

# Выбор условий заселения полимерных макропористых губок стромальными клетками костного мозга человека

Ю. А. Петренко, Н. А. Волкова, Е. П. Жуликова, Л. Г. Дамшкалн<sup>1</sup>,  
В. И. Лозинский<sup>1</sup>, А. Ю. Петренко<sup>1</sup>

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины  
Ул. Переяславская, 23, Харьков, 61015, Украина

<sup>1</sup>Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН  
Ул. Вавилова, 28, Москва, 119991, Российская Федерация

yuripetrenko@cryo.org.ua

---

*Исследовали различные условия заселения полимерных губок на основе макропористого агарозного криогеля (МАКГ) стромальными клетками костного мозга человека. Использовали три варианта введения клеток в МАКГ: совместную инкубацию при постоянном перемешивании, интенсивное встряхивание и создание отрицательного давления. Результаты работы свидетельствуют о перспективности использования макропористых губок на основе криогеля агарозы в качестве трехмерного носителя для культивирования стромальных клеток при различных способах заселения клеток.*

*Ключевые слова: тканевая инженерия, стромальные клетки костного мозга, макропористые губки, агарозный криогель, заселение, Alamar Blue.*

---

**Введение.** Тканевая инженерия – молодое направление биотехнологии, базирующееся на принципах биологии, химии, материаловедения и медицины. В исследованиях по данному направлению используется комплекс клеток и биоматериалов различной природы для создания *in vitro* функционирующих тканей для последующей трансплантации. Материалы на основе агарозы – полисахарида, получаемого из морских водорослей – не распадаются в организме млекопитающих из-за отсутствия агаролитических ферментов, что может обеспечить длительное поддержание формы и объема трансплантата, созданного с применением агарозы в качестве носителя соответствующих клеток. Кроме того, агароза не индуцирует ксеногенной иммуно-

логической реакции, а введение клеток в агарозный гель обеспечивает пролиферацию эмбриональных и гемопоэтических стволовых клеток, а также некоторых клеточных линий в культуре [1, 2]. При создании биоинженерной конструкции необходимо, чтобы поры внутри трехмерного носителя были взаимосвязаны (сообщались), имели размеры, оптимальные для инокуляции клеток, и обладали достаточной площадью для их последующего роста. Этим требованиям отвечают макропористые криогели на основе агарозы [3].

Полимерные криогели – это высокопористые гелевые материалы, которые формируются в неглубоко замороженной среде, при этом образующиеся поликристаллы растворителя выполняют функцию порога (порообразователя), а собственно гелевая матрица возникает в остающихся жидкими областях системы – так называемой жидкой микрофазе

[4]. Поэтому характерной морфологической особенностью криогелей является их макропористость, а поскольку рост каждого кристалла замерзающего растворителя происходит вплоть до тесного контакта с гранью другого кристалла, то после оттаивания системы макропоры у сформированного гелевого материала взаимосвязаны.

В качестве биологического компонента биоинженерных конструкций особое внимание привлекают стволовые клетки, которые можно размножать в недифференцированном состоянии, а затем индуцировать к дифференцировке в заданном направлении. Для разработки биоинженерной конструкции различных видов соединительной ткани оптимальным клеточным материалом являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), способные дифференцироваться в клетки хрящевой, мышечной, костной и жировой тканей [5]. Недавно нами показано [6], что стромальные клетки (СК) костного мозга взрослого человека после монослойного культивирования в селективных средах характеризуются свойствами МСК – клоногенным ростом, мультилинейной дифференцировкой и соответствующим иммунофенотипом. В связи с этим данные клетки выбраны в качестве клеточной составляющей для заселения макропористых губок на основе криогеля агарозы.

Для равномерного распределения клеток и обеспечения их пролиферации в составе трехмерных структур необходимо выбрать адекватный метод заселения носителя. Существуют различные способы введения клеток в губчатый носитель, причем лучших показателей заселения и равномерного распределения клеток в объеме макропористого носителя удавалось добиться вследствие «вакуумного заселения» [7, 8], совместной инкубации клеток и носителя [9] и интенсивного перемешивания (шейкирования) [10, 11]. Вместе с тем, до настоящего времени исследований, посвященных сравнению методов и выбору оптимального пути заселения МСК макропористых губок для создания биоинженерных конструкций соединительной ткани, проведено не было.

