

УДК 57.043: 576.314.4: 593.4-174.11

В.В. Муценко^{1*}, Е.Ю. Рогульская¹, Ю.А. Петренко¹,
Г. Эрлих², С.П. Мазур¹, Н.А. Волкова¹, А.Ю. Петренко¹

Криочувствительность мезенхимальных стромальных клеток, криоконсервированных в составе носителей на основе скелетов морских губок *lanthella basta*

UDC 57.043: 576.314.4: 593.4-174.11

V.V. Mutsenko^{1*}, O.Yu. Rogulska¹, Yu.A. Petrenko¹,
H. Ehrlich², S.P. Mazur¹, N.A. Volkova¹, A.Yu. Petrenko¹

Cryosensitivity of Mesenchymal Stromal Cells Cryopreserved Within Marine Sponge *lanthella basta* Skeleton-Based Carriers

Реферат: В работе представлены результаты экспериментальных исследований по использованию скелетов морской губки *lanthella basta* в качестве носителей для мезенхимальных стромальных клеток человека (МСК), их биосовместимости с данными клетками, а также оценка чувствительности клеток, растущих в составе этих носителей, к криоконсервированию под защитой 10% ДМСО и 20% фетальной сыворотки крупного рогатого скота по методу, разработанному для суспензии МСК (медленное охлаждение со скоростью 1 град/мин, быстрый отогрев при 37°C). С помощью кислотного-щелочного гидролиза из скелетов морской губки *lanthella basta* были получены сетчатые носители, состоящие из хитиновых фибрилл. В ходе культивирования *in vitro* данные носители обеспечивали адгезию, миграцию и пролиферацию МСК. После криоконсервирования наблюдалось значительное снижение жизнеспособности клеток, при этом их метаболическая активность составляла (46,8 ± 5,8)% по отношению к нативным образцам и не уменьшалась на первые сутки рекультивирования. Из полученных результатов следует, что скелеты морской губки *lanthella basta* представляют собой новый перспективный источник носителей для использования в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Данная работа может послужить основой для дальнейшей разработки методов криоконсервирования стволовых клеток в составе трехмерных тканеинженерных конструкций.

Ключевые слова: хитин, морские губки, адгезивные клетки, суспензия клеток, тканеинженерные конструкции, мезенхимальные стромальные клетки, криоконсервирование.

Реферат: У роботі представлено результати експериментальних досліджень, спрямованих на використання скелетів морської губки *lanthella basta* в якості носіїв для мезенхімальних стромальних клітин людини (МСК), їх біосумісності з цими клітинами, а також оцінка криочутливості клітин, які ростуть у складі цих носіїв, до криоконсервування під захистом 10% ДМСО та 20% фетальної сироватки крупної рогатої худоби за методом, розробленим для суспензії МСК (повільне охолодження зі швидкістю 1 град/хв, швидкий відігрів при 37°C). За допомогою кислотно-лужного гідролізу зі скелетів морської губки *lanthella basta* були отримані сітчасті носії, утворені з хитинових фібрил. У ході культивування *in vitro* ці носії забезпечували адгезію, міграцію та проліферацію МСК. Після криоконсервування спостерігалось значне зниження життєздатності клітин, при цьому їх метаболічна активність складала (46,8 ± 5,8)% по відношенню до нативних зразків та не зменшувалась на першу добу рекультивування. На підставі одержаних результатів встановлено, що скелети морської губки *lanthella basta* є новим перспективним джерелом носіїв для використання в тканинній інженерії та регенеративній медицині. Дана робота може бути основою для подальшої розробки методів криоконсервування стовбурових клітин у складі тривимірних тканинно-інженерних конструкцій.

Ключові слова: хітин, морські губки, адгезивні клітини, суспензія клітин, тканинно-інженерні конструкції, мезенхімальні стромальні клітини, криоконсервування.

Abstract: This paper presents our findings on using skeletons of marine sponge *lanthella basta* as the carriers for human mesenchymal stromal cells (MSC), evaluating their biocompatibility with the cells, as well as the assessment of cryosensitivity of the cells, growing within these carriers to cryopreservation under protection of 10% DMSO and 20% fetal bovine serum according to the method developed for MSC suspension (slow cooling with 1 deg/min rate, rapid thawing at 37°C). Network-like chitin carriers consisting of chitin fibrils were derived from marine sponge *lanthella basta* skeletons by acid-base hydrolysis. During culturing *in vitro* these carriers supported adhesion, migration and proliferation of MSCs. After cryopreservation we observed a decrease in cell viability with their metabolic activity of 46.8±5.8% in respect to the native specimens and it did not reduce to day 1 of reculture. As proceeded from the reported findings, the skeletons from marine sponge *lanthella basta* are the new promising source for carriers to be used in tissue engineering and regenerative medicine. This research may serve the basis for further developing the cryopreservation methods for stem cells within 3-D tissue-engineered scaffolds.

Key words: chitin, marine sponges, adherent cells, cell suspension, tissue-engineered constructs, mesenchymal stromal cells, cryopreservation.

¹Отдел криобиохимии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Отдел биоминералогии и экстремальной биомиметики, Институт экспериментальной физики, Фрайбергский технический университет, г. Фрайберг, Германия

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+380 57) 373-41-35, факс: (+380 57) 373-30-84,
электронная почта: v.v.mutsenko@gmail.com

Поступила 25.11.2014
Принята в печать 17.12.2015

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 13–23.
© 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

¹Department of Cryobiochemistry, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Department of Biomineralogy and Extreme Biomimetics, Institute of Experimental Physics, Freiberg Technical University, Freiberg, Germany

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3734135, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: v.v.mutsenko@gmail.com

Received November, 25, 2014
Accepted December, 17, 2015

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(1): 13–23.
© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

В настоящее время для криоконсервирования мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в виде суспензии общепринятым считается метод, включающий медленное охлаждение (1 град/мин) до -80°C с последующим погружением в жидкий азот и быстрый отогрев, а также применение 10%-го ДМСО и 20% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, который обеспечивает высокую жизнеспособность криоконсервированных МСК [8]. Криоустойчивости клеток в суспензии способствуют их сферическая форма и относительно свободное расположение в среде, что облегчает изменение объема клеток в ответ на увеличение концентрации веществ во внеклеточной среде и дает возможность избежать механического повреждения движущимся фронтом растущих кристаллов льда [1]. Такие возможности исключаются, если клетки находятся в распластанном состоянии, а их положение фиксируется межклеточными контактами и/или контактами с субстратом [3, 19].

На современном этапе развития тканевой инженерии МСК являются наиболее востребованным клеточным компонентом, при этом все более актуальной становится разработка методов криоконсервирования сформированных тканеподобных структур со сложной системой межклеточных контактов. При таком подходе значительно сокращается временной разрыв между клиническим запросом и возможностью предоставления необходимого тканеинженерного имплантата, поскольку подготовка носителя, выделение и экспансия клеток, заселение их в носитель, а также дальнейшее культивирование и дифференцировка являются длительными процедурами.

