

УДК 591.471+611.018.2/6:57.086.8

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СКЕЛЕТА МОРСКИХ ГУБОК СЕМЕЙСТВА *Aplysinidae* И МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Е. Ю. Рогульская¹
Е. Б. Ревенко¹
Ю. А. Петренко¹
Г. Эрлих²
А. Ю. Петренко¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков
²Институт экспериментальной физики,
Фрайбергский технический университет, Фрайберг, Германия

E-mail: rog-helen@yandex.ru

Получено 15.11.2012

Разработка новых видов тканеинженерных структур является одним из актуальных направлений современной биотехнологии. В работе исследовали перспективность применения хитинового скелета морских губок семейства *Aplysinidae* (*Aplysina fulva* и *Aplysina aerophoba*) для создания биоинженерных конструкций на основе мезенхимных стромальных клеток. Скелет губок после очистки, включающей процедуру деминерализации, представлял собой трехмерную макропористую матрицу, сформированную взаимно пересекающимися хитиновыми фибриллами. После заселения хитиновых матриц клетки прикреплялись к поверхности фибрилл, распластывались и пролиферировали в ходе культивирования. Мезенхимные стромальные клетки в составе *Aplysina fulva* под действием соответствующих индукторов дифференцировались в остеогенном и адипогенном направлениях. Деминерализованные скелеты губок семейства *Aplysinidae* могут быть использованы как носители для мезенхимных стромальных клеток, что открывает новые возможности в создании биоинженерных конструкций жировой и костной тканей.

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

Новые возможности для восстановления поврежденных органов и тканей предоставляет быстро развивающееся междисциплинарное направление — тканевая инженерия. Основные принципы этого подхода заключаются в разработке биоинженерных конструкций на основе комплекса клеток, факторов роста и материалов различной природы с целью их последующей трансплантации в организм пациента для замены поврежденных тканей [1, 2].

В качестве клеточного компонента биоинженерных конструкций соединительных тканей наиболее перспективными являются мезенхимные стромальные клетки (МСК), способные к направленной мультилинейной дифференцировке в клетки кости, хряща, жира [3]. Свойствами МСК также являются адгезивность, высокий пролиферативный потенциал и определенный иммунофенотип (CD29+, CD73+, CD 90+, CD 105+, CD 34-, CD 45-) [3–5]. МСК могут быть изолированы из различных источников, таких как кост-

ный мозг [4], жировая [5] и мышечная [6] ткани, дерма [7], периферическая [8] и кордовая кровь [9]. Ранее нами было показано [10], что дермальные МСК по своим морфологическим, функциональным и иммунофенотипическим характеристикам близки к костного мозга и жировой ткани.

Выбор материала поддерживающего носителя, обеспечивающего пролиферацию включенных клеток *in vitro* и *in vivo*, а также их способность дифференцироваться в различных направлениях [11] — важные условия для создания функционирующих трехмерных тканеинженерных структур. Перечисленными выше свойствами обладают природный азотсодержащий полисахарид хитин и его деацетилированное производное хитозан. Будучи физиологически активными полимерами, они также проявляют иммуномодулирующее, бактерицидное, противоопухолевое, радиозащитное и ранозаживляющее действие в условиях *in vivo* [12, 13]. Многочисленные работы

последних лет свидетельствуют об успешном применении пленок, волокон и губок на основе хитина во многих областях медицины, фармакологии и биотехнологии [13–15].

В настоящее время все большую популярность приобретает биомиметический подход, суть которого состоит в заимствовании идей непосредственно из живой природы. Скелет некоторых морских губок представляет собой уникальную трехмерную конструкцию [16, 17], что позволяет рассматривать их в качестве перспективного носителя для тканевой инженерии. Обычно скелет морских губок состоит из неорганической кремниевой части, формирующей прочный каркас, и органического матрикса протеиновой природы [17]. Ehrlich et al. [18–21] при исследовании губок классов *Hexactinellida* и *Demospongiae* показали, что органический компонент в них может быть представлен не только протеинами, но и полисахаридом α -хитином. В частности, внешняя оболочка спикул губок *Verongula gigantea*, *Ianthella basta* и *Aplysina* sp. отряда *Verongida* образована хитином. Однако вопрос о возможности использования хитиновых скелетов этих губок для нужд тканевой инженерии остается открытым.