Целью данной работы явилось изучение особенностей процессов заселения полимерных губок на основе макропористого агарозного криогеля

стромальными клетками костного мозга человека при различных способах введения клеток.

**Материалы и методы.** *Выделение и культивирование стромальных клеток костного мозга.* Суспензию клеток костного мозга получали вымыванием из биоптатов губчатой ткани гребня подвздошной кости средой M199. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 150 г в течение 10 мин и ресуспендировали в среде Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM), содержащей 15 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, пенициллин (50 ед/мл), стрептомицин (50 мг/мл) и L-глутамин (2 ммоль/мл). Клетки культивировали при  $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %-м  $\text{CO}_2$  и 95 %-й влажности. Замену среды проводили через 72 ч культивирования и далее – каждые 3–4 дня. После достижения 70 % монослойного роста адгезивную фракцию клеток снимали с культурального пластика смешанным раствором трипсин:версен (1:4) и рассеивали в соотношении 1:3 [12]. Исследования одобрены этической комиссией ИПКиК НАН Украины.

*Иммунофенотипические исследования.* Для определения иммунофенотипа клетки 4-го пассажа окрашивали FITC- или PE-конъюгированными моноклональными антителами CD29, CD34, CD44, CD45, CD73 и CD105 и анализировали на проточном цитометре FACS Calibur («BD Biosciences», США). Данные обрабатывали с использованием программы WinMDI и выражали в виде гистограмм.

*Приготовление макропористых подложек для объемного культивирования стромальных клеток костного мозга.* Агарозный криогель получен согласно методу [3] из агарозы с последующей активацией полисахаридной основы дивинилсульфоновым и ковалентным присоединением желатина к поверхности стенок макропор, как описано ранее в работе [13]. Для этого горячий (55 °C) 3 %-й водный раствор агарозы Type VII-A (Low Gelling Temperature, «Sigma», США), быстро подтитрованный до pH 12,6 с помощью 1N раствора NaOH, слоем в 2 мм наливали в металлический (нержавеющая сталь) поддон, который строго горизонтально помещали в камеру прецизионного программируемого криостата FP 45 HP («Julabo», Германия). Обра-

зец замораживали при  $t = -30\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин, затем выдерживали на протяжении 18 ч при  $t = -5\text{ }^{\circ}\text{C}$  и оттаивали при  $t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Полученный агарозный криогель промывали водой до нейтрального значения pH и затем такой губчатый материал нарезали на диски толщиной 2 мм и диаметром 10 мм. Далее диски обрабатывали 100-кратным избытком дивинилсульфона («Aldrich», США) в 1 М растворе  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  при комнатной температуре в течение 20 ч; реагенты отмывали водой и помещали диски в теплый ( $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 2 %-й водный раствор желатина типа А («Sigma», США) на 6 ч, после чего промывали диски большим объемом воды, выдерживали (в течение 2 ч) в 1 М растворе триса и окончательно промывали водой до нейтрального значения pH среды. Количество присоединенного желатина составляло 0,5–0,8 мг белка на 1 г влажного макропористого агарозного криогеля (МАКГ) [13]. Приготовленные таким образом диски хранили в 70 %-м этаноле.

*Заселение МАКГ стромальными клетками костного мозга.* Губчатые диски МАКГ помещали в круглодонные пробирки с ростовой средой и выдерживали при  $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 1 сут. После этого в пробирки с МАКГ вносили СК костного мозга 4-го пассажа до конечной концентрации  $5 \cdot 10^5$  клеток в 1 мл.

Использовали три варианта введения СК костного мозга в губчатые МАКГ:

– вариант 1 – «инкубация» – суспензию СК костного мозга инкубировали в пробирках с МАКГ при комнатной температуре и постоянном перемешивании со скоростью 200 об/мин в течение 3 ч;

– вариант 2 – «интенсивное перемешивание (шейкирование)» – пробирки, содержащие суспензию СК костного мозга и МАКГ, интенсивно встряхивали на вортекс-миксере при 1500 об/мин в течение 1 мин и помещали в термостат при температуре  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  на 3 ч;

– вариант 3 – «вакуумное заселение» – в пробирках с клетками и МАКГ создавали отрицательное давление, отбирая остаточный воздух с помощью шприца, после чего помещали в термостат на 3 ч.

