

УДК 602.9:576.7:616-001.4

М.В. Погорелов^{1*}, В.Н. Дейнека¹, Р.Г. Васильев^{2,3}, Д.А. Зубов^{2,3}, А.Н. Олешко¹, И.В. Любчак¹,
О.С. Губарь^{3,4}, А.В. Злацкая^{2,3}, А.Е. Родниченко^{2,3}, К. Водседаalkова⁵, Л. Бережкинова⁵

PLA нановолокнистые матрицы для лечения глубоких ран кожи

UDC 602.9:576.7:616-001.4

M.V. Pogorielov^{1*}, V.N. Deineka¹, R.G. Vasyliiev^{2,3}, D.O. Zubov^{2,3}, O.N. Oleshko¹, I.V. Liubchak¹,
O.S. Gubar^{3,4}, O.V. Zlatska^{2,3}, A.Ye. Rodnichenko^{2,3}, K. Vodsedalkova⁵, L. Berezkinova⁵

PLA Nanofibrous Scaffolds for Full Thickness Wound Healing

Ключевые слова: электропрядение, PLA-матрица, дефект кожи, тканевая инженерия.

Ключові слова: електропрядіння, PLA-матриця, дефект шкіри, тканинна інженерія.

Key words: electrospinning, PLA-matrix, skin defect, tissue engineering.

Тканевая инженерия основана на комбинированном использовании клеток, биоматериалов и ростовых факторов для поддержания регенерации тканей. Главная задача тканевой инженерии – улучшение качества жизни пациентов, нуждающихся в замещении или обновлении поврежденных тканей и органов [1, 5].

В регенеративной медицине разработано множество методов, направленных на восстановление различных тканей, но при этом существуют вопросы, требующие дальнейшего изучения [7]: источники выделения клеток; создание конструкций матриц; разработка методов посева клеточных культур и сред культивирования; повышение качества производства матриц; изучение механических свойств матричных конструкций, засеянных клетками, и создание моделей для проведения экспериментов на животных.

Основной функцией матрицы является воспроизведение структуры экстрацеллюлярного матрикса. Она должна поддерживать пролиферацию, дифференциацию и нормальную функцию клеток. Дополнительно матрица, размещенная в месте повреждения, должна предупреждать действие негативных факторов внешней среды на клетки [2]. Кроме того, она должна обладать адекватными механическими свойствами и иметь установленную скорость деградации [4].

В последние годы во многих сферах производства и медицины применяются нановолокна, особенно с

Tissue engineering combines cells, biomaterials and growth factors to support and regenerate biological tissues. The key objective of tissue engineering is to improve quality of life in a secure way by avoiding various adverse effects of several standard medical therapies and replace or repair damaged tissues or organs [1, 5].

Numerous methods have been undertaken to regenerate various tissues, there are still many critical factors to solve in regenerative medicine [7] including cell source, scaffold construction, cell seeding, culture environment, matrix production quality, mechanical properties of cell-scaffold construct and suitable animal models.

The major function of scaffold is to mimic the natural extracellular matrix. The scaffold should support proliferation, differentiation, and normal cell function. Moreover, a scaffold placed at the regeneration site should prevent disturbing cells from external factors [2]. In addition, scaffolds should possess adequate mechanical properties and controlled biodegradability [4].

Nanofibers, especially with diameter of single fiber less than 100 nm have been applied recently in numerous production and medical fields [3]. Some research have found that the same properties are observed for fibers up to 1 μm [8]. The electrospinning method is the most common due to its capability to produce fib-

¹Сумський державний університет, м. Суми, Україна

²Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, м. Київ, Україна

³Біотехнологічна лабораторія ilaya.regeneration, Медична компанія ilaya®, м. Київ, Україна

⁴Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, м. Київ, Україна

⁵Nanopharma a. s., м. Пардубіце, Чехія

¹Sumy State University, Sumy, Ukraine

²State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³Biotechnology Laboratory ilaya.regeneration, Medical Company ilaya®, Kyiv, Ukraine