Большое внимание уделяется также вопросам модификации уже существующих носителей, поиску и созданию новых, что обусловлено разнообразием требований к их характеристикам и параметрам в зависимости от конечной цели использования. В настоящее время вызывает интерес уникальный биотехнологический потенциал морских губок, которые могут стать источником новых альтернативных носителей, структурированность которых имеет природный характер. Так, в составе морских губок отряда *Verongida* был обнаружен α -хитин [6, 7]. В частности, из губки *Ianthella basta*, одного из представителей данного отряда, были получены новые уникально структурированные плоские сетчатые носители, состоящие из поперечно сшитых хитиновых волокон [4]. Однако биосовместимость данных носителей с МСК человека исследована не была. Более того, в литературе отсутствуют данные о криоконсервировании хитиновых носителей, полученных из морских губок.

Currently, the conventional method for cryopreservation of suspended mesenchymal stromal cells (MSCs), providing their high post-thaw viability, includes the application of 10% DMSO and 20% fetal bovine serum, slow (1 deg/min) cooling down to -80°C , immersion into liquid nitrogen and rapid thawing [9]. Cryoresistance in suspended cells is supported by spherical shape of cells and their free floating in the medium, facilitating an easy change in cell volume in response to increasing concentrations of substances in extra-cellular medium and allowing to avoid mechanical damage by advancing front of growing ice crystals [3]. These phenomena are not possible if cells are flattened and their position is fixed by cell-to-cell and/or cell-substrate contacts [2, 19].

To date the developing tissue engineering widely utilizes MSCs, that is why there is a need of novel cryopreservation methods suitable for the ready tissue-like structures with a complex system of cell-to-cell contacts. This approach significantly reduces the time gap between clinical request and the possibility to supply a necessary tissue-engineered implant, since the preparation of a carrier, isolation and expansion of cells, their seeding into a carrier, as well as further culturing and differentiation require a long time period.

A great attention is also paid to the modification of the existing carriers, searching and producing the new types of them, which is stipulated by a highly diverse requirements to their characteristics and parameters preconditioned by the intended application. Currently, marine sponges have unique biotechnological potential as a source of new alternative carriers with natural structure. For example, the marine sponges of the *Verongida* order showed the presence of α -chitin [7, 8]. In particular, the *Ianthella basta* sponges, one of the representatives of this order, were the source of new unique structured flattened network-like carriers, consisting of crosslinked chitin fibers [4]. However, the biocompatibility of these carriers with human MSCs has not been investigated yet. Moreover, there are no reported data on cryopreservation of chitin carriers, derived from marine sponges.

The research was aimed to study the possibility of using skeletons of marine sponges *Ianthella basta* as the carriers for human mesenchymal stromal cells, assess their biocompatibility, as well as cryosensitivity of the cells growing within these carriers to the conventional cryopreservation method under protection of DMSO.

Materials and methods

To isolate chitin samples the frozen-dried skeletons of marine sponge *Ianthella basta* were treated by acid-base hydrolysis [4, 6]. At the first step the specimens were placed into 20% acetic acid solution for 12 hrs at 37°C to dissolve the calcium carbonate component of sponge and to remove a part of proteins



Цель работы – исследование возможности использования скелетов морских губок *Ianthella basta* в качестве носителей для мезенхимальных стромальных клеток человека, их биосовместимости, а также оценка криочувствительности клеток, растущих на этих носителях, к общепринятому методу криоконсервирования под защитой ДМСО.

Материалы и методы

Для выделения хитиновых образцов лиофилизированные скелеты губки *Ianthella basta* подвергали обработке с использованием кислотного гидролиза [4, 5]. На первом этапе образцы помещали в 20%-й раствор уксусной кислоты на 12 ч при 37°C для растворения кальций-карбонатной составляющей губки и устранения части белков и пигментов, после чего многократно промывали дистиллированной водой. На втором этапе образцы обрабатывали 2,5 М NaOH в течение суток при 37°C, что необходимо для удаления оставшейся части белков, минерализованной составляющей и пигментов. Затем губки промывали дистиллированной водой для достижения pH 6,5 и повторяли цикл обработки до обесцвечивания носителей. На завершающем этапе очистки носители помещали в 35%-й раствор перекиси водорода на 15–20 мин при комнатной температуре с последующей отмывкой дистиллированной водой. Из деминерализованных образцов получали носители размером ~ 3×7×0,4 мм.

Флуоресцентный краситель Calcofluor White («Sigma», США) избирательно связывается с хитином и используется для его визуализации [17]. Образец носителя помещали в 0,1%-й раствор Calcofluor White и инкубировали в течение 10 мин в темноте. Затем промывали три раза дистиллированной водой и исследовали с использованием флуоресцентного микроскопа «CETI EpiFluor» («CETI», Бельгия).

Предварительную экспансию МСК дермы человека проводили в среде культивирования α-MEM («Sigma»), дополненной 10% эмбриональной сыворотки (ЭС) крови крупного рогатого скота («РАА», Австрия), 50 ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности. Носители стерилизовали в 70%-м этиловом спирте, тщательно промывали раствором Хенкса и насыщали культуральной средой. В емкости из неадгезивного пластика объемом 20 мл помещали по 10 носителей и суспензию клеток (2×10⁶ в 10 мл), инкубацию их осуществляли при 37°C в течение 1 ч на радиальном шейкере «MS₁ Minishaker I KA» («Sigma-Aldrich», Германия) при 500 об/мин для обеспечения равномерного заселения. Через 12 ч заселенные

and pigments, and then repeatedly washed with a distilled water. At the second step the samples were treated with 2.5 M NaOH within 24 hrs at 37°C to remove the remaining proteins, mineralized component and pigments. Then sponges were washed with distilled water until reaching pH 6.5, and thereafter the whole treatment cycles were repeated till the carrier discoloration. At the final stage of purification the carriers were placed into 35% hydrogen peroxide for 15–20 min at room temperature, and then washed with distilled water. The demineralised samples were used to obtain carriers with ~7×3×0.4 mm dimensions.

Fluorescent dye Calcofluor White (Sigma, USA) selectively binds to chitin and is used for its visualisation [5]. The carrier specimens were placed into 0.1% Calcofluor White solution and dark-incubated for 10 min. Then they were thrice washed with distilled water and examined with fluorescent microscope CETI EpiFluor (CETI, Belgium).