После инкубации, которая в каждом случае составляла 3 ч, МАКГ-диски, содержащие клетки, пе-

реносили в лунки 24-луночного планшета для дальнейшего культивирования, а оставшиеся в пробирках клетки переносили и подсчитывали в камере Горяева. Эффективность введения стромальных клеток костного мозга в трехмерные матрицы МАКГ определяли по разности между количеством клеток в исходной суспензии и их количеством после процедуры введения в МАКГ, отнесенной к исходному количеству клеток.

*Исследование метаболической и пролиферативной активности стромальных клеток костного мозга, культивируемых в объеме МАКГ-дисков.* Метаболическую и пролиферативную активность клеток, культивируемых в объеме МАКГ-дисков, определяли с использованием REDOX-индикатора Alamar Blue (AB). Для этого через 1, 4, 7 сут культивирования в среду вносили 10 % AB. Через 2 ч среду, содержащую AB, забирали и определяли в ней уровень восстановления AB с использованием планшетного спектрофлуориметра Tecan GENios при волне возбуждения 550 нм и эмиссии 590 нм. Данные представляли как разность опытной и холостой (без клеток) проб и выражали в условных единицах флуоресценции (УЕФ).

*Гистологические исследования.* Для выяснения архитектоники МАКГ использовали срезы толщиной 10–50 мкм, полученные в криостате при температуре  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . В некоторых случаях полученные гистологические срезы фиксировали 70 %-м спиртом, окрашивали азур-эозином и исследовали под световым микроскопом.

*Статистический анализ.* Полученные результаты статистически обрабатывали, используя  $t$ -критерий Стьюдента. Данные представляли в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение,  $m$  – стандартная ошибка среднего.

**Результаты и обсуждение.** Клетки костного мозга культивировали в условиях монослоя, как описано в работе [12]. В ходе субкультивирования клеток костного мозга гетерогенность популяции адгезивных клеток снижалась и на 4-м пассаже подавляющее большинство клеток имело фибробластоподобный вид.

После 4-го пассажа СК снимали с культурального пластика и использовали для иммунофенотипического анализа и заселения МАКГ-дисков. Фе-