⁴Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

⁵Nanopharma a. s., Pardubice, Czech Republic

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Р. Корсакова, 2, м. Суми, Україна 40007;
тел.: (+38 054) 266-17-61
електронна пошта: m.pogorielov@gmail.com

Надійшла 26.01.2018

Прийнята до друку 19.02.2018

*To whom correspondence should be addressed:

2, R-Korsakova str., Sumy, Ukraine 40007;
tel.:+380 54 266 1761
e-mail: m.pogorielov@gmail.com

Received January, 26, 2018

Accepted February, 19, 2018

© 2018 M.V. Pogorielov et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

диаметром одного волокна не более 100 нм [3]. Некоторые исследования показали, что эти свойства присущи и волокнам диаметром до 1 мкм [8]. Основной технологией производства нановолокон является электропрядение, позволяющее создать нановолокнистый материал со структурой и диаметром, свойственными экстрацеллюлярному матриксу. К другим его преимуществам относится обеспечение большой площади взаимодействия между клетками и поверхностью матрицы, а также достаточной пористости материала [8]. Основным недостатком электропрядения является использование в процессе изготовления матриц токсических органических веществ [6]. Однако применение альтернативной технологии NanoMatrix-3D-electrospinning (NM3D) позволяет полностью удалять токсические растворы из конечного продукта [6].

Цель работы – изучение возможности использования полилактидного (polylactic acidbased, PLA) NM3D®-нановолокнистого материала в качестве матриц аутологических клеток при создании тканеинженерной конструкции для регенерации глубокого кожного дефекта.

Для изготовления матриц использовали технологию NM3D®-электропрядения. Применение материалов было согласовано с компанией «Nanopharma a. s.» (Чехия). Для изготовления NM3D® обеспечивали стерильные условия и учитывали все требования к производству материалов медицинского назначения. В процессе изготовления материалов использовали специальный тип прядения интегрированной системой фильтрации и точной регуляцией атмосферных условий.

Структура PLA-матриц, изготовленных методом NM3D®-электропрядения, представляет собой хаотично расположенные волокна, формирующие многочисленные и соединённые между собой поры разного размера, что сходно со строением экстрацеллюлярного матрикса. Благодаря такой структуре клетки мигрируют внутрь матрицы. Размер пор составляет от 25 до 300 мкм, а диаметр волокон – $(954,9 \pm 395,7)$ нм.

С целью исследования пористости и диаметра волокон PLA-матриц с помощью электронного микроскопа «REMMA102» («SELMI», Украина) была проведена сканирующая электронная микроскопия.

Стволовые клетки жировой ткани (ADSCs) и дермальные фибробласты (DFBs) выделяли путем ферментативного расщепления фрагментов подкожной жировой клетчатки и дермы экспериментальных крыс, далее клетки культивировали в среде α -MEM, дополненной 10% FBS (фетальная бычья сыворотка) и 1 нг/мл bFGF (ростовой фактор фибробластов) в условиях 5% O₂ и 5% CO₂. Культивированные клетки обоих видов засеивали на PLA-матрицы (10⁴ клеток для каждого образца) в 24-луночные куль-

rous materials with their structure and fiber diameters similar to those of natural extracellular matrix. Some advantages of electrospun scaffolds include the presence of large surface area for cell attachment and high porosity to facilitate nutrient and waste exchange [8]. The main disadvantage of electrospinning is the involvement of toxic organic solvents during fabrication, which can be harmful to cells [6]. However, some methods as melt electrospinning, which does not involve the use of organic solvents and NanoMatrix3D-electrospinning (NM3D) are now promising alternatives to solution electrospinning [6].

The aim of research was to evaluate possible application of polylactic acid (PLA) – based NM3D nanofibrous material as a scaffold for autologous cell for development of tissue-engineered construct for full thickness wound healing.

