

УДК 611.018.26.085.23:593.4.147.12

Е.Ю. Рогульская^{1*}, В.В. Муценко¹, Е.Б. Ревенко¹, Ю.А. Петренко¹, Г. Эрлих², А.Ю. Петренко¹

Культирование и дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в составе носителей на основе хитиновых скелетов морских губок[#]

UDC 611.018.26.085.23:593.4.147.12

O.Y. Rogulska^{1*}, V.V. Mutsenko¹, E.B. Revenko¹, Y.A. Petrenko¹, H. Ehrlich², A.Y. Petrenko¹ Culture and Differentiation of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stromal Cells within Carriers Based on Sea Sponge Chitin Skeletons[#]

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, хитин, морские губки, носитель, тканевая инженерия.

Ключові слова: мезенхімальні стромальні клітини, хітин, морські губки, носій, тканева інженерія.

Key words: mesenchymal stromal cells, chitin, sea sponges, carrier, tissue engineering.

Тканевая инженерия – интенсивно развивающееся направление биотехнологии, объединяющее принципы клеточной биологии, медицины и материаловедения с целью создания функциональных структур, способных заменить поврежденный орган или ткань при трансплантации [2].

В качестве клеточной основы биоинженерных тканей наиболее перспективными являются мезенхимальные стромальные клетки (МСК), обладающие высоким пролиферативным потенциалом и способностью к направленной мультилинейной дифференцировке. Жировая ткань обладает рядом преимуществ по сравнению с другими источниками МСК благодаря минимальной инвазивности процедуры получения, относительной доступности материала и высокому содержанию клеток-предшественников [4].

Основной задачей при разработке тканеинженерных структур остается выбор оптимального носителя для клеточной экспансии. В последние годы существенно возрос интерес исследователей к биотехнологическому потенциалу различных видов морских губок. Однако вопрос о возможности применения хитиновых скелетов этих губок в регенеративной медицине и тканевой инженерии остается открытым.

Целью настоящей работы было исследование распределения, метаболической активности и способ-

Tissue engineering is a rapidly developing field of biotechnology that combines the principles of cell biology, medicine and material science and is aimed at the development of functional structures to replace damaged organ or tissue by transplantation [2].

As the cellular basis of bioengineered tissues the most promising are mesenchymal stromal cells (MSCs), which possess high proliferative potential and the ability for directed multilineage differentiation. Adipose tissue has some advantages compared with other sources of MSCs due to minimal invasion of harvesting procedure, relative availability of the material and high content of progenitor cells [4].

The main objective in the design of tissue-engineered structures is the selection of optimal scaffolds for cell expansion. There is significant current interest and research focus to biotechnological potential of the different species of marine sponges. However, the question about application of chitin skeletons of these sponges in regenerative medicine and tissue engineering is still open.

The aim of this study was to investigate the distribution, metabolic activity and ability for directed differentiation of human adipose tissue-derived MSCs within chitin-based skeletons derived from marine sponges of *Verongida* order (*Aplysina fulva*, *Aplysina aerophoba*, *Ianthella basta*).

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

²Институт экспериментальной физики, Фрайбергский технический университет, Фрайберг, Германия

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-34, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: rog-helen@yandex.ru

[#]Данное исследование было представлено на минисимпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 24 мая 2013 года в г. Киеве.

Поступила 15.06.2013
Принята в печать 30.08.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №3. – С. 267–270.
© 2013 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

²Institute of Experimental Physics, TU Bergakademie Freiberg, Freiberg, Germany

*To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: rog-helen@yandex.ru

[#]This research was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kiev, Ukraine, on the 24th of May, 2012.

Received June, 15, 2013
Accepted August, 30, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 3. – P. 267–270.
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

ности к направленной дифференцировке МСК жировой ткани человека при культивировании в составе скаффолдов на основе скелета морских губок представителей отряда *Verongida* (*Aplysina fulva*, *Aplysina aerophoba*, *Ianthella basta*).

Для выделения хитинового скелета образцы морских губок *A. fulva*, *A. aerophoba* и *I. basta* подвергали ступенчатой обработке, как описано ранее [1]. Перед заселением клетками деминерализованные скелеты морских губок разрезали на фрагменты 4×4×2 мм и на сутки помещали в 70%-й этиловый спирт, после чего тщательно промывали раствором Хенкса. Для заселения скаффолдов клетками использовали перфузионный метод, ранее разработанный в нашей лаборатории [3].

В работе использовали МСК жировой ткани человека 5–7-го пассажей, полученные после письменного согласия взрослых доноров с соблюдением норм комиссии по биоэтике ИПКиК НАН Украины.