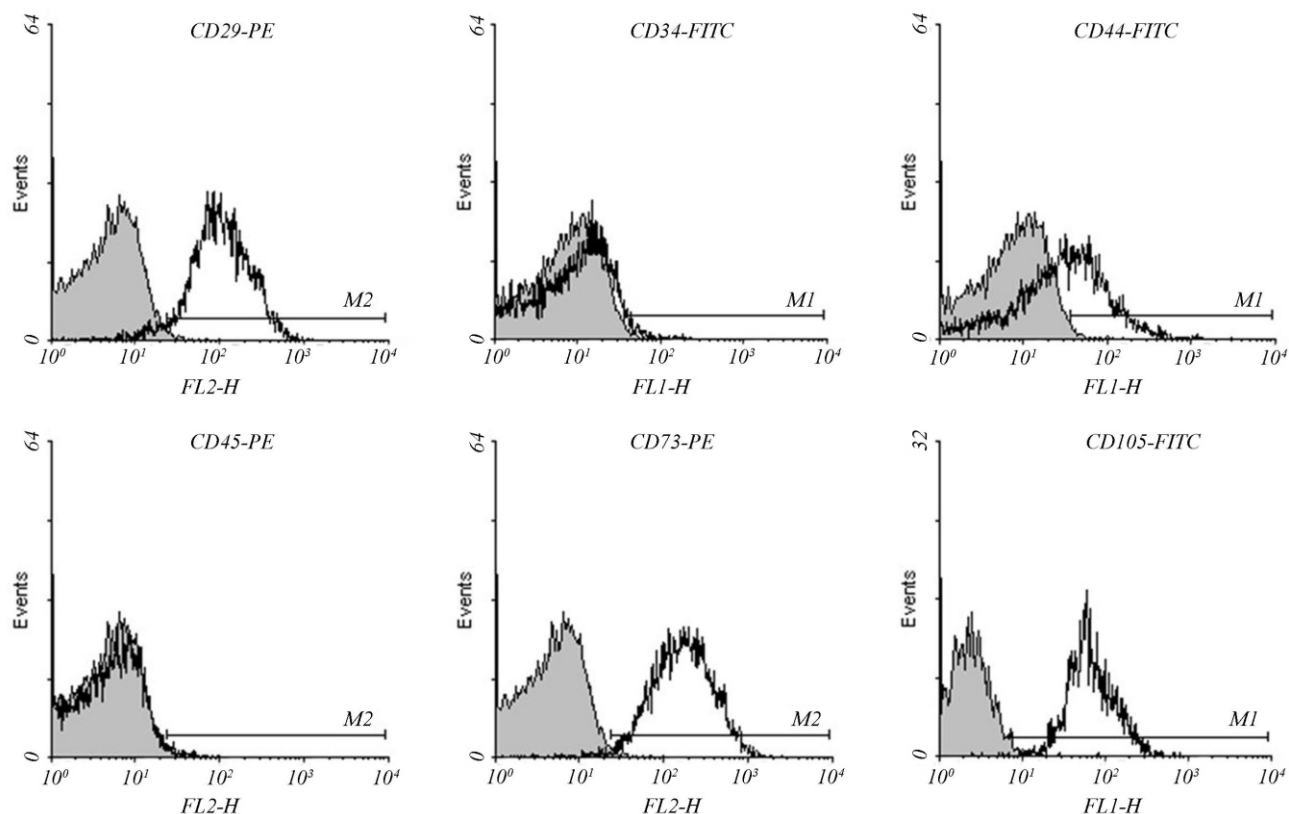


Рис. 1. Иммунофенотип стромальных клеток костного мозга 4-го пассажа

нотипический анализ показал, что стромальные клетки костного мозга человека не экспрессируют гемопоэтических маркеров (CD34 и CD45) и позитивны на CD29, CD44, CD105 и CD73 антигены (рис. 1).

Приведенные выше данные демонстрируют, что СК костного мозга человека, используемые нами для заселения МАКГ-дисков, имеют фенотип, характерный для МСК [5, 14].

При изучении архитектуры дисков МАКГ с помощью серийных гистологических срезов установлено, что данные трехмерные носители обладают разветвленной макропористой структурой с сечением пор от 50 до 250 мкм (рис. 2, см. вклейку).

Такой размер макропор вполне достаточен для проникновения клеток внутрь объема носителя, а также для свободной диффузии субстратов к клеткам и отвода продуктов их жизнедеятельности.

Исследование эффективности введения СК в губчатые МАКГ-диски показало, что при варианте

1 инокуляции клеток в МАКГ попадало  $56 \pm 4\%$  СК костного мозга (рис. 3).

Использование варианта 2 позволило несколько увеличить количество клеток, попавших в МАКГ. Вариант 3 оказался менее эффективным – в среде инкубации оставалось более половины клеток, а эффективность введения клеток в МАКГ составляла  $41 \pm 6\%$ .

Метаболическую и пролиферативную активности стромальных клеток в МАКГ-дисках в ходе культивирования исследовали по степени восстановления редокс-индикатора АВ (рис. 4). Из данных рис. 4 видно, что через одни сутки культивирования уровень восстановленности АВ клетками был наиболее высоким при варианте 2 введения клеток в носитель и составлял  $4094 \pm 255$  УЕФ/лунку. При варианте 1 показатель восстановленности АВ был ниже и равнялся  $3559 \pm 198$  УЕФ/лунку. Наименьший уровень флуоресценции АВ получен при использовании 3-го варианта введения клеток,