NM3D® electrospinning was used for scaffold synthesis. All the materials were used with permission of Nanopharma a. s. (Czech Republic). In order to remove residual solvent all the layers NM3D® were dried prior in desiccator and in a special high vacuum evaporator. NM3D® was produced under sterile conditions with measures for medical use of the material. Special type of spinner with integrated filtration system and accurate regulation of climatic conditions was used.

NM3D® PLA nanofibrous electrospun scaffolds represent the random orientated fibers, which form numerous interconnected pores. The structure is similar to natural matrix, that allows a cell migration inside the scaffold: pore size ranges from 25 to 300 μ m and fiber diameter is (954.9 ± 395.7) nm.

To assess porosity and fiber diameter of PLA scaffold the scanning electron microscopy was performed using the electron microscope 'REMMA102' (SELMI, Ukraine).

Adipose-derived stem cells (ADSCs) and dermal fibroblasts (DFBs) were isolated via enzymatic digestion of subcutaneous fat and derma fragments of experimental animals (rats), then propagated in α -MEM medium supplemented with 10% FBS and 1 ng/ml bFGF under 5% O₂ and 5% CO₂. Cultured cells of both types were sown over the PLA scaffolds in triplets (10⁴ cells per each type membrane sample) in 24-well cell culture plates and incubated for 7 days. Cell viability and proliferation rate were assured to days 1, 3, 5 and 7 by combined staining with FDA/PI followed by fluorescent microscopy visualization and Alamar Blue assay.

To construct tissue engineering scaffolds, 10×10^4 ADSCs and DFBs were seeded at the top of PLA scaffold with 10 mm diameter and cultured in growth medium 4 days before *in vivo* experiment.

Thirty seven white laboratory male rats (Wistar line) weighing 180–200 g, obtained from the animal facility



туральные планшеты и инкубировали в течение 7 суток ($n = 3$). Жизнеспособность и степень пролиферации клеток подтверждали на 1, 3, 5 и 7-е сутки путем комбинированного окрашивания флуоресцеином диацетатом и пропидиум йодидом (FDA/PI) при дальнейшей визуализации клеток с помощью флуоресцентного микроскопа и анализа уменьшения восстановленного резазурина («Alamar blue assay», Великобритания).

С целью построения тканеинженерной матрицы на поверхность PLA-матриц диаметром 10 мм засеивали 10×10^4 ADSCs и DFBS, культивировали в питательной среде в течение 4 суток перед проведением эксперимента *in vivo*.

Работу выполняли на 37 лабораторных крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г, полученных из вивария Медицинского института СумГУ. Эксперимент проводили в соответствии с Законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№3447-IV от 21.02.2006 г.) с соблюдением требований комитета по биоэтике Медицинского института СумГУ. Перед проведением эксперимента животных фиксировали и для обезболивания вводили кетамин (10 мг/кг массы). С межлопаточной области удаляли шерстный покров и цилиндрическим ножом формировали глубокую кожную рану диаметром 12 мм. Животных рандомизировали в 3 группы: 1 – положительный контроль ($n = 12$); 2 – PLA-матрицы с ADSCs ($n = 12$) и 3 – PLA-матрицы с DFBS ($n = 13$). Животным группы 1 в рану имплантировали бесклеточные PLA-матрицы толщиной 3 мм, группы 2 – PLA-матрицы с ADSCs и группы 3 – PLA-матрицы с DFBS.

Гистологические образцы с участка оперативного вмешательства изымали на 7- и 14-е сутки после операции. Гистологические срезы толщиной 12 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для визуализации образцов использовали оптический микроскоп «Olympus» (Япония).

Статистическую обработку данных осуществляли в приложении «SPSS Statistics 21» («IBM», США). Для всех показателей рассчитывали значение средней арифметической выборки (M), ее дисперсию и ошибку средней величины (m).