Целью настоящего исследования было изучение возможности заселения носителей из деминерализованного хитинового скелета морских губок семейства *Aplysinidae* (*Aplysina fulva* и *Aplysina aerophoba*) мезенхимными стромальными клетками, исследование распределения, метаболической активности МСК и их способности к мультилинейной дифференцировке в таких условиях объемного культивирования.

Материалы и методы

Получение хитиновых носителей. Для выделения хитинового скелета образцы морских губок *Aplysina fulva* (Pallas, 1766) и *Aplysina aerophoba* (Schmidt, 1862) семейства *Aplysinidae*, относящегося к отряду *Verongida* класса *Demospongiae*, подвергали ступенчатой обработке, как описано в работе [19]. На первом этапе скелеты губок помещали в 20% -й раствор уксусной кислоты на 12 ч при 37 °С, что приводило к растворению кальцийкарбонатной составляющей губок и удалению части протеинов и пигментов, после чего образцы многократно промывали дистиллированной водой. Второй этап, обеспечивающий деградацию липидов, протеинов, а также вымывание остатков кремния и пигментов, включал обработку 2,5 М раство-

ром NaOH в течение суток при 37 °С. Затем скелеты губок снова промывали дистиллированной водой, при этом устанавливалось значение pH 6,5, и повторяли цикл щелочной обработки до тех пор, пока матрицы не обесцвечивались. На завершающем этапе очистки губки помещали в 35% -й раствор пероксида водорода на 15–20 мин при температуре 22–23 °С, после чего промывали дистиллированной водой. Деминерализованные образцы носителей использовали для заселения клетками.

Получение и культивирование МСК.

Для выделения стромальных клеток кожи использовали метод эксплантации кусочков [7]. Биопсию кожи (диаметром 3 мм) проводили с письменного согласия проинформированных доноров в соответствии с рекомендациями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации по проведению биомедицинских исследований и нормами Комиссии по биоэтике ИПКиК НАН Украины.

Культивирование клеток осуществляли в среде α -MEM (Sigma, США), дополненной 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота (РАА, Австрия), 2 мМ L-глутамина, 50 Ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина при 37 °С, 5% CO₂ и 95% -й влажности. При достижении клетками 70% слияния в монослой их снимали с подложки с помощью смеси трипсин–версен (1:4) по стандартной методике и пассировали в соотношении 1:3. Для исследований использовали клетки 5–7-го пассажей.

Заселение хитиновых носителей. Перед заселением клетками из деминерализованных скелетов морских губок с помощью инструмента для биопсии кожи Biopsy punch (Stiefel, ФРГ) изготавливали диски диаметром 4 мм и толщиной 2 мм. Полученные носители на сутки помещали в 70% -й этиловый спирт, после чего тщательно промывали раствором Хенкса. Для заселения носителей применяли перфузионный метод, ранее разработанный в нашей лаборатории [22]. С этой целью использовали два шприца объемом 1 мл, соединенных между собой эластичной пластиковой трубкой. В один из них помещали хитиновый диск, во второй — 300 мкл суспензии клеток (3,5–4·10⁶ клеток/мл) и путем поочередных мягких поступательно-возвратных движений поршней шприцов носитель медленно насыщали клетками, затем его инкубировали в шприце в течение 3 ч при 37 °С, после чего переносили в лунку 24-луночного планшета, содержащего 1 мл среды культивирования.