The human dermal MSCs were preliminarily expanded in α-MEM culture medium (Sigma), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA, Austria), 50 IU/ml Penicillin and 50 mg/ml Streptomycin, in CO₂ incubator at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity. The carriers were sterilized with 70% ethanol, thoroughly washed with Hanks' solution and saturated with culture medium. Afterwards 10 carriers and cell suspension (2×10⁶ in 10 ml) were placed into 20 ml non-adhesive plastic vessels, and incubated at 37°C for 1 hr on radial shaker MS₁ Minishaker I KA (Sigma-Aldrich, Germany) at 500 rpm to ensure a uniform seeding. After 12 hrs the cell-seeded sponge specimens were transferred into the wells of 24-well plate containing 0.5 ml of culture medium, and cultured for 21 days in standard conditions.

For cryopreservation the cell-seeded carriers were placed into 1 ml cryovials (Nunc, USA), which were slowly filled with 0.5 ml cryoprotective medium, comprising culture medium with 10% DMSO and 20% of FBS. After 10 min equilibration at 4°C the samples were frozen using the cooling rate of 1 deg/min in Nalgene Mr. Frosty container (Sigma). After keeping 3 hrs at –80°C in a low temperature refrigerator (Jouan, France) the samples were transferred into liquid nitrogen for storage. Samples were thawed in a water bath at 37°C, cryoprotectant was stepwise removed using DMEM/F-12.

Cell viability prior to and after cryopreservation was assessed using Fluorescein diacetate (FDA) and Propidium iodide (PI) staining. For this purpose the cell-populated carriers were washed with warm Hanks' solution and dark-incubated for 10 min in Hanks' solution with FDA (2 µg/ml) and PI (1 µg/ml). Stained samples were studied using the LSM 510 META laser scanning microscope (Carl Zeiss, Germany).



клетками образцы губок переносили в лунки 24-луночного планшета, содержащие по 0,5 мл среды культивирования, и продолжали культивирование в стандартных условиях (21 сутки).

Для криоконсервирования носители с клетками помещали в криопробирки объемом 1 мл («Nunc», США) и медленно добавляли 0,5 мл криозащитной среды, состоящей из среды культивирования с 10% ДМСО и 20% ЭС. После 10 мин эквilibрации при 4°C образцы замораживали со скоростью охлаждения 1 град/мин в контейнере «Nalgene Mr. Frosty» («Sigma»). Контейнер 3 ч выдерживали при -80°C в низкотемпературном холодильнике («Jouan», Франция), после чего пробы переносили для хранения в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при температуре 37°C, криопротектор удаляли поэтапно с использованием среды DMEM/F-12.

Жизнеспособность клеток до и после криоконсервирования оценивали окрашиванием флуоресцеиндиацетатом (ФДА) и пропидий йодидом (ПЙ). Для этого заселенные клетками носители промывали теплым раствором Хенкса и инкубировали в течение 10 мин в растворе Хенкса с ФДА (2 мкг/мл) и ПЙ (1 мкг/мл) в темноте. Окрашенные образцы исследовали с помощью инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа «LSM 510 META» («Carl Zeiss», Германия).

Для определения метаболической активности в лунки с исследуемыми образцами вносили среду культивирования с 10% Alamar Blue (AB; «Serotec», Великобритания), инкубацию осуществляли в течение 2 ч при 37°C. Затем среду отбирали из лунок и определяли в ней уровень восстановления AB с использованием планшетного спектрофлуориметра («Tecan GENios», Австрия) при волне возбуждения 550 нм и эмиссии 590 нм. Уровень восстановления AB выражали в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ) и определяли по формуле: уровень восстановления = $(\text{ОЕФ}_к - \text{ОЕФ}_ф) / \text{ОЕФ}_ф$, где $\text{ОЕФ}_к$ – уровень флуоресценции в клетках; $\text{ОЕФ}_ф$ – фоновый уровень флуоресценции.

Метаболическую активность клеток оценивали до криоконсервирования, непосредственно после размораживания и удаления от криопротектора, а также через 24 ч после возвращения образцов в условия культивирования. В качестве контроля служили нативные образцы (те же образцы до криоконсервирования).

Для определения нормальности распределения результатов использовали критерий Шапиро-Уилка. Данные выражали как среднее значение \pm стандартное отклонение ($M \pm m$). Значимость различий между группами подтверждали t-критерием Стьюдента для независимых переменных. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

To determine metabolic activity we placed culture medium with 10% Alamar Blue (AB; Serotec, UK) into the wells with the studied samples and incubated the samples for 2 hrs at 37°C. The medium was then collected from the wells and the level of AB reduction was determined using the plate spectrofluorimeter (Tecan GENios, Austria) with excitation at 550 nm and emission at 590 nm. The level of AB reduction was expressed in relative fluorescence units (RFU) and determined by the formulae: Level of reduction = $(\text{RFU}_c - \text{RFU}_b) / \text{RFU}_b$, where RFU_c was relative fluorescence units for cells and RFU_b was the value of background fluorescence.

Cell metabolic activity was assessed prior to cryopreservation, immediately post-thaw and cryoprotectant removal, as well as 24 hrs following the specimens return to culture conditions. The native samples served as the control (the same samples before cryopreservation).

To determine the normality of distribution of the parameters we used the Shapiro-Wilk test. Data were expressed as the mean \pm standard deviation ($M \pm m$). The significance of differences between groups was confirmed by Student t-test for independent variables. Differences were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

After completing purification procedure for frozen-dried sponge *Ianthella basta* skeletons (Fig. 1A) we obtained the colourless flat skeletal fragments having a cellular structure with a wall thickness of about 0.4 mm (Fig. 1B). Purified fragments preserved the original structure of sponge skeleton. After cutting longitudinal cell walls we obtained the rectangular carriers, which were further used in the study (Fig. 1C).

Microscopy analysis revealed that the obtained carriers had numerous pores of different shapes and diameters (from 50 μm to several millimetres) (Fig. 2A). After Calcofluor White staining the carriers had a characteristic blue fluorescence, confirming the presence of chitin (Fig. 2B).

The cells, seeded into carriers, were attached to walls and flattened on them, getting fibroblast-like morphology. After 7 days of culture there was a gradual filling of carrier pores with the cells from the periphery to the center (Fig. 3B). After 21 days of culture the formed cell sheets filled entirely the carrier pore lumens (Fig. 3C).

Thus, the demineralized chitin carriers from marine sponge *Ianthella basta* skeletons showed the biocompatibility with MSCs *in vitro* and enabled cell growth up to the formation of cell sheets filling the pores.

After 21 days of culture the samples were cryopreserved under protection of 10% DMSO in the presence



Результаты и обсуждение

После процедуры очистки лиофилизированных скелетов губок *Ianthella basta* (рис. 1, А) получали бесцветные плоские фрагменты скелета, имеющие ячеистое строение с толщиной стенок ~ 0,4 мм (рис. 1, В). Очищенные фрагменты сохраняли оригинальную структуру скелета губки. После разрезания продольных стенок ячеек получали носители прямоугольной формы, которые в дальнейшем использовали в исследовании (рис. 1, С).