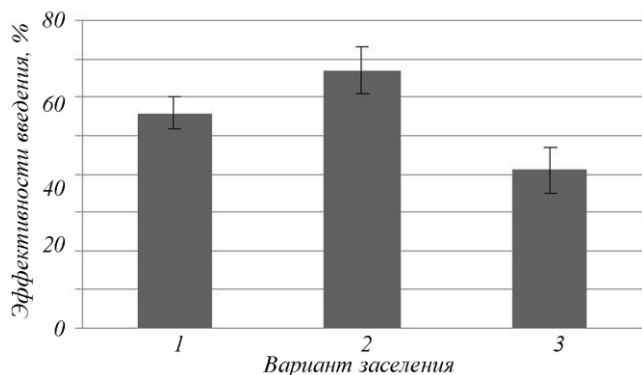


Рис. 3. Эффективность введения стромальных клеток костного мозга в макропористый агарозный криогель (цифры под столбцами соответствуют использованному варианту заселения). Приведенные показатели достоверно отличаются друг от друга ( $p < 0,05$ )

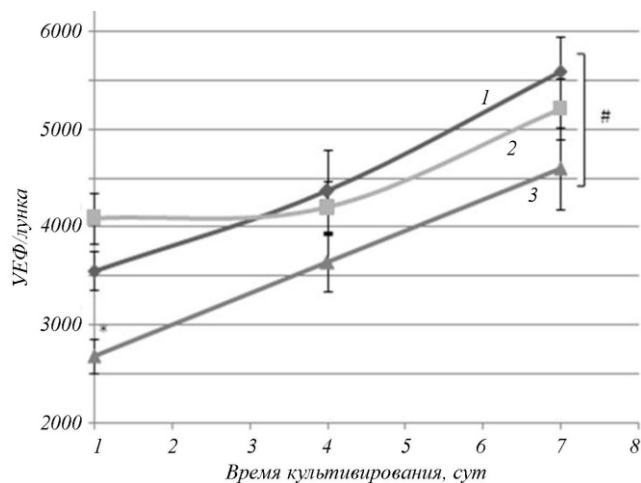


Рис. 4. Влияние способов введения стромальных клеток костного мозга в макропористый агарозный криогель на уровень восстановленности АВ при культивировании (УЕФ/лунку): кривые 1–3 – варианты введения клеток; \* данные достоверно отличаются по отношению к вариантам 1 и 2 ( $p < 0,05$ ); # данные достоверно отличаются по отношению к 1-м суткам культивирования ( $p < 0,05$ )

данный показатель достоверно ( $p < 0,05$ ) отличался от остальных и составлял всего  $2684 \pm 175$  УЕФ на одну лунку.

В ходе культивирования уровень восстановленности АВ увеличивался и на 7-е сутки достоверно не отличался при всех вариантах посева клеток. При этом динамика показателей восстановленности АВ зависела от использованных вариантов введения. При вариантах введения клеток 1 и 3 уровень восстановленности линейно повышался в ходе

культивирования. В то же время при варианте 2 введения клеток в носитель в течение 4 сут культивирования уровень восстановленности АВ оставался неизменным, а при последующем культивировании возрастал. На седьмые сутки, так же как и при других вариантах, уровень восстановленности АВ был достоверно выше значений, полученных на первые сутки.

По истечении 7 сут культивирования диски МАКГ, заселенные СК костного мозга, подвергали гистологической обработке (рис. 5, см. вклейку).

Как оказалось, независимо от способа введения клеток в носитель они заселяли макропористую губку однотипно. Существенных различий в распределении и количестве СК костного мозга внутри МАКГ выявлено не было. Клетки формировали рыхлую, довольно однородную трехмерную сеть, образованную удлинёнными фибробластоподобными клеточными элементами, как правило, контактирующими своими отростками друг с другом.

После выделения и субкультивирования в монослое в течение четырех пассажей СК костного мозга человека имели фенотип мезенхимальных стволовых клеток [5, 14]: экспрессировали антигены CD29, CD44, CD105 и CD73 и были негативны по гемопоэтическим маркерам (CD34 и CD45). Это свойство в сочетании с возможностью индуцированной мультилинейной дифференцировки делает СК привлекательным объектом для тканевой инженерии соединительной ткани – в составе носителя клетки способны пролиферировать, сохраняясь в недифференцированном состоянии, а затем могут быть индуцированы к дифференцировке в клетки кости, хряща, жира и других тканей.