Оценка метаболической активности МСК с использованием Alamar Blue. Оценивая метаболическую активность МСК, заселенных в губки, использовали индикатор Alamar Blue (AB, Serotec), интегрально отражающий уровень окислительно-восстановительных процессов в клетках. Для этого после 24 ч культивирования заселенные клетками носители переносили в лунки 24-луночного планшета с культуральной средой, содержащей 10% АВ, и инкубировали в этих условиях в течение 3 ч при 37 °С. Затем среду отбирали и определяли в ней уровень восстановленности АВ с использованием планшетного спектрофлуориметра Tecan GENios (Австрия) при волне возбуждения 550 нм и эмиссии 590 нм. Результаты представляли как отношение опытной и холостой (без клеток) проб и выражали в условных единицах флуоресценции (УЕФ). Аналогично определяли уровень восстановленности АВ через 7 и 14 сут культивирования.

Оценка морфологии и распределения жизнеспособных клеток в носителях. Прижизненные микроскопические наблюдения, микрофотосъемку, а также анализ окрашенных азур-эозином препаратов культур клеток выполняли с использованием инвертированного микроскопа СЕТІ (Бельгия), снабженного цифровой камерой Nikon CoolPix 4500.

Для визуализации и интегральной оценки распределения МСК в носителях применяли индикатор МТТ. Принцип его работы основан на способности митохондриальных дегидрогеназ восстанавливать 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) до нерастворимых кристаллов формазана темно-фиолетового цвета, которые накапливаются в цитоплазме живых клеток. Для проведения МТТ-теста на 14-е сут культивирования заселенные клетками носители инкубировали в среде, дополненной раствором МТТ (Sigma, 5 мг/мл), в течение 3 ч при 37 °С, после чего среду удаляли, а носители переносили в бесцветный солевой раствор Хенкса и исследовали с помощью стереомикроскопа МБС-9 (СССР).

Направленная адипогенная дифференцировка МСК в хитиновых носителях. Для индукции направленной адипогенной дифференцировки клеток, находящихся в хитиновых носителях, биоконструкции переводили в культуральную среду α -МЕМ с 10% ЭС, L-глутамином и антибиотиками, содержащую индукторы адипогенеза: 0,5 мМ 3-изобутил-1-метил-ксантин (Sigma-Aldrich, St. Louis, США), 1 μ М дексаметазон (Sigma-

Aldrich), 10 μ г/мл инсулин и 100 μ М индометацин (Sigma-Aldrich). Матрицы с клетками культивировали в 24-луночных планшетах в течение 21 сут. Замену среды проводили каждые 3–4 дня. После 21 сут культивирования клеточные культуры фиксировали 10%-м забуференным формалином, окрашивали раствором Oil Red O (30 мг/мл в 60% изопропиловом спирте) в течение 30 мин при комнатной температуре и подвергали микроскопическому исследованию.

Направленная остеогенная дифференцировка МСК в хитиновых носителях. Для оценки способности МСК к вступлению в направленную остеогенную дифференцировку носители переносили в культуральную среду α -МЕМ с 10% ЭС, L-глутамином и антибиотиками, а в качестве индукторов использовали 20 мМ аскорбиновую кислоту (Sigma-Aldrich), 10 мМ β -глицеролфосфат (Sigma-Aldrich) и 1 μ М дексаметазон (Sigma-Aldrich). Носители с МСК культивировали в 24-луночных планшетах в течение 21 сут. Замену среды производили 2 раза в неделю. После 21 сут культивирования биоконструкции фиксировали 10%-м забуференным формалином в течение 30 мин и оценивали в них экспрессию щелочной фосфатазы с использованием набора Fast Blue RR Salt, Naphtol AS-MX Phosphate Alkaline Solution kit № 85 (Sigma-Aldrich) согласно инструкции производителя.