При микроскопировании было выявлено, что полученные носители пронизаны множеством пор различной формы и диаметра (от 50 мкм до нескольких миллиметров) (рис. 2, А). После окрашивания с помощью Calcofluor White носители имели характерную голубую флуоресценцию, свидетельствующую о том, что они состоят из хитина (рис. 2, В).

Клетки, заселенные в носители, прикреплялись к стенкам и расплывались на них, приобретая фибробластоподобный вид. Через 7 суток культивирования наблюдалось постепенное заполнение пор носителя клетками от периферии к центру (рис. 3, В). На 21-е сутки культивирования сформированные клеточные пласты целиком заполняли просветы пор носителя (рис. 3, С).

Таким образом, деминерализованные хитиновые носители из скелетов морской губки *Ianthella basta* показали биосовместимость с МСК *in vitro* и обеспечивали рост клеток до образования пластов, заполняющих поры.

Через 21 сутки культивирования образцы криоконсервировали под защитой 10%-го ДМСО в присутствии 20% ЭС по протоколу, общепринятому для криоконсервирования суспензий МСК дермы и позволяющему сохранять метаболическую активность деконсервированных клеток на уровне $(87 \pm 5)\%$ по АВ-тесту [16].

На рис. 4, А представлен вид носителя с клетками, окрашенными ФДА/ПЙ, до криоконсер-

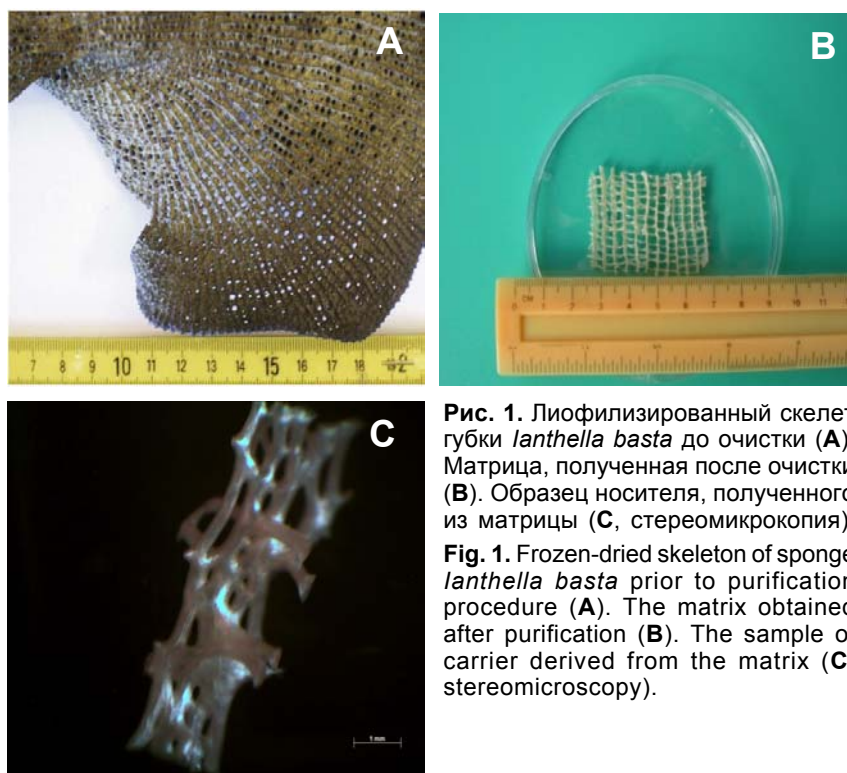


Рис. 1. Лиофилизированный скелет губки *Ianthella basta* до очистки (А). Матрица, полученная после очистки (В). Образец носителя, полученного из матрицы (С, стереомикроскопия).

Fig. 1. Frozen-dried skeleton of sponge *Ianthella basta* prior to purification procedure (А). The matrix obtained after purification (В). The sample of carrier derived from the matrix (С, stereomicroscopy).

of 20% FBS according to the standard protocol for dermal MSCs suspension cryopreservation, which enabled to preserve metabolic activity of frozen-thawed cells at the level of $(87 \pm 5)\%$ by the AB-test [17].

Fig. 4A demonstrates a carrier with FDA/PI-stained cells prior to cryopreservation (control). Positive FDA-staining of cells and a small amount of the cells with PI-stained nuclei testify to a high viability of cells within the bioengineered scaffold. After cryopreservation (Fig. 4B) the number of positively PI-stained cells significantly increased.

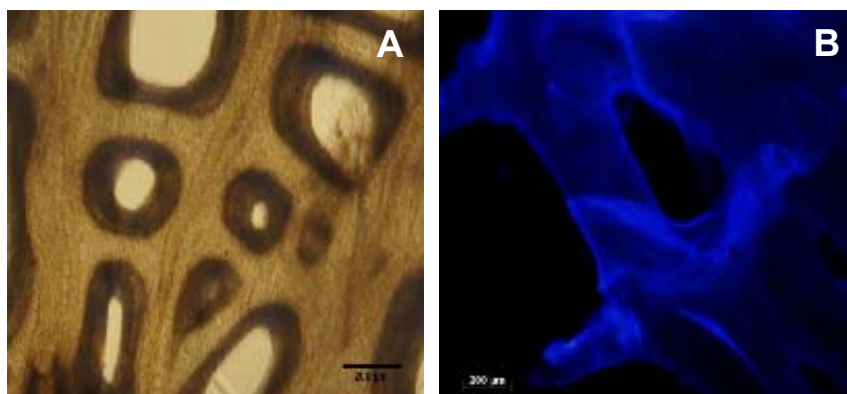


Рис. 2. Морфология носителя, полученного из скелета деминерализованной губки *Ianthella basta* (А, световая микроскопия). Носитель после окрашивания Calcofluor White. (В, флуоресцентная микроскопия).

Fig. 2. Morphology of carrier derived from demineralized sponge *Ianthella Basta* skeleton (А, light microscopy). The carrier after Calcofluor White staining (В, fluorescence microscopy).

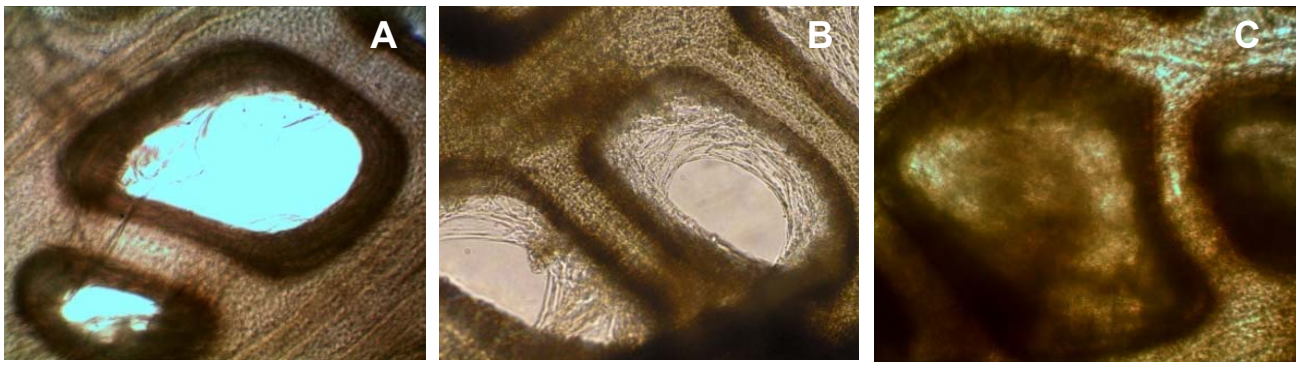


Рис. 3. Носитель без клеток (А); МСК в порах хитинового носителя: 7-е (В) и 21-е (С) сутки в культуре, $\times 100$. Нативный препарат.