Результаты окрашивания FDA/PI и уменьшение флуоресценции восстановленного Alamar blue свидетельствовали об отсутствии цитотоксичности NM3D® PLA-матриц и наличии клеточной пролиферации во время культивирования на них.

На 7-е послеоперационные сутки бесклеточные матрицы были заполнены иммунными клетками (макрофаги и лейкоциты), а также фибробластами. Лейкоциты занимали периферические зоны матрицы, формируя воспалительную мембрану вокруг имплантированного материала. Макрофаги были сосредоточены

of Medical Institute of Sumy State University, were used in the study. Experiment design was performed in accordance with the Law of Ukraine ‘On the Protection of Animals Against Cruelty’ (№3447-IV of February 21, 2006), in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of Medical Institute of Sumy State University. All the animals were anesthetized with ketamine (10 mg per kg of body weigh). After animal fixation, interscapular region was shaved and full-thickness skin wound 12 mm in diameter (up to subcutaneous fascia) was made by cylindrical-shaped knife. Animals were randomized in 3 groups: 1st group – positive control ($n = 12$); 2nd group – ADSCs PLA-scaffolds ($n = 12$) and 3rd group – DFBS PLA-scaffolds ($n = 13$). Cell free scaffolds (3-mm thickness) were implanted in skin defect for animals of 1st group, PLA-scaffolds with correspondent cell type were done to animals of 2nd and 3rd groups.

Histological samples from the surgical sites were prepared 7 and 14 days after the performed operation. Sections of 12 μ m thick were prepared and stained with hematoxylin and eosin. The specimens were visualized using a light microscope Olympus (Japan).

The data were statistically processed with the SPSS Statistics 21 software (IBM, USA). The data were represented as mean \pm SEM, and statistically significant differences between groups were determined using Student’s t test, $p < 0.05$.

FDA/PI staining and Alamar Blue assay showed no cytotoxicity from the NM3D® PLA scaffold and cell proliferation were detected under cultivation on it.

To day 7 after surgery the cell-free scaffolds were filled both by immune cells (macrophages and leucocytes) and fibroblasts. Leucocytes occupied peripheral zone of the scaffold and formed inflammatory wall surround implanted materials. Macrophages were visualized both in peripheral and deep parts and provided scaffold degradation. Fibroblasts and single endothelial cells penetrated into the deep parts of cell-free scaffold but did not form tissue-specific structures and vessels (Figure A).

We did not see any significant difference between ADSCs and DFBS-loaded scaffolds to day 7 after wound treatment. The scaffold contained both live and dead fibroblast-like cells, probably due to inadequate cell nutrition. Large scaffold area and relatively high thickness did not allow direct nutrition of deep zones from damaged wound vessels. In contrast to cell-free scaffolds, the tissue-engineered constructs, implanted into the site of deep skin defect, provided the collagen fiber formation and vascular ingrowth within peripheral part of scaffold (Figure B).

Cell-free PLA scaffold in 14 days after implantation was partially replaced by connective tissue (in periphe-

как на периферии, так и в глубоких частях матрицы, обеспечивая ее деградацию. Фибробласты и одиночные эндотелиоциты проникали в глубокие слои матрицы, но не участвовали в формировании специфической ткани и сосудов (рисунок, А).