Статистическая обработка. Нормальность распределения полученных результатов оценивали по критерию Шапиро–Уилка. Учитывая нормальное распределение, данные выражали как среднее значение \pm стандартное отклонение. Для оценки достоверности различий между группами использовали t-критерий Стьюдента для независимых переменных. Достоверно отличными считали результаты при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Фрагменты неочищенной морской губки *A. fulva* представляли собой плотные непрозрачные кусочки буро-черного цвета (рис. 1, А). Обработка уксусной кислотой и гидроксидом натрия приводила к постепенному размягчению губки и обесцвечиванию фибрилл ее скелета. После экспозиции в перексиде водорода трехмерные матрицы становились полупрозрачными и утрачивали свою жесткость, что свидетельствовало об эффективности удаления минеральной компоненты и пигментов. Аналогичные изменения наблюдались при очистке губки *A. aerophoba*.

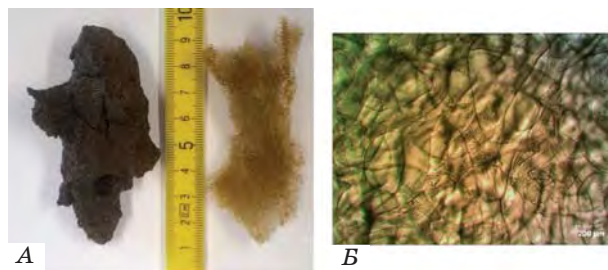


Рис. 1. Морская губка *A. fulva*:
 А — внешний вид губки до и после деминерализации; Б — хитиновые фибриллы после процедуры очистки

Деминерализованный скелет губок представлял собой макропористую структуру из взаимно пересекающихся хитиновых фибрилл толщиной 100–200 мкм, формирующую сложно организованную трехмерную сеть (рис. 1, Б).

После заселения деминерализованного скелета морских губок семейства *Aplysiniidae* дермальные МСК человека прикреплялись и распластывались на поверхности хитиновых тяжей (рис. 2). Клетки характеризовались нормальной фибробластоподобной морфологией и равномерно располагались в губке от периферии к центру.

Определение метаболической активности клеток после заселения носителей показало, что в первые сутки культивирования уровни восстановления АВ в губках *A. fulva* и *A. aerophoba* не различались и были значительно выше фоновых показателей (рис. 3). При дальнейшем культивировании МСК в составе губок *A. fulva* интенсивность флюоресценции продукта восстановления АВ возрастала, а при культивировании в составе в губок *A. aerophoba* не изменялась. Учитывая, что уровень восстановления АВ является интегральным показателем активности окислительно-восстановительных

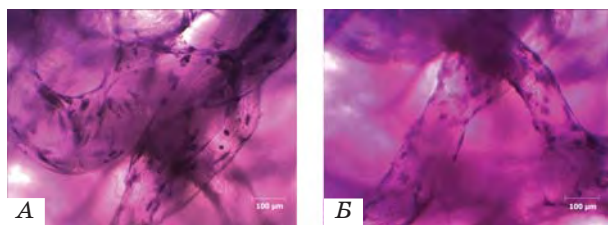


Рис. 2. Морфология МСК в составе трехмерных носителей природного происхождения, 7 сут культивирования:
 А — в носителе на основе скелета *A. fulva*;
 Б — в носителе на основе *A. aerophoba*.
 Окрашивание азур-эозином

энзимов, его повышение свидетельствует о сохранении клетками метаболической активности и проявлении способности к пролиферации при трехмерном культивировании в исследуемых природных носителях.