Fig. 3. Cell-free carrier (A); MSCs within the pores of chitin carrier: day 7 (B) and day 21 (C) in culture, $\times 100$. Native preparation.

вирования (контроль). Позитивное окрашивание клеток ФДА и небольшое количество клеток с ядрами, окрашенными ПЙ, свидетельствуют о высокой жизнеспособности клеток в составе биоинженерной конструкции. После криоконсервирования (рис. 4, В) количество клеток, позитивно окрашенных ПЙ, значительно увеличивалось.

Для интегральной оценки метаболической активности клеток использовали АВ-тест. Как следует из рис. 5, криоконсервирование приводит к двукратному снижению этого показателя ($46,8 \pm 5,8\%$) по отношению к контролю (100%). Через сутки рекультивирования этот уровень сохранился.

Результаты настоящей работы показали, что деминерализованные очищенные скелеты морских губок *Ianthella basta*, состоящие из хитиновых волокон, организованных в пористую структуру, биосовместимы с мезенхимальными стромальными клетками человека и способны поддерживать их рост. Биосовместимость хитина известна и подробно описана в литературе [18]. В промышленных масштабах хитин выделяется из креветок, кальмаров, крабов, устриц и используется с целью изготовления матриц для тканевой инженерии, что требует значительных финансовых затрат и технологических манипуляций [10]. Из морских губок *Ianthella basta* можно с минимальными затратами получить новые и перспективные носители, уникальная структура которых определяется процессом эволюции данных губок.

For integral assessment of cell metabolic activity we used the AB test. As it follows from the Fig. 5, cryopreservation resulted in a 2-fold decrease of this index ($46.8 \pm 5.8\%$) in respect to the control (100%). One day after reculture this level remained unchanged.

Our findings demonstrate that demineralized purified skeletons of marine sponge *Ianthella basta* comprised of chitin fibers, arranged in a porous structure, were biocompatible with human mesenchymal stromal cells, and capable to maintain their growth. Biocompatibility of chitin is well known and reported in details [18]. Chitin is commercially procured from shrimps, squids, crabs, oysters, and used to manufacture the matrices for tissue engineering, that requires significant financial costs and technological procedures [11]. The new and advanced carriers, which unique structure is the result of a natural evolution, might be procured from the marine sponges *Ianthella basta* with the minimum costs required.

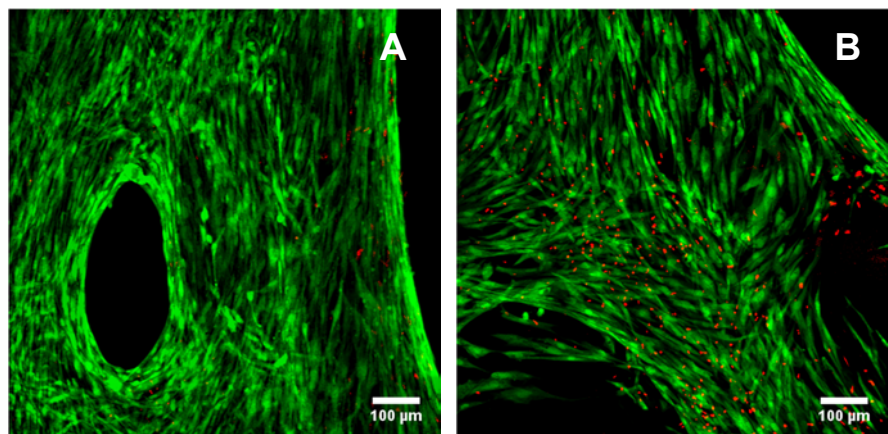


Рис. 4. Вид МСК в хитиновом носителе до (А) и после (В) криоконсервирования. Комбинированное окрашивание ФДА/ПЙ.

Fig. 4. Appearance of MSCs within chitin carrier prior to (A) and after (B) cryopreservation. Combined staining with FDA/PI.



Как видно из представленных результатов, МСК адгезировали и распластывались на поверхностях хитиновых носителей, в ходе культивирования пролиферировали и заполняли свободное пространство пор носителя. В результате трехнедельного культивирования формировалась биоинженерная структура, в которой можно условно выделить участки, в которых клетки растут на внешних поверхностях хитинового носителя, и участки, сформированные пластами клеток в свободном объеме пор. Такие структуры, образованные аутологичными МСК пациента, могут служить основой для разработки новых тканеинженерных конструкций, например, для инженерии костной или хрящевой тканей.

Исходя из данных литературы предполагалось, что адгезивные клетки в составе полученных трехмерных тканеинженерных конструкций будут более чувствительными к общепринятому методу криоконсервирования, включающему медленное охлаждение под защитой 10% ДМСО, чем клетки в суспензии [12, 14]. Известно, что при медленном охлаждении одним из основных повреждающих факторов является действие высоких концентраций солей, возникающих вследствие кристаллизации внеклеточной воды, что ведет к дегидратации клетки и, соответственно, к уменьшению ее объема [16]. Объем клеток, охлаждаемых в виде суспензии, может относительно свободно изменяться в ответ на возрастающие концентрации солей, что позволяет избежать гибели клеток. Ранее нами было показано, что МСК, использованные в данной работе, после криоконсервирования по общепринятому методу в виде суспензии сохраняют метаболическую активность на уровне $(87 \pm 5)\%$ [17]. В то же время МСК в составе биоинженерной конструкции вовлечены в сложную систему взаимоотношений, при которых взаимодействия типа клетка-клетка и клетка-субстрат во многом определяют их криобиологические свойства и большую чувствительность к факторам криоповреждения по сравнению с клетками в суспензии.