Клетки культивировали в среде α -MEM («Sigma», США), дополненной 10% эмбриональной сыворотки (ЭС) крови крупного рогатого скота («РАА», Австрия), 2 мМ *L*-глутамина, 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина при 37°C, 5% CO₂ и 95%-й влажности.

Прижизненные микроскопические наблюдения, микрофотосъемку, а также анализ окрашенных азур-эозином препаратов культур клеток выполняли с использованием инвертированного микроскопа «Inverso Epi Fluor» («Ceti», Бельгия), снабженного цифровой камерой «Nikon CoolPix 4500» («Nikon», Япония).

Метаболическую и пролиферативную активность клеток в составе носителей на основе скелета морских губок оценивали с использованием редокс-индикатора Alamar Blue (AB) и выражали в условных единицах флуоресценции (УЕФ), а также МТТ-теста.

Для индукции остеогенеза применяли среду α -MEM, содержащую 10 % ЭС, 0,1 мкМ дексаметазона, 0,05 мМ аскорбиновой кислоты, 10 мМ глицерол-фосфата. Остеогенез выявляли по экспрессии щелочной фосфатазы с использованием набора «Fast Blue RR Salt», «Naphtol AS-MX Phosphate Alkaline Solution kit № 85» («Sigma-Aldrich», США) согласно инструкции производителя.

Индукцию адипогенеза проводили в среде α -MEM, содержащей 0,5 мМ 3-изобутил-1-метилксантина, 1 мкМ дексаметазона («Sigma-Aldrich»), 10 мкг/мл инсулина и 100 мкМ индометацина («Sigma-Aldrich»). Адипогенную дифференцировку клеток определяли по накоплению внутриклеточных нейтральных липидов, которые позитивно окрашивались раствором Oil Red O.

Матрицы, полученные после деминерализации и очистки скелетов морских губок, представляли со-

Chitin-based skeletons from marine sponges *A. fulva*, *A. aerophoba* and *I. basta* have been isolated by step-by-step treatment as described previously [1]. Before cells seeding the demineralized skeletons of marine sponges were cut into pieces of 4×4×2 mm, placed in 70% ethanol for 24 hrs and then thoroughly washed with Hank's solution. Scaffolds were seeded with cells using previously developed in our laboratory perfusion method [3].

The investigation was performed using MSCs of the 5–7th passages isolated from human adipose tissue after informed donor consent in appliance with standards of Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine Bioethical Committee.

The cells were cultured in α -MEM (Sigma, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FS) (PAA, Austria), 2 mM *L*-glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity.

Intravital microscopic observation, microimaging and analysis of the azure-eosin-stained cell cultures were performed using an inverted microscope Inverso Epi Fluor (Ceti, Belgium) equipped with a digital camera Nikon CoolPix 4500 (Nikon, Japan).

Metabolic and proliferative activity of cells within chitin-based skeletons derived from marine sponges was assessed by Redox indicator Alamar Blue (AB) and expressed in relative fluorescence units (RFU) as well as MTT assay.

Osteogenesis was induced in α -MEM medium supplemented with 10% FS, 0.1 μ M of dexamethasone, 0.05 mM of ascorbic acid, 10 mM of glycerol-phosphate. Osteogenesis was revealed by expression of alkaline phosphatase using Fast Blue RR Salt, Naphtol AS-MX Phosphate Alkaline Solution kit № 85 (Sigma-Aldrich, USA) according to manufacturer's instructions.

Adipogenesis was induced in α -MEM medium supplemented with 0.5 mM of 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, 1 μ M of dexamethasone (Sigma-Aldrich), 10 μ g/ml of insulin and 100 μ M of indomethacine (Sigma-Aldrich). Adipogenic differentiation was revealed by accumulation of intracellular neutral lipids, positively stained with Oil Red O.

Scaffolds obtained after demineralization and purification of marine sponge skeletons had translucent macroporous structure formed by intersecting chitin fibrils.

After seeding human adipose tissue-derived MSCs attached and spread on the surface of the chitin fibrils of *A. fulva* and *A. aerophoba*, and uniformly distributed over the entire volume of sponges. When culturing in the scaffolds based on the *I. basta* skeletons the cells proliferated actively and filled the space between the fibrils.

The assessment of MSCs metabolic activity after populating the chitin-based skeletons of *A. fulva* and *A. aerophoba* showed that the level of AB reduction was 2,157 RFU per sponge. This parameter was by 25–30% lower compared to that of scaffolds based on *I. basta*



бой прозрачную сетчатую структуру из хитиновых поперечноштитых фибрилл.