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

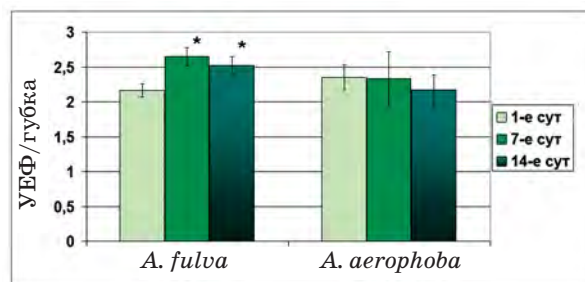


Рис. 3. Метаболическая активность МСК при культивировании в составе хитиновых губок *A. fulva* и *A. aerophoba*, оцененная по уровню восстановления АВ
 (* — $P < 0,05$ по отношению к первым суткам)

Для оценки локализации клеток внутри носителей использовали МТТ, продукт метаболизма которого, формазан, накапливается в живых клетках в виде нерастворимых хорошо различимых в микроскопе кристаллов. Как следует из рис. 4, МСК равномерно распределялись во всем объеме губки *A. fulva*. Кроме того, интенсивное накопление кристаллов формазана свидетельствовало о жизнеспособности и метаболической активности клеток в составе носителя.

На следующем этапе изучали способность МСК к направленной дифференцировке *in vitro* при культивировании в носителях

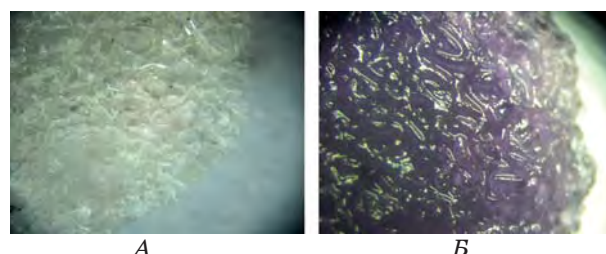


Рис. 4. Распределение МСК в носителе на основе скелета губки *A. fulva* через 14 сут культивирования:

А — губка без клеток;
 Б — губка, заселенная клетками. МТТ-тест. $\times 10$

на основе хитинового скелета губки *A. fulva*. Для индукции адипогенной и остеогенной дифференцировок носители с МСК, культивированные в течение 7 сут, переносили в среды, содержащие специфичные факторы, стимулирующие адипо- и остеогенез соответственно. Через 3 нед индукции адипогенной дифференцировки наблюдалось накопление нейтральных внутриклеточных липидов (рис. 5), которые позитивно окрашивались Oil Red O. При культивировании в остеогенной среде большинство клеток были позитивны на щелочную фосфатазу (рис. 6), которая является ранним маркером остеогенеза.

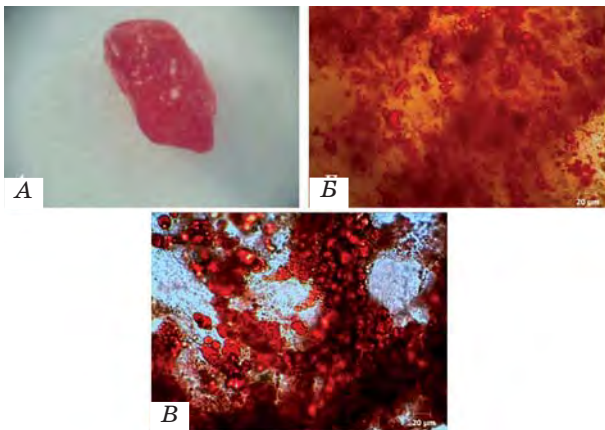


Рис. 5. Адипогенная дифференцировка МСК, культивированных в составе

деминерализованного скелета *A. fulva*:

А — общий вид биоконструкта. $\times 4$; Б — клетки, содержащие нейтральные липиды, в объеме носителя; В — срез носителя с дифференцированными клетками. Окрашивание Oil Red O