В качестве модели носителя клеток в настоящей работе использовали полимерные губки на основе макропористого агарозного криогеля. Такие носители обладают рядом привлекательных свойств для инженерии соединительных тканей: не разрушаются при введении в организм, имеют крупные сообщающиеся поры, поверхность которых обработана желатином, улучшающим адгезию клеток [15]. Кроме того, МАКГ достаточно прозрачны, что позволяет проводить микроскопическое наблюдение за распределением и состоянием клеток в поверхностных слоях носителя в ходе культивирования.

Ранее макропористые губки на основе криогеля агарозы, использованные в настоящей работе, исследовали в качестве носителя для тканевой инженерии поджелудочной железы [13]. Показана возможность заселения МАКГ островками поджелудочной железы и клетками инсулиномы. При этом в ходе культивирования островки поджелудочной железы сохраняли способность секретировать инсулин, а клетки инсулиномы – пролиферировать. Вместе с тем изолированные островки поджелудочной железы, культивированные в МАКГ, теряли инсулиновый секреторный ответ панкреатических  $\beta$ -клеток на стимуляцию глюкозой. Причиной потери функциональной активности клеток поджелудочной железы может быть неравномерное распределение в объеме МАКГ биологического материала, который вводили непосредственно в носитель инъекцией. Такой способ заселения может вызывать концентрирование клеток в месте инъекции, что приводит к недостаточному их снабжению кислородом и питательными веществами.

В настоящей работе СК костного мозга вводили в диски МАКГ тремя различными способами. Более полное заселение МАКГ достигалось при перемешивании суспензии клеток в присутствии носителя, причем интенсивное перемешивание (вариант 2) обеспечивало максимальное заселение МАКГ. Использование «вакуумного заселения» (вариант 3), предложенного авторами [7], приводило к меньшему поступлению стромальных клеток в МАКГ. С другой стороны, этот вариант позволял в наибольшей степени реализовать пролиферативный потенциал клеток, оцененный в течение срока наблюдения с помощью Alamar Blue. Данный индикатор интегрально отражает активность окислительно-восстановительных ферментов и успешно применялся рядом авторов для определения метаболической и пролиферативной активности различных типов клеток [16, 17]. В работе [13] с помощью АВ теста проведено сравнительное изучение пролиферативной активности клеток инсулиномы при росте в монослое в составе макропористых агарозных губок, использованных в данной работе. Показано, что пролиферативный потенциал клеток в дисках МАКГ выше, чем при монослойном культивировании.

В нашем исследовании уровни восстановленности АВ через сутки культивирования СК костного мозга при различных вариантах введения клеток в носители коррелировали с эффективностью заселения МАКГ. Учитывая, что за первые 24 ч культивирования клетки практически не делятся, следует полагать, что АВ-тест в этом случае отражает метаболическую активность клеток, заселивших МАКГ. Повышение уровня восстановленности АВ в ходе последующего культивирования, очевидно, отражает пролиферативную активность клеток в макропористом носителе. При вариантах заселения 1 и 3 пролиферативная активность СК линейно увеличивалась в течение семи суток культивирования. В случае использования варианта 2, обеспечивающего максимальное заселение МАКГ, уровень восстановленности АВ на четвертые сутки незначительно превышал значения, полученные после первых суток культивирования.

Можно предположить, что при таком варианте введения клетки преимущественно располагались в поверхностных областях носителя. В силу высокой плотности клеток по периферии носителя, возможно, возникал эффект «контактного торможения» пролиферации, характерный для фибробластоподобных клеток. Увеличение степени восстановленности АВ в ходе последующего культивирования до семи суток может быть связано с миграцией клеток в течение первых 4 сут в менее заполненные области МАКГ и последующей за ней пролиферацией. В пользу последнего предположения свидетельствуют данные гистологического исследования, которое не позволило выявить на 7-е сут культивирования существенные различия в распределении клеток в носителе при всех использованных вариантах заселения.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о перспективности использования макропористых губчатых агарозных криогелей в качестве трехмерного носителя стромальных клеток костного мозга для тканевой инженерии соединительной ткани. Совокупность приведенных данных свидетельствует о возможности применения всех исследуемых вариантов засева МАКГ стромальными клетками костного мозга. При любом варианте введения клетки прикреплялись (адгезировали) к

внешней и внутренней поверхности пор, расплывались, пролиферировали и на седьмые сутки культивирования демонстрировали одинаковую способность восстанавливать Alamar Blue.

