

УДК 541.64.02: 611.018.54.082: 616-001.4

О.А. Тихвинская, Е.Ю. Рогульская\*, Н.А. Волкова, В.П. Гришук,  
Е.Б. Ревенко, С.П. Мазур, В.И. Лозинский, Ю.А. Петренко, А.Ю. Петренко

## Макропористые носители на основе плазмы крови как биосовместимые покрытия для восстановления полнослойных эксцизионных ран

UDC 541.64.02: 611.018.54.082: 616-001.4

О.А. Tykhvynska, О.Yu. Rogulska\*, N.O. Volkova, V.P. Grischuk,  
O.B. Revenko, S.P. Mazur, V.I. Lozinsky, Yu.O. Petrenko, O.Yu. Petrenko

## Blood Plasma-Based Macroporous Scaffolds as Biocompatible Coatings to Restore Full-Thickness Excision Wounds