Наши результаты согласуются с данными работ V.L. Liu и соавт. [11, 12], в которых показано, что стромальные клетки, криоконсервированные в виде монослоя, являются более чувствительными к повреждающим факторам криоконсервирования, чем клетки в суспензии. При этом для выживаемости клеток большое значение имеют степень адгезии клеток, природа субстрата *per se* и его механические свойства. Так, в работе A. Katsen-Globa и соавт. [9] на примере альгинат-желатиновых носителей было показано, что успех криоконсервирования МСК в составе трехмерных скаффолдов определяется степенью прикрепления и

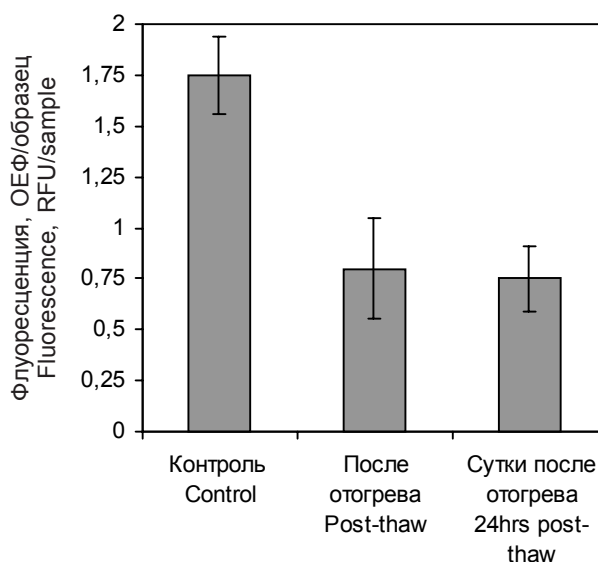


Рис. 5. Метаболическая активность клеток до и после криоконсервирования в составе носителей; AB-тест; * – различия значимы по отношению к контролю ($p < 0,05$).

Fig. 5. Metabolic activity of the cells prior to and after cryopreservation within the carriers; AB test; * – differences are significant with respect to control ($p < 0.05$).

The presented findings show MSCs to be adhered and flattened on chitin carrier surfaces; during culture they proliferated and filled free space of carrier pores. As a result of three-week culture a bioengineered structure was formed, which could be conventionally divided to the sites, where the cells grew on the outer surfaces of chitin carrier and those formed by cell sheets in a free volume of pores. These structures, formed by patient's autologous MSCs may serve as a basis for developing new tissue-engineered structures, e.g. for bone or cartilaginous tissue engineering.

Basing on the previously reported data the adherent cells within 3-D tissue-engineered scaffolds were assumed to be more sensitive to the conventional cryopreservation method, comprising slow cooling under 10% DMSO protection, than the suspended cells [13, 15]. The main damaging factor accompanying slow cooling is the influence of high salt concentrations, resulting from extracellular water crystallization, which leads to a dehydration of cells, i.e. reduction of their volume [17]. The volume of cells, cooled in a suspension, can change in a relatively free way in response to increasing salt concentrations, thereby avoiding cell death. We have reported previously that suspended MSCs, similar to the cells used in the present study, preserved metabolic activity at the level of $(87 \pm 5)\%$ after cryopreservation by the conventional method [5]. At the same time the MSCs being within a bioengineered scaffold are involved into a complex system of relationships, where the cell-cell and cell-substrate

распластывания клеток на субстрате. Используя медленное охлаждение с начальной скоростью 1 град/мин в присутствии 10%-го ДМСО, авторы установили, что наиболее высокая эффективность криоконсервирования достигается, если прикрепленная клетка еще не полностью распластана и сохраняет некоторую подвижность на субстрате [9].

Роль подложки в криповреждении монослоев МСК исследована Х. Ху и соавт. [19]. В качестве подложки была использована стеклянная поверхность (контроль), которую модифицировали путем покрытия желатином и матригелем, что обеспечивало более высокую выживаемость МСК человека. Однако жизнеспособность адгезировавших МСК была на 35% ниже, чем клеток, криоконсервированных в виде суспензии.

Криочувствительность клеток в составе трехмерных многослойных структур на основе хитиновых скелетов губок, очевидно, еще выше: во-первых, объемная структура предполагает большее количество межклеточных контактов, чем двумерная, а во-вторых, клетки в этом случае закреплены на жестком каркасе, сформированном хитиновыми волокнами.

При обсуждении криочувствительности фибробластоподобных МСК в составе пластов, монослоев и суспензии следует упомянуть фундаментальное сравнительное исследование J.P. Acker и соавт. [2], в котором показана зависимость криочувствительности фибробластов от взаимодействий типа клетка-клетка и клетка-субстрат. Авторы исследовали четыре модели: изолированные клетки в суспензии; клетки, обособленно прикрепленные к стеклянной поверхности, т. е. имеющие взаимодействия типа клетка-субстрат; колонии клеток, прикрепленных к этому же субстрату со взаимодействиями типа клетка-клетка и клетка-субстрат; многоклеточные сфероиды с большим количеством межклеточных контактов. Установлено, что как межклеточные контакты, так и контакты клеток с субстратом способствуют образованию и распространению внутриклеточного льда и значительно снижают криоустойчивость клеток. Обсуждая возможный механизм повреждения адгезивных клеток, следует учитывать роль внеклеточного льда. Так, B.L. Liu и J. McGrath [11] было отмечено, что прикрепленные клетки могут подвергаться более сильному повреждению, поскольку они имеют гораздо большую площадь контакта с внеклеточным льдом и подвергаются большому механическому напряжению. В процессе внеклеточного льдообразования изолированные клетки «отодвигаются» растущим фронтом льда в каналы между кристаллами. В то же время

interactions largely determine their cryobiological properties and high sensitivity to cryodamage factors as compared to the suspended cells.

Our findings are consistent with the data of B.L. Liu *et al.* [12, 13], reported that stromal cells cryopreserved as a monolayer were more sensitive to damaging factors of cryopreservation comparing to the suspended cells. In this case a cell survival will be affected by the degree of cell adhesion, the nature of substrate *per se*, and its mechanical properties. A. Katsen-Globa *et al.* [10] using alginate-gelatin carriers demonstrated a successful MSCs cryopreservation within 3-D scaffolds to be determined by the degree of cell attachment and flattening on the substrate. Using slow cooling with initial rate of 1 deg/min in the presence of 10% DMSO, the authors established the highest efficiency of cryopreservation in the case when attached cells were not yet fully flattened and kept certain mobility on a substrate [10].

The role of the substrate in MSCs monolayer cryodamage has been studied by H. Xu *et al.* [19]. As a substrate they used a glass surface (control), modified by coating with gelatin and matrigel, that provided a higher survival rate for human MSCs. However, the viability of adhered MSCs was 35% lower than that of the cells cryopreserved in a suspension.

Obviously, the cryosensitivity of the cells being within the sponge chitin skeleton-based 3D multilayered structures could be even higher: first, a 3D structure assumes a greater amount of cell-cell contacts, than the 2D one, and secondly, in this case the cells are fixed to a rigid scaffold formed by chitin fibers.