*Yu. A. Petrenko, N. A. Volkova, E. P. Zhulikova, L. G. Damshkaln, V. I. Lozinsky, A. Yu. Petrenko*

Choice of conditions of human bone marrow stromal cells seeding into polymer macroporous sponges

#### Summary

*Different conditions of seeding human bone marrow stromal cells (SC) into polymer sponges based on macroporous agarose cryogel (MACS) were investigated. Three methods of cell seeding to MACS were used: co-incubation with permanent stirring, intensive shaking and creation of negative pressure. The results obtained show considerable potential of macroporous agarose cryogel sponges as a three-dimensional carrier for cultivating stromal cells at different methods of cell seeding.*

*Keywords: tissue engineering, bone marrow stromal cells, macroporous sponges, agarose cryogel, seeding, Alamar Blue.*

*Ю. О. Петренко, Н. О. Волкова, О. П. Жулікова, Л. Г. Дамшкालн, В. І. Лозинський, О. Ю. Петренко*

Вибір умов заселення полімерних макропористих губок стромальними клітинами кісткового мозку людини

#### Резюме

*Досліджували різні умови заселення полімерних губок на основі макропористого агарозного кріогелю (МАКГ) стромальними клітинами (СК) кісткового мозку людини. Використовували три варіанти введення клітин в МАКГ: сумісну інкубацію при постійному перемішуванні, інтенсивне перемішування, а також створення негативного тиску. Результати роботи свідчать про перспективність застосування макропористих губок на основі кріогелю агарози як тривимірного носія для культивування стромальних клітин при різних способах введення клітин.*

*Ключові слова: тканнна інженерія, стромальні клітини кісткового мозку, макропористі губки, агарозний кріогель, заселення, Alamar Blue.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dang S., Gerecht-Nir S., Chen J., Itskovitz-Eldor J., Zandstra P. Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture // *Stem Cells.*—2004.—**22**.—P. 275–282.
2. Akselband Y., Moen P., Jr., McGrath P. Isolation of rare isotype switch variants in hybridoma cell lines using an agarose gel microdrop-based protein secretion assay // *Assay Drug Develop. Technol.*—2003.—**1**.—P. 619–626.
3. Пат. РФ № 2220987, 2001. Полимерная композиция для получения макропористого агарозного геля и способ его получения / В. И. Лозинский, Л. Г. Дамшкालн, Ф. М. Плиева, И. Ю. Галаев, Б. Маттиассон // БИ № 1, 2004.
4. Лозинский В. И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения // *Успехи химии.*—2002.—**71**, № 6.—С. 559–585.