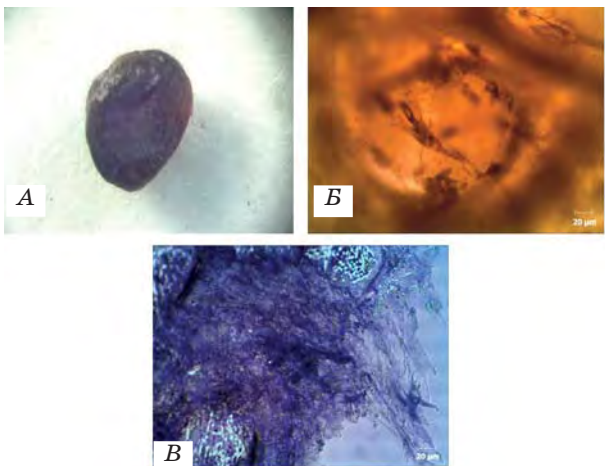


Рис. 6. Остеогенная дифференцировка МСК, культивированных в составе

деминерализованного скелета *A. fulva*:

А — общий вид биоконструкта. $\times 4$; Б — клетки, экспрессирующие щелочную фосфатазу, в объеме носителя; В — срез носителя с дифференцирующимися клетками

Многочисленные исследования в области тканевой инженерии позволили определить основные свойства идеального носителя. Он должен быть биосовместимым, биodeградируемым, не иммуногенным, иметь взаимопересекающиеся поры с размерами, достаточными для заселения, пролиферации, миграции и дифференцировки клеток [11]. Для создания носителя с такими свойствами разработан ряд методов, таких как выщелачивание, лиофилизация, криогелирование, электроспиннинг и пр. [14].

Вместе с тем в природе уже существуют почти готовые трехмерные матрицы — скелеты морских беспозвоночных губок. В настоящее время описано около 7 тыс. видов губок [23]. Строение и химический состав скелета служат основными признаками классификации губок. Скелет морских губок семейства Aplousinidae практически лишен минеральной компоненты и представлен комплексом спонгиновых фибрилл и хитина, которые формируют трехмерную сложноорганизованную сеть. Разработанная Ehrlich et al. [19] методика позволяет получать матрицы, очищенные от протеиновой части, липидов, пигментов и чужеродных включений и состоящие преимущественно из α -хитина.

Хитин — линейный полисахарид, неразветвленные цепи которого представлены элементарными звеньями 2-ацетиламино-2-дезоксид-D-глюкозы, соединенными 1,4- β -гликозидной связью. Благодаря биосовместимости с тканями человека, низкой токсичности, способности к биодеградации *in vivo* при воздействии лизоцима хитин и его производное хитозан представляют интерес для медицины. Частично деацетилированный хитин активирует макрофаги, способствует выбросу провоспалительных цитокинов, усиливает регенеративные процессы [12, 13]. N- и O-сульфатированные производные карбоксиметилхитина применяют в качестве антикоагулянтов для лечения и профилактики тромбозов [24]. Хитин также успешно используют для создания биodeградируемых носителей фармацевтических препаратов [24].

Материалы из частично деацетилированного хитина обладают свойствами, обеспечивающими адгезию, распластывание и пролиферацию клеток [12, 13]. Существенными недостатками этого полимера являются низкая механическая прочность, а также различия в структуре и характеристиках в зависимости от источника сырья и технологии получения [14, 15]. На физико-химические

показатели носителей влияют молекулярная масса хитина, степень его деацетилирования и уровень кристаллизации [25]. Так, полученные нами трехмерные матрицы на основе скелета губки *A. aerophoba*, на которых клетки прикреплялись и распластывались, оказались нестабильными. Культивирование в течение 2–3 нед приводило к дезинтеграции целостной структуры носителя, в то время как механические свойства губки *A. fulva* не изменялись в течение, по крайней мере, 6 нед. В связи с вышеизложенным наши исследования по изучению способности МСК к направленной дифференцировке при объемном культивировании были проведены на

хитиновой матрице *A. fulva*. Клетки, культивированные в составе трехмерного скелета губки *A. fulva*, вступали в дифференцировку в остеогенном и адипогенном направлениях, такой биоконструкт с большой вероятностью может служить основой для восстановления как твердых, так и мягких тканей.