После заселения МСК жировой ткани человека прикреплялись и распластывались на поверхности хитиновых тяжей *A. fulva* и *A. aerophoba*, равномерно распределяясь в губках от периферии к центру. При культивировании в составе матриц на основе скелета *I. basta* клетки активно делились, постепенно заполняя все свободное пространство между тяжами.

При определении метаболической активности МСК после заселения носителей установлено, что в первые сутки культивирования уровень восстановления редокс-индикатора АВ в губках *A. fulva* и *A. aerophoba* составлял 2,157 УЕФ/губку и был на 25–30% ниже показателей матриц на основе *I. basta*. При последующем культивировании МСК в составе губок *A. fulva* и *I. basta* интенсивность флуоресценции продукта восстановления АВ возрастала, что свидетельствовало о сохранении клетками метаболической активности и способности к пролиферации.

Следует отметить, что при длительном культивировании носители на основе деминерализованного скелета губки *A. aerophoba* распадались на отдельные тяжи, были рыхлыми и нестабильными. В связи с этим дальнейшие исследования проводили на хитиновых матрицах *A. fulva* и *I. basta*.

Для визуализации локализации клеток на 14-е сутки культивирования использовали МТТ-тест. Установлено, что структура губок позволяла МСК равномерно распределяться во всем объеме носителей, а интенсивное накопление кристаллов формазана свидетельствовало о жизнеспособности и метаболической активности клеток в составе исследуемых матриц (рис. 1).

Индукция клеток, культивированных в объеме губок, в адипогенном направлении приводила к накоплению нейтральных внутриклеточных липидов (рис. 2), которые позитивно окрашивались раствором Oil Red O. При культивировании в остеогенной среде большинство клеток были позитивными по окрашиванию на щелочную фосфатазу (рис.3), которая является ранним маркером остеогенеза.

Таким образом, матрицы на основе скелета морских губок отряда *Verongida* обеспечивают адгезию, пролиферацию и дифференцировку МСК жировой ткани человека в остеогенном и адипогенном нап-

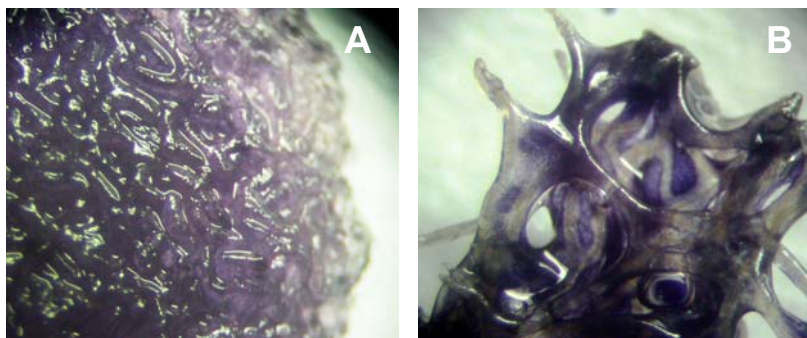


Рис. 1. Распределение МСК в носителях на основе скелета морских губок через 14 суток культивирования: А – *A. fulva*; В – *I. basta*. МТТ-тест, ×10.

Fig. 1. Distribution of MSCs within scaffolds based on skeletons of marine sponges after 14 days of culture: А – *A. fulva*; В – *I. basta*. MTT test, ×10.

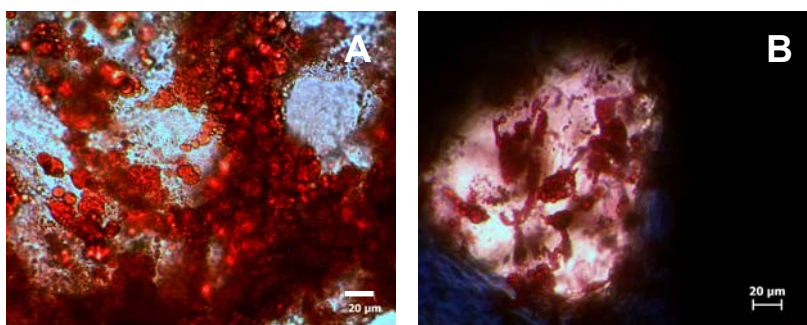


Рис. 2. Адипогенная дифференцировка МСК, культивированных в составе деминерализованного скелета морских губок: А – срез носителя на основе *A. fulva*; В – матрица на основе скелета *I. basta*. Окрашивание Oil Red O.