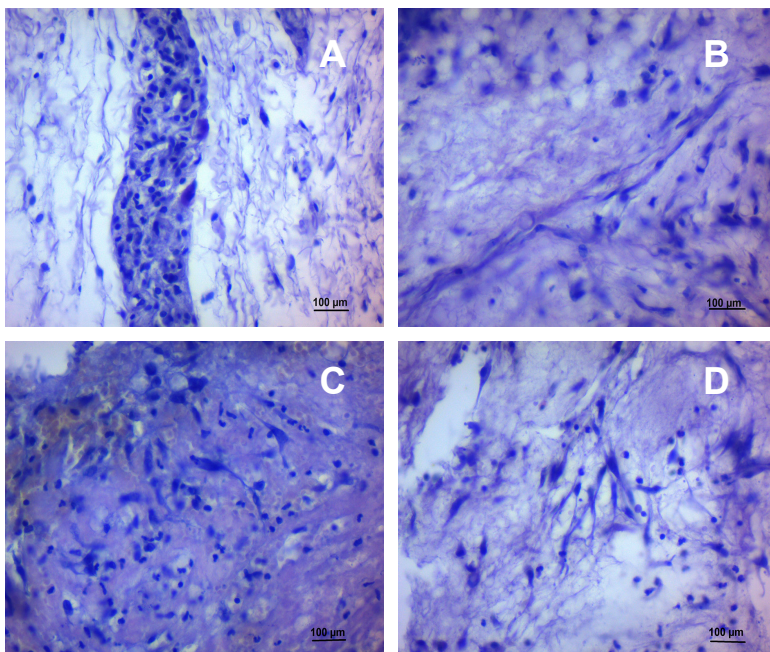
Значительных различий между матрицами, засеянными ADSCs или DFBs на 7-е сутки после имплантации материала, выявлено не было. Матрица содержала живые и мертвые фибробластоподобные клетки, что, возможно, обусловлено недостаточным снабжением клеток питательными веществами. Достаточно обширная площадь и относительно большая толщина матрицы препятствовали прямой поставке питательных веществ к ее глубоким участкам через пораженные раневые сосуды. В отличие от бесклеточной PLA-матрицы тканеинженерные конструкции, имплантированные в место глубокого кожного дефекта, обеспечивали формирование коллагеновых волокон и разрастание сосудов по периферии матрицы (рисунок, В).

Бесклеточная PLA-матрица на 14-е сутки после имплантации в периферических участках была частично замещена соединительной тканью. Выраженность воспалительной реакции уменьшилась, но большие группы макрофагов и лейкоцитов сохранялись в центральных участках матрицы (рисунок, С).

На 14-е сутки наблюдения воспалительная реакция в гистологических препаратах зоны имплантации отсутствовала при использовании ADSCs или DFBs PLA-матриц. Периферическая зона матриц деградировала и замещалась соединительной тканью. Новообразованная соединительная ткань с вросшими в нее сосудами в центральном участке матрицы была сформирована (рисунок, D).

Через 14 суток эксперимента результаты гистологического исследования показали отсутствие достаточного врастания ткани внутрь PLA-матрицы, засеянной клетками, несмотря на результаты культивирования *in vitro*. Отсутствие дополнительных ростовых факторов и недостаточное питание клеток привели к гибели клеток в глубоких слоях матрицы. В отличие от имплантированных бесклеточных PLA-матриц тканеинженерные конструкции обеспечивают врастание сосудов и формирование соединительной ткани по периферии имплантированного материала.

Таким образом, для PLA-матриц, изготовленных методом NM3D®-электропрядения, характерны удов-



Гистологическое исследование бесклеточных (А, В) и засеянных клетками (С, D) PLA-матриц на 7-е (А, С) и 14-е (В, D) сутки после имплантации при глубоком дефекте кожи. Окраска гематоксилином и эозином.

Histology of the PLA cell-free (A, B) and cell-loaded (C, D) scaffolds in 7 (A, C) and 14 (B, D) days after wound replacement. Hematoxylin and eosin staining

ral zones), inflammatory reaction decreased, but large groups of macrophages and leucocytes were visualized in central zones (Figure C).

There was no inflammation around and within ADSCs and DFBs-loaded scaffold in 14 days of observation. Peripheral zone was degraded and replaced by connective tissue. New connective tissue with vessel ingrowth in central zone of cell-loaded scaffolds was formed (Figure D).

Histological findings demonstrated no adequate tissue ingrowth within PLA cell loaded scaffold after 14 days of experiment despite the *in vitro* cell culture results. Lack of additional growth factors and inadequate nutrition led to cell death in a deep zone of scaffold. But, in contrast to cell-free PLA scaffolds, the tissue engineering construct provided the vessel ingrowth and connective tissue development in peripheral sites of the implant.