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что скелеты морских губок семейства *Aplysinidae* могут найти применение в биоинженерии и регенеративной медицине в качестве носителей при разработке новых тканеинженерных конструкций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Langer R., Vacanti J. P. Tissue engineering. Science. — 1993. — V. 260. — P. 920–926.
2. Hin T. S. Engineering materials for biomedical application. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. — 2004. — 350 p.
3. Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. — 1999. — V. 284. — P. 143–147.
4. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P. G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications // Stem Cells. — 2001. — V. 19, N 3. — P. 180–192.
5. Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // Mol. Biol. Cell. — 2002. — V. 13, N 12. — P. 4279–4295.
6. Jackson W. M., Nesti L. J., Tuan R. S. Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells // Exp. Opin. Biol. Ther. — 2010. — V. 10, N 4. — P. 505–517.
7. Crigler L., Kazhanie A., Yoon T.-J. et al. Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages // FASEB J. — 2007. — V. 21, N 9. — P. 2050–2063.
8. Kuznetsov S. A., Mankani M. H., Gronthos S. et al. Circulating skeletal stem cells // J. Cell Biol. — 2001. — V. 153, N 3. — P. 1133–1140.
9. Toupadakis C. A., Wong A., Genetos D. C. et al. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue // Amer. J. Vet. Res. — 2010. — V. 71, N 10. — P. 1237–1245.
10. Петренко А. Ю., Петренко Ю. А., Скоробогатова Н. Г. и др. Стромальные клетки костного мозга, жировой ткани и кожи человека в ходе экспансии проявляют иммунофенотип и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток // Трансплантология. — 2008. — Т. 10, № 1. — С. 84–86.
11. Shoichet M. S. Polymer scaffolds for biomaterials applications // Macromolecules. — 2010. — V. 43. — P. 581–591.
12. Kumar R. A review of chitin and chitosan applications // React. Funct. Polym. — 2000. — V. 46. — P. 1–27.
13. Михайлов Г. М., Лебедева М. Ф., Пинаев Г. П. и др. Новые тканевые матрицы на основе рассасывающегося природного полисахарида хитина для культивирования и трансплантации клеток кожи человека // Клет. трансплантол. ткан. инженерия. — 2006. — № 4 (6). — С. 56–61.
14. Costa-Pinto A. R., Reis R. L., Neves N. M. Scaffolds based bone tissue engineering: The role of chitosan // Tissue engine: Part B. — 2011. — V. 17, N 5. — P. 331–347.
15. Martins A. M., Alves C. M., Kurtis K. F. et al. Responsive and in situ-forming chitosan scaffolds for bone tissue engineering applications: an overview of the last decade // J. Mater. Chem. — 2010. — V. 20. — P. 1638–1645.
16. Lin Z. S. L., Kellie Zhang X. et al. In vitro evaluation of natural marine sponge collagen as a scaffold for bone tissue engineering // Int. J. Biol. Sci. — 2011. — V. 7. — P. 968–977.
17. Green D. W. Tissue bionics: examples in biomimetic tissue engineering // Biomed. Mater. — 2008. — V. 3. — P. 1–11.
18. Ehrlich H. Biological Materials of Marine Origin. Invertebrates. — Springer Science + Business Media B.V., 2010. — 569 p.
19. 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 // Int. J. Biol. Macromol. — 2010. — V. 47. — P. 132–140.
20. Ehrlich H., Steck E., Ilan M. et al. Three-dimensional chitin-based scaffolds from

- Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part II: Biomimetic potential and applications // *Ibid.* — 2010. — V. 47. — P. 141–145.
21. Brunner E., Ehrlich H., Schupp P. et al. Chitin-based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta* // *J. Struct. Biol.* — 2009. — V. 168. — P. 539–547.
22. Петренко Ю.А., Иванов Р.В., Лозинский В.И., Петренко А. Ю. Сравнительное исследование методов заселения широкопористых носителей на основе альгинатного криогеля мезенхимальными стромальными клетками костного мозга человека // *Клет. техн. биол. мед.* — 2010. — № 4. — С. 225–228.
23. Ересковский А. В. Сравнительная эмбриология губок (Porifera). — СПб: Изд. Санкт-Петерб. ун-та, 2005. — 304 с.
24. Гальбрайт Л. С. Хитин и хитозан: строение, свойства и применение // *Сорос. образ. журн.* — 2001. — Т. 7, № 1. — С. 51–56.
25. Tigh R. Seda, Karakecili A., Gumusderelioglu M. *In vitro* characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* — 2007. — V. 18. — P. 1665–1674.

**ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ
СКЕЛЕТА МОРСЬКИХ ГУБОК
РОДИНИ *Aplysinidae* ТА МЕЗЕНХІМНИХ
СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН У ТКАНИННІЙ
ІНЖЕНЕРІЇ**

О. Ю. Рогульська¹, О. Б. Ревенко¹,
Ю. О. Петренко¹, Г. Ерліх²,
О. Ю. Петренко¹

¹Інститут проблем кріобіології
та кріомедицини НАН України, Харків
²Інститут експериментальної фізики,
Фрайберзький технічний університет,
Фрайберг, Німеччина

E-mail: rog-helen@yandex.ru

Розроблення нових видів тканинноінженерних структур є одним з актуальних напрямів сучасної біотехнології. У роботі досліджували перспективність використання хітинового скелета морських губок родини *Aplysinidae* (*Aplysina fulva* та *Aplysina aerophoba*) для створення біоінженерних конструкцій на основі мезенхимних стромальних клітин. Скелет губок після очищення, що включало процедуру демінералізації, становив тривимірну макропористу матрицю, сформовану хітиновими фібрилами, які взаємно перетинаються. Після заселення хітинових матриць клітини прикріплялися до поверхні фібрил, розпластувалися й були здатні до проліферації. Мезенхимні стромальні клітини у складі *Aplysina fulva* під дією відповідних індукторів диференціювалися в остеогенному та адипогенному напрямках. Демінералізовані скелети морських губок родини *Aplysinidae* можуть слугувати носіями для мезенхимних стромальних клітин, що відкриває нові можливості для створення біоінженерних конструкцій жирової та кісткової тканин.

Ключові слова: морські губки, хітин, носій, мезенхимні стромальні клітини, тканинна інженерія.

**PROSPECTS FOR APPLICATION
OF *Aplysinidae* FAMILY MARINE SPONGE
SKELETONS AND MESENCHYMAL STROMAL
CELLS IN TISSUE ENGINEERING**

O. Yu. Rogulska¹, O. B. Revenko¹,
Yu. O. Petrenko¹, H. Ehrlich²,
O. Yu. Petrenko¹

¹Institute for problems of Cryobiology and
Cryomedicine of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

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

E-mail: rog-helen@yandex.ru

Development of the new types of tissue engineered structures is one of the promising trends of current biotechnology. The study was directed to the assessment of prospects for the application of chitin-based skeletons derived from marine sponges of *Aplysinidae* family (*Aplysina fulva* and *Aplysina aerophoba*) for creation of bioengineered constructs based on human mesenchymal stromal cells. After cleaning and demineralization procedures, sponge skeletons appeared as three-dimensional macroporous matrices formed by intersecting chitin fibrils. After seeding into chitin-based matrices the cells were attached to the surface of the fibrils and were able to spread and proliferate. Mesenchymal stromal cells within *Aplysina fulva* differentiated into osteogenic and adipogenic directions under the influence of appropriate inductors. Demineralized skeletons derived from marine sponges of *Aplysinidae* family could be used as scaffolds for mesenchymal stromal cells which provides new opportunities for the creation of adipose and bone tissue engineered structures.

Key words: marine sponges, chitin, scaffold, mesenchymal stromal cells, tissue engineering.