When discussing the cryosensitivity of fibroblast-like MSCs being within the sheets, monolayers and suspension we should mention the fundamental comparative study of J.P. Acker *et al.* [1], where the authors showed the dependency of fibroblast cryosensitivity on the cell-cell and cell-substrate interactions. The authors studied following four models: the isolated cells in suspension; separate cells attached to glass surface, *i. e.* with solely cell-substrate interactions; cell colonies attached to the same substrate having cell-cell and cell-substrate interactions; and multicellular spheroids with a large number of the cell-cell contacts. Both the cell-cell and cell-substrate contacts were established to contribute to intracellular ice formation and spreading, as well as significantly reduce the cell cryoresistance. When speaking about a possible mechanism of damage of adherent cells the role of extracellular ice should be taken into account. Thus, B.L. Liu and J. McGrath [12] noted the fact that the attached cells might undergo more severe damage because they had a much larger area of contact with extracellular ice and underwent higher



адгезировавшие клетки фиксированы и повреждаются по мере продвижения фронта льда.

Необходимо учитывать также метаболический и эпигенетический ответы клеток в суспензии и трехмерных носителях на стресс, вызванный процедурой криоконсервирования. В публикации К. Liu и соавт. [13] на молекулярном уровне было показано, что фибробласты, криоконсервированные в суспензии и составе скаффолдов на основе сополимера молочной и гликолевой кислоты, в процессе рекультивирования проявляли различия по профилю стресс-белков и активации сигнальных путей. В частности, для трехмерной культуры отмечалась повышенная экспрессия белков p38, ERK, ряда ростовых факторов и шаперонов по сравнению с суспензией, что свидетельствует о более выраженной реакции на стрессорные воздействия, связанные с процессом криоконсервирования.

Все вышеперечисленные механизмы криоповреждения адгезивных клеток могут реализовываться и при криоконсервировании трехмерных биоинженерных конструкций на основе МСК и хитиновых скелетов губок *Ianthella basta*, что неизбежно приводит к увеличению процента поврежденных клеток. С целью оценки возможности применения общепринятых методов криоконсервирования для сложных трехмерных структур нами было проведено криоконсервирование полученных биоинженерных конструкций. Оказалось, что деконсервированные образцы содержат значительное количество ПИ-позитивных клеток, а метаболическая активность размороженных образцов сохраняется на уровне $(46,8 \pm 5,8)\%$. Важно отметить, что уровень метаболической активности не снижался в первые сутки рекультивирования, что происходило бы в случае отсроченной гибели поврежденных в процессе криоконсервирования клеток.

Такой уровень выживаемости в составе трехмерной биоинженерной структуры, с одной стороны, является достаточно высоким показателем для адгезивных клеток и, учитывая высокую пролиферативную активность МСК, позволяет рассматривать общепринятый протокол как основу для разработки и усовершенствования методов криоконсервирования трехмерных структур. С другой стороны, полученные данные свидетельствуют о перспективности поиска новых методов и подходов криоконсервирования биоинженерных конструкций.

Криочувствительность хитиновых носителей может объясняться (см. рис. 2) их сложной трехмерной структурой с полостями и мелкими отверстиями различного диаметра. Детальный анализ структуры, проведенный с помощью сканирующей

mechanical stress. During extracellular ice formation the isolated cells are 'shifted' by growing ice front into the channels between ice crystals. At the same time the adhered cells are fixed and damaged as far as the ice front advances.

Metabolic and epigenetic responses of cells being in suspension or 3D carriers to the cryopreservation-induced stress should be also taken into account. K. Liu *et al.* [14] demonstrated differences in the stress-protein profile and signalling pathways activation arised during reculture in the fibroblasts cryopreserved in suspension and within scaffolds, based on lactic and glycolic acid copolymer. In particular, an increased expression of p38 and ERK proteins, some growth factors and chaperones were observed in the cells of 3-D culture comparing with the suspended cells, indicating a more pronounced response to the cryopreservation-associated stress impacts.

All the mentioned above cryodamage mechanisms of adherent cells may be also implemented during cryopreservation of 3-D bioengineered scaffolds based on MSCs and *Ianthella basta* sponge chitin skeletons, which inevitably leads to an increased content of damaged cells. To assess the possibility of using the conventional cryopreservation methods for complex 3-D scaffolds, we cryopreserved the obtained bioengineered scaffolds. It was found that the frozen-thawed samples contained a significant amount of PI-positive cells, and metabolic activity of frozen-thawed samples preserved $(46.8 \pm 5.8)\%$ of pre-freeze level. It is important to emphasize that the level of metabolic activity did not reduce through the first day of reculture, that would occur in case of delayed death of cells damaged during cryopreservation.

On the one hand, this level of survival obtained for the 3D bioengineered structure is quite a high value for adherent cells and, considering a high proliferative activity of MSCs, thereby allows treating the used conventional protocol as a basis for developing and optimizing the methods for 3D scaffolds cryopreservation. On another hand, our findings testify to a promising search for new methods and approaches in bioengineered structures cryopreservation.

Cryosensitivity of chitin carriers may be explained (see Fig. 2) by their complex 3D structure with cavities and small pores of various diameters. Detailed analysis of the structure, performed by scanning electron microscopy showed the chitin fiber of the carrier to have a loose internal structure [4]. We may assume, that cavities are filled with an aqueous solution, crystallized during freezing. Therefore, the ice crystal formation may result in an increased mechanical stress and damage of chitin scaffold from inside, and thus in the death of adjacent cells.

электронной микроскопии, показал, что хитиновые волокна носителя имеют рыхлую внутреннюю структуру [4]. Можно предположить, что в полости проникает водный раствор, который кристаллизуется при замораживании. Следовательно, образование кристаллов льда может приводить к повышению механического напряжения и повреждению хитинового каркаса изнутри и, соответственно, к гибели прилегающих к нему клеток.

Выводы

В настоящей работе получены носители для тканевой инженерии на основе скелетов морской губки *Ianthella basta* и впервые показана их биосовместимость с мезенхимальными стромальными клетками человека.