Fig. 2. Adipogenic differentiation of MSCs cultured within the demineralized skeletons of marine sponges: А – section of scaffold based on *A. fulva* skeleton; В – scaffold based on *I. basta* skeleton. Oil Red O staining.

skeletons. Further culture of MSCs within *A. fulva* and *I. basta* sponges resulted in rise of reduced AB fluorescence intensity, which indicated preservation of cell metabolic activity and proliferative ability as well.

It should be noted that during prolonged culture the chitin-based scaffolds derived from demineralized skeletons of *A. aerophoba* sponge disintegrated into individual fibrils, the carriers became loose and unstable. Therefore further investigation were conducted in chitin scaffolds of *A. fulva* and *I. basta*.

Cell localization and distribution in the scaffolds to the 14th day of culture were evaluated using MTT test. It was determined that MSCs were uniformly distributed within the entire volume of scaffolds and intensive accumulation of formazan crystals indicated viability and metabolic activity of cells within investigated matrices (Fig. 1).

Induction of cells cultured in chitin-based sponge skeletons into adipogenic direction resulted in accumulation of intracellular neutral lipids (Fig. 2), which were positively stained by Oil Red O. When cultured in osteogenic medium most of the cells expressed alkaline phosphatase (Fig. 3), being an early marker of osteogenesis.

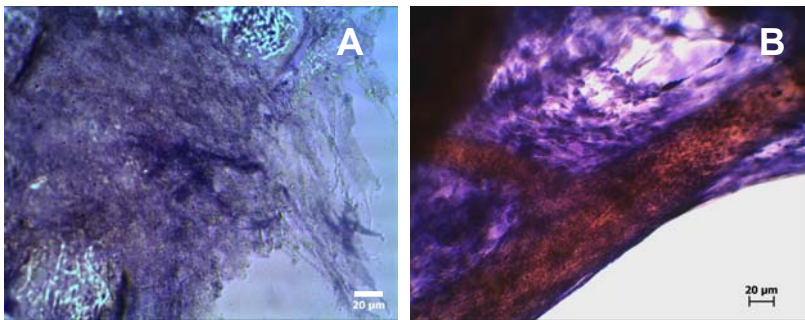


Рис. 3. Остеогенная дифференцировка МСК, культивированных в составе деминерализованного скелета морских губок: **А** – срез носителя на основе *A. fulva* с дифференцированными клетками; **В** – клетки, экспрессирующие щелочную фосфатазу в матрице на основе скелета *I. basta*. Окрашивание набором Fast Blue RR Salt.

Fig. 3. Osteogenic differentiation of MSCs cultured within the demineralized skeletons of marine sponges: **A** – section of scaffold based on *A. fulva* skeleton with differentiated cells, **B** – cells expressing alkaline phosphatase in scaffold based on *I. basta* skeleton. Fast Blue RR Salt Kit staining.

равлениях, что открывает широкие перспективы их использования для создания новых биосовместимых и функционально активных биоинженерных конструкций.

Thus, the scaffolds based on skeletons derived from marine sponges of *Verongida* order promote adhesion, proliferation and differentiation into osteogenic and adipogenic directions of human adipose tissue-derived MSCs, which could provide broad opportunities for creation of new biocompatible and functionally active bioengineered structures.

Литература

1. Ehrlich H., Ilan M., Maldonado M. et al. Three-dimensional chitin-based scaffolds from *Verongida* sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2010. – Vol. 47, №2. – P. 132–140.
2. Langer R., Vacanti J.P. *Tissue engineering* // *Science*. – 1993. – Vol. 260, №5110. – P. 920–926.
3. Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I., Petrenko A.Y. Comparison of the methods for seeding human bone marrow mesenchymal stem cells to macroporous alginate cryogel carriers // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 150, №4. – P. 543–546.
4. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Mol. Biol. Cell*. – 2002. – Vol. 13, №12. – P. 4279–4295.

References

1. Ehrlich H., Ilan M., Maldonado M. et al. Three-dimensional chitin-based scaffolds from *Verongida* sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2010. – Vol. 47, N2. – P. 132–140.
2. Langer R., Vacanti J.P. *Tissue engineering* // *Science*. – 1993. – Vol. 260, N5110. – P. 920–926.
3. Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I., Petrenko A.Y. Comparison of the methods for seeding human bone marrow mesenchymal stem cells to macroporous alginate cryogel carriers // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 150, N4. – P. 543–546.
4. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Mol. Biol. Cell*. – 2002. – Vol. 13, N12. – P. 4279–4295.

