

Ответ мезенхимальных стромальных клеток на криоконсервирование в составе скаффолдов, полученных из скелетов морских губок *lanthella basta* (пилотное исследование)

В.В. Муценко, Е.Ю. Рогульская, Д.Н. Тарусин

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

The Response of Mesenchymal Stromal Cells to Cryopreservation within Scaffolds Derived from the Skeletons of Marine Sponges *lanthella basta* (Pilot Study)

V.V. Mutsenko, O.Yu. Rogulska, D.N. Tarusin

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

Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в суспензии по общепринятому протоколу (1 град/мин, 10% ДМСО и 20% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота) обеспечивает возможность их многократного применения в экспериментальных и клинических целях. В то же время концепция создания биобанков тканеподобных структур, обусловленная требованиями быстроразвивающейся области тканевой инженерии, расширяет возможности применения МСК и ставит перед криобиологами задачу поиска подходов для сохранения этих клеток в адгезированном состоянии в составе трехмерного скаффолда в силу сокращения временных затрат.

В настоящей работе исследовали возможность получения и криоконсервирования скаффолдов на основе хитиновых скелетов морских губок *lanthella basta*, заселенных МСК человека.

Скелеты очищали, заселяли МСК и культивировали в течение 21 суток. Затем полученные скаффолды криоконсервировали под защитой 10% ДМСО и 20% ЭС с использованием стандартного метода, разработанного для МСК в суспензии. Оценку жизнеспособности проводили сразу после криоконсервирования по окрашиванию флуоресцеин диацетатом/пропидий йодидом, а метаболического статуса – сразу после криоконсервирования и через сутки по Alamar Blue-тесту. Адипогенную дифференцировку клеток оценивали с помощью окрашивания нильским красным.

Клетки адгезировали и распластывались на поверхностях хитиновых скаффолдов, в ходе их культивирования пролиферировали, заполняя свободное пространство пор. Стандартный протокол криоконсервирования продемонстрировал высокую криочувствительность скаффолдов, заселенных МСК. В некоторых случаях отмечалось повреждение скаффолдов *per se*. Деконсервированные образцы содержали значительную часть FDA-позитивных клеток, а их метаболическая активность сохранялась на уровне $(46,8 \pm 5,8)\%$ и не уменьшалась на 1-е сутки рекультивирования. Через 21 сутки клетки, криоконсервированные в составе хитинового скаффолда, были способны дифференцироваться в адипогенном направлении.

Данная работа может послужить основой для дальнейшей разработки методов криоконсервирования стволовых клеток в составе трехмерных тканеинженерных конструкций.

Cryopreservation of mesenchymal stromal cells (MSCs) in suspension according to conventional protocol (1 deg/min, 10% DMSO and 20% fetal bovine serum, FBS) provides an opportunity for their multiple applications in experimental and clinical settings. At the same time, a concept of establishing biobanks for tissue-like structures based on the requirements of rapidly evolving field of tissue engineering extends an application field of MSCs and sets a task for cryobiologists to search for approaches for storing them in adhered state within three-dimensional scaffold in virtue of shortening time expenditure.

In the present study we investigated the possibility of deriving and cryopreserving scaffolds based on chitin skeletons of marine sponges *lanthella basta* seeded with human MSCs.

Skeletons were purified, seeded with MSCs and cultured for 21 days. Next, the derived scaffolds were cryopreserved under the protection of 10% DMSO and 20% FBS using the conventional protocol developed for MSCs in suspension. The assessment of viability was performed immediately after cryopreservation by staining with FDA/PI and metabolic status was determined by AB-test both immediately post-thaw and after 1 day. Adipogenic differentiation of the cells was evaluated by staining with Nile Red.

MSCs adhered and spread on surfaces of chitin scaffolds, proliferated in the course of cultivation and filled available pore spaces. Standard cryopreservation protocol demonstrated high cryosensitivity of the scaffolds populated with MSCs. In some cases, damage of the scaffolds *per se* was observed. Thawed samples contained a considerable proportion of FDA-positive cells, their metabolic activity maintained at a level of $(46.8 \pm 5.8)\%$ and did not decrease on day 1 of reculturing. After 21 days the cells cryopreserved within chitin scaffold were able to differentiate into the adipogenic lineage.

This work could serve as a basis for further development of methods for cryopreserving stem cells within three-dimensional tissue-engineered constructs.