Результаты первых исследований по криоконсервированию данных носителей, заселенных МСК, показали их высокую криочувствительность.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – К.: Наукова думка, 1994. – 430 с.
2. Acker J.P., Larese A., Yang H. et al. Intracellular ice formation is affected by cell interactions // *Cryobiology*. – 1999. – Vol. 38, №4. – P. 363–371.
3. Armitage W., Juss B. Freezing monolayers of cells without gap junctions // *Cryobiology*. – 2003. – Vol. 46, №2. – P. 194–196.
4. Brunner E., Ehrlich H., Schup P. et al. Chitin-based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta* // *J. Struct. Biol.* – 2009. – Vol. 168, №3. – P. 539–547.
5. Ehrlich H., Ilan M., Maldonado M. Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2010. – Vol. 47, №2. – P. 132–140.
6. Ehrlich H., Krautter M., Hanke T. et al. First evidence of the presence of chitin in skeletons of marine sponges. Part II. Glass sponges (Hexactinellida: Porifera) // *J. Exp. Zool. Mol. Dev. Evol.* – 2007. – Vol. 308B, №4. – P. 473–483.
7. Ehrlich H., Maldonado M., Spindler K. et al. First evidence of chitin as a component of the skeletal fibers of marine sponges. Part I. Verongidae (demospongia: Porifera) // *J. Exp. Zool. Mol. Dev. Evol.* – 2007. – Vol. 308B, №4. – P. 347–356.
8. Hunt C.J. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: a review // *Transfus. Med. Hemotherapy*. – 2011. – Vol. 38, №2. – P. 107–123.
9. Katsen-Globa A., Meiser I., Petrenko Yu. et al. Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate-gelatin cryogel scaffolds // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2014. – Vol. 25, №3. – P. 857–871.
10. Khor E. Chitin: Fulfilling a biomaterials promise. – Elsevier Science, 2001. – 148 p.
11. Liu B.L., McGrath J. Freezing osteoblast cells attached to hydroxyapatite discs and glass coverslips: Mechanisms of damage // *Sci. China Ser. E Technol. Sci.* – 2007. – Vol. 50, №2. – P. 248–256.
12. Liu B.L., McGrath J., McCabe L. et al. Cellular response of murine osteoblasts to cryopreservation?: the influence of

Conclusions

Performed investigations allowed to obtain the carriers based on marine sponge *Ianthella basta* skeletons suitable for tissue engineering and, for the first time, demonstrated their biocompatibility with human mesenchymal stromal cells.

The results of pilot studies on cryopreservation of these MSCs-seeded carriers showed their high cryosensitivity.

References

1. Acker J.P., Larese A., Yang H. et al. Intracellular ice formation is affected by cell interactions. *Cryobiology* 1999; 38(4): 363–371.
2. Armitage W., Juss B. Freezing monolayers of cells without gap junctions. *Cryobiology* 2003; 46(2): 194–196.
3. Belous A.M., Grischenko V.I. *Cryobiology*. Kyiv: Naukova dumka; 1994.
4. Brunner E., Ehrlich H., Schup P. et al. Chitin-based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta*. *J Struct Biol* 2009; 168(3): 539–547.
5. Custodio M.R., Lobo-Hajdu G., Hajdu E., Muricy G., editors. *Porifera research: biodiversity, innovation & sustainability*. Rio de Janeiro, Museu Nacional; 2007.
6. Ehrlich H., Ilan M., Maldonado M. Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin. *Int J Biol Macromol* 2010; 47(2): 132–140.
7. Ehrlich H., Krautter M., Hanke T. et al. First evidence of the presence of chitin in skeletons of marine sponges. Part II. Glass sponges (Hexactinellida: Porifera). *J Exp Zool Mol Dev Evol* 2007; 308B(4): 473–483.
8. Ehrlich H., Maldonado M., Spindler K. et al. First evidence of chitin as a component of the skeletal fibers of marine sponges. Part I. Verongidae (demospongia: Porifera). *J Exp Zool Mol Dev Evol* 2007; 308B(4): 347–356.
9. Hunt C.J. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: a review. *Transfus Med Hemotherapy* 2011; 38(2): 107–123.
10. Katsen-Globa A., Meiser I., Petrenko Yu. et al. Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate-gelatin cryogel scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 2014; 25(3): 857–871.
11. Khor E. Chitin: Fulfilling a biomaterials promise. Elsevier Science; 2001.
12. Liu B.L., McGrath J. Freezing osteoblast cells attached to hydroxyapatite discs and glass coverslips: Mechanisms of damage. *Sci China Ser E Technol Sci* 2007; 50(2): 248–256.
13. Liu B.L., McGrath J., McCabe L. et al. Cellular response of murine osteoblasts to cryopreservation: the influence of attachment to hydroxyapatite (HA) scaffolds. *African Journal of Biotechnology* 2014; 5(21): 2014–2019.
14. Liu K., Yang Y., Mansbridge J. Comparison of the stress response to cryopreservation in monolayer and three-dimensional human fibroblast cultures: stress proteins, MAP kinases, and growth factor gene expression. *Tissue Eng* 2000; 6(5): 539–554.
15. Malpique R., Ehrhart F., Katsen-Globa A. et al. Cryopreservation of adherent cells: strategies to improve cell viability and function after thawing. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; 15(3): 373–386.



- attachment to hydroxyapatite (HA) scaffolds // African Journal of Biotechnology. – 2014. – Vol. 5, №21. – P. 2014–2019.
13. Liu K., Yang Y., Mansbridge J. Comparison of the stress response to cryopreservation in monolayer and three-dimensional human fibroblast cultures: stress proteins, MAP kinases, and growth factor gene expression // Tissue Eng. – 2000. – Vol. 6, №5. – P. 539–554.
 14. Malpique R., Ehrhart F., Katsen-Globa A. et al. Cryopreservation of adherent cells: strategies to improve cell viability and function after thawing // Tissue Eng. Part C. Methods. – 2009. – Vol. 15, №3. – P. 373–386.
 15. Mazur P., Leibo S.P., Chu E.H. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells // Exp. Cell Res. – 1972. – Vol. 71, №2. – P. 345–355.
 16. Petrenko Yu.A., Rogulska O.Yu., Mutsenko V.V. et al. A sugar pretreatment as a new approach to the Me₂SO- and xeno-free cryopreservation of human mesenchymal stromal cells // CryoLetters. – 2014. – Vol. 35, №3. – P. 239–246.
 17. Porifera research: biodiversity, innovation & sustainability/ Eds. M.R. Custodio, G. Lobo-Hajdu, E. Hajdu, G. Muricy. – Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. – 684 p.
 18. Wan A.C., Tai B.C. Chitin – a promising biomaterial for tissue engineering and stem cell technologies // Biotechnol. Adv. – 2013. – Vol. 31, №8. – P. 1776–1785.
 19. Xu X., Liu Y., Cui Z.F. Effects of cryopreservation on human mesenchymal stem cells attached to different substrates // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2014. – Vol. 8, №8. – P. 664–672.
 20. Mazur P., Leibo S.P., Chu E.H. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. Exp Cell Res 1972; 71(2): 345–355.
 21. Petrenko Yu.A., Rogulska O.Yu., Mutsenko V.V. et al. A sugar pretreatment as a new approach to the Me₂SO- and xeno-free cryopreservation of human mesenchymal stromal cells. CryoLetters 2014; 35(3): 239–246.
 22. Wan A.C., Tai B.C. Chitin – a promising biomaterial for tissue engineering and stem cell technologies. Biotechnol Adv 2013; 31(8): 1776–1785.
 23. Xu X., Liu Y., Cui Z.F. Effects of cryopreservation on human mesenchymal stem cells attached to different substrates. J Tissue Eng Regen Med 2014; 8(8): 664–672.