановительной медицине: история проблемы, современное состояние и перспективы применения. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова.* 2022;(11): 36–40 [Nikolsky V.I., Sergatsky K.I., Sheremet D.P., Shabrov A.V. Scaffold technologies in restorative medicine: the history of the problem, current state and prospects of application. *Pirogov Russian journal of surgery.* 2022;(11):36-40. (in Russ.)]. DOI: 10.17116/hirurgia202211136. EDN: KFGCHV.

Поступила в редакцию 20.09.2024
Подписана в печать 25.11.2024

Для цитирования: Лазаренко В.А., Липатов В.А., Мишина Е.С., Денисов А.А., Бобровская Е.А. Способ заполнения полимерных 3D конструкций на основе коллагена колониями дермальных аутофибробластов. *Человек и его здоровье.* 2024;27(3):59–64. DOI: 10.21626/vestnik/2024-3/06. EDN: OPABPV.

METHOD OF FILLING POLYMER 3D CONSTRUCTIONS BASED ON COLLAGEN WITH DERMAL AUTOFIBROBLASTS COLONIES

© *Lazarenko V.A., Lipatov V.A., Mishina E.S., Denisov A.A., Bobrovskaya E.A.*

Kursk State Medical University (KSMU)
3, K. Marx Str., Kursk, Kursk region, 305041, Russian Federation

This paper presents a technique developed by us for three-dimensional cultivation of fibroblasts isolated from the dermis of 20-day-old rat embryos of the Vistar line, filling with them a matrix obtained from fish collagen by freeze drying. The method is suitable for creating scaffolds in regenerative medicine, experimental models with approximate conditions for their subsequent study for confocal, electron microscopy, implantation of tissue engineering structures in experimental animals.

Objective – to develop an improved method for colonizing collagen 3D matrices with a culture of dermal autofibroblasts.

Materials and methods. 3D collagen matrix carrier; experimental animals (Wistar rats), the skin of 18-20 day old embryos was used as a source of fibroblasts, from which they were isolated by trypsinization in the cold, followed by cultivation under standard conditions: 5%, CO_2, 37°C, absolute humidity, growth medium (DMEM, antibiotics (1%, streptomycin-penicillin), glutamine and fetal calf serum). The process of colonization of the matrix by cell cultures consisted of 4 consecutive stages. The filling efficiency was monitored using electron microscopy.

Results. As a result of the proposed method, a sterile 3D collagen matrix was filled with pre-isolated dermal autofibroblast cells in the amount of 5×10^6 cells/ml. According to the results of scanning electron microscopy, it was shown that
the inter-fiber spaces are filled with living fibroblast cells, some of which are at the stage of division.

Conclusion. The method developed by us made it possible to achieve effective colonization and adhesion of fibroblasts to the matrix and avoid the formation of cell conglomerates, improves contact with the surface and subsequent survival of the introduced cell culture. It allows to increase the rate of obtaining a donor cell culture and reduce the time of sample preparation before implantation. It also allows you to create 3D systems based on other cell types, which opens up great opportunities in reconstructive surgery.

Keywords: three-dimensional collagen matrix; scaffolds; dermal autofibroblasts; regenerative medicine; cell culture.

Lazarenko Victor A. – Dr. Sci. (Med.), Professor, Rector, Head of the Department of Surgery Diseases of the Institute of Continuing Education (ICE), KSMU, Kursk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-5258-5475. E-mail: kurskmed@mail.ru

Lipatov Vyacheslav A. – Dr. Sci. (Med.), Professor, Vice-Rector for Research and Innovative Development, Professor at the Department of Operative surgery and topographic anatomy, Head of the Laboratory of Experimental surgery and oncology, Research Institute
of Experimental medicine, KSMU, Kursk, Russian Federation. ORCID iD: 0000–0001–6121–7412. E-mail: drli@yandex.ru

Mishina Ekaterina S. – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Associate Professor at the Department of Histology, Cytology, Embriology, Head of the Laboratory of Morphology and cellular technologies, Research Institute of Experimental medicine, KSMU, Kursk, Russian Federation. ORCID iD: 0000–0003–3835–0594. E-mail: mishinaes@kursksmu.net

Denisov Artem A. – Assistant of the Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Junior researcher at Research Institute of Experimental medicine, KSMU, Kursk, Russian Federation. ORCID iD: 0000–0001–5034–8580. E-mail: denisovaa@kursksmu.net (corresponding author)

Bobrovskaya Elena A. – Dr. Sci. (Med.), Professor at the Department of Surgery Diseases of the Institute of Continuing Education (ICE), KSMU, Kursk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0003-3898-5522. E-mail: bobrovskajaea@kursksmu.net

CONFLICT OF INTEREST

The author declares the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The study was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation (Development of new biopolymer medical products for replacing defects of internal organs, No. 1023022200045–7–3.2.11).

COMPLIANCE WITH PRICIPLES OF ETHICS

The study was carried out under the supervision of the Regional Ethics Committee at the Federal State Budgetary Educational Institution of the Russian Ministry of Health (Protocol No. 4 dated 12/15/2022) in accordance with Russian and international regulations: order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated 04/01/2016 N 199N "On approval of the rules of good laboratory practice"; - GOST 31891-2012 "Application of GLP Principles to in vitro research" - GOST 33215-2014 dated 07.01.2016. "Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for the equipment of premises and organization of procedures"; - GOST 33216-2014 "Rules for working with laboratory rodents and rabbits"; Guidelines for the maintenance and use of animals for experiments and scientific purposes. FELASA, 2007 - Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union of September 22, 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Complies with the requirements of the European Economic Area).

AUTHORS CONTRIBUTION

Lazarenko V.A., Lipatov V.A. – concept and design development; Mishina E.S., Bobrovskaya E.A. – data analysis and interpretation; De-nisov A.A. – data collection; data analysis and interpretation, text writing and editing.

Received 20.09.2024
Accepted 25.11.2024

For citation: Lazarenko V.A., Lipatov V.A., Mishina E.S., Denisov A.A., Bobrovskaya E.A. Method of filling polymer 3D constructions based on collagen with dermal autofibroblasts colonies. *Humans and their health.* 2024;27(2):59–64. DOI: 10.21626/vestnik/2024-2/06. EDN: OPABPV.