Thus, the PLA NM3D electrospun scaffold have proper porosity and fiber diameter for building tissue engineering constructs for skin wound replacement. They demonstrated no cell toxicity and provided cell proliferation within 7 days of experiment. The cell-loaded PLA constructs provided the vessel and connective tissue growth but did not offer any specific tissue development in an injured site.



летворительная пористость и достаточный диаметр волокон, что позволяет их использовать для построения тканеинженерных конструкций с целью регенерации глубоких кожных дефектов. Полученные матрицы нецитотоксичны, способствуют клеточной пролиферации в течение 7 суток эксперимента. Засеянные стволовыми клетками PLA-конструкции стимулируют вращание сосудов и соединительной ткани, но не обеспечивают образование специфической ткани в участке поражения.

Литература

1. Bedian L., Rodriguez A.M.V., Vargas G.H. et al. Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – a review. *Int J Biol Macromol* 2017; 98: 837–846.
2. Ceccarelli G., Presta R., Benedetti L. et al. Emerging perspectives in scaffold for tissue engineering in oral surgery. *Stem Cells Int* 2017; 2017: 4585401.
3. Haider A., Haider S., Kang I.-K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arab J Chem* 2015; 8: 1–9.
4. Hosseinpour S., Ghazizadeh A.M., Rezai R.M. et al. Application of selected scaffolds for bone tissue engineering: a systematic review. *Oral Maxillofac Surg* 2017; 21(2): 109–129.
5. Jagur-Grodzinski J. Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies. *Polym Adv Technol* 2006; 17: 395–418.
6. Kitsara M., Agbulut O., Kontziampasis D. et al. Fibers for hearts: A critical review on electrospinning for cardiac tissue engineering. *Acta Biomater* 2017; 48: 20–40.
7. Ngadiman N.H., Noordin M.Y., Idris A. et al. A review of evolution of electrospun tissue engineering scaffold: From two dimensions to three dimensions. *Proc Inst Mech Eng H* 2017; 231(7): 597–616.
8. Zarghami N., Sheervalilou R., Fattahi A. et al. An overview on application of natural substances incorporated with electrospun nanofibrous scaffolds to development of innovative wound dressings. *Mini Rev Med Chem* 2018; 18(5): 414–427.

References

1. Bedian L., Rodriguez A.M.V., Vargas G.H. et al. Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – a review. *Int J Biol Macromol* 2017; 98: 837–846.
2. Ceccarelli G., Presta R., Benedetti L. et al. Emerging perspectives in scaffold for tissue engineering in oral surgery. *Stem Cells Int* 2017; 2017: 4585401.
3. Haider A., Haider S., Kang I.-K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arab J Chem* 2015; 8: 1–9.
4. Hosseinpour S., Ghazizadeh A.M., Rezai R.M. et al. Application of selected scaffolds for bone tissue engineering: a systematic review. *Oral Maxillofac Surg* 2017; 21(2): 109–129.
5. Jagur-Grodzinski J. Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies. *Polym Adv Technol* 2006; 17: 395–418.
6. Kitsara M., Agbulut O., Kontziampasis D. et al. Fibers for hearts: A critical review on electrospinning for cardiac tissue engineering. *Acta Biomater* 2017; 48: 20–40.
7. Ngadiman N.H., Noordin M.Y., Idris A. et al. A review of evolution of electrospun tissue engineering scaffold: From two dimensions to three dimensions. *Proc Inst Mech Eng H* 2017; 231(7): 597–616.
8. Zarghami N., Sheervalilou R., Fattahi A. et al. An overview on application of natural substances incorporated with electrospun nanofibrous scaffolds to development of innovative wound dressings. *Mini Rev Med Chem* 2018; 18(5): 414–427.