5. Pittenger M., Mackay A., Beck S., Jaiswal R., Douglas R., Mosca J., Moorman M., Simonetti D., Craig S., Marshak D. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science.*—1999.—**284**.—P. 143–147.
6. Петренко А. Ю., Мазур С. П., Петренко Ю. А., Скоробогатова Н. Г., Горохова Н. А., Волкова Н. А. Выделение и мультилинейная дифференцировка стромальных клеток из тканей плодов и взрослого человека // *Трансплантология.*—2007.—**9**, № 1.—С. 218–220.
7. Stosich M., Mao J. Adipose tissue engineering from human adult stem cells: clinical implications in plastic and reconstructive surgery // *Plast. Reconstr. Surg.*—2007.—**119**.—P. 71–83.
8. Hong L., Peptan I., Clark P., Mao J. Ex vivo adipose tissue engineering by human marrow stromal cell seeded gelatin sponge // *Ann. Biomed. Eng.*—2005.—**33**.—P. 511–517.
9. Wang Y., Kim U., Blasioli D., Kim H., Kaplan D. In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells // *Biomaterials.*—2005.—**26**.—P. 7082–7094.
10. Takahashi Y., Yamamoto M., Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and -tricalcium phosphate // *Biomaterials.*—2005.—**26**.—P. 3587–3596.
11. Choi Y., Park S., Suh H. Adipose tissue engineering using mesenchymal stem cells attached to injectable PLGA spheres // *Biomaterials.*—2005.—**26**.—P. 5855–5863.
12. Лаціник Н. В., Грошева А. Г., Наровлянський А. Н., Павленко Р. Г., Фриденштейн А. Я. Клональная природа колоний фибробластов, образуемых стромальними кісткомозговими клітками в культурах // *Бюл. експерим. біології і медицини.*—1987.—**3**, № 3.—С. 257–284.
13. Bloch K., Lozinsky V. I., Galaev I. Yu., Yavriyantz K., Vorobeychik M., Azarov D., Damshkaln L., Mattiasson B., Vardi P., Vardi P. Functional activity of insulinoma cells (INS-1E) and pancreatic islets cultured in agarose cryogel sponges // *J. Biomed. Mater. Res.*—2005.—**75A**.—P. 802–809.
14. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating K., Prokop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.*—2006.—**8**.—P. 315–317.
15. Lozinsky V. I., Damshkaln L. G., Bloch K. O., Vardi P., Grinberg N. V., Burova T. V., Grinberg V. Y. Cryostructuring of polymer systems. XXIX. Preparation and characterization of supermacroporous (spongy) agarose-based cryogels used as 3D-scaffolds for culturing insulin-producing cell aggregates // *J. Appl. Polym. Sci.*—2008.—**108**.—P. 3046–3062.
16. Petrenko Yu. A., Gorokhova N. A., Tkachova E. N., Petrenko A. Yu. The reduction of Alamar Blue by peripheral blood lymphocytes and isolated mitochondria // *Ukr. Biokhim. Zh.*—2005.—**77**.—P. 100–105.
17. Gloeckner H., Jonuleit T., Lemke H. D. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue // *J. Immunol. Meth.*—2001.—**252**.—P. 131–138.

УДК 611.018.46:57.085.23:577.114.8

Надійшла до редакції 27.02.08

Рисунки до статті Ю. А. Петренка та співавт.

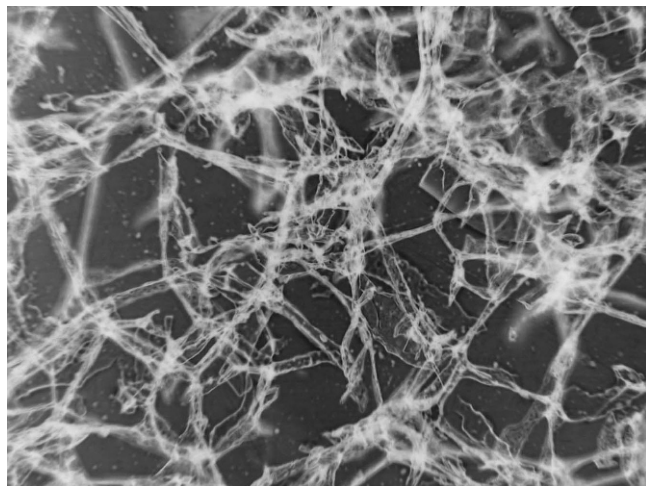


Рис. 2. Структура макропористого агарозного криогеля (ув. 10 10)

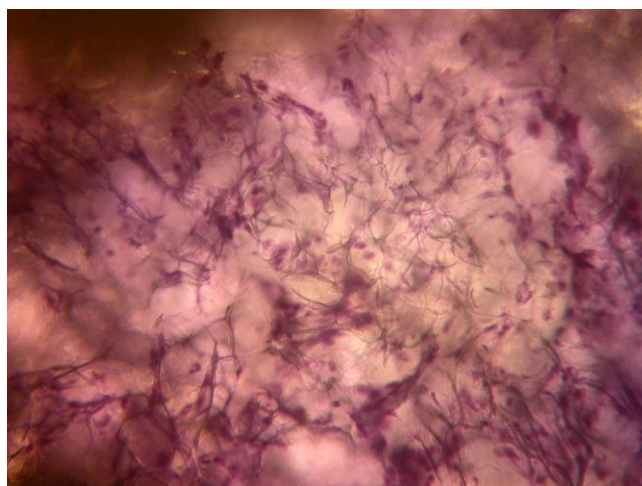


Рис. 5. Гистологический срез диска макропористого агарозного криогеля с заселенными стромальными клетками костного мозга, 7-е сут культивирования (окраска азур-эозином, ув. 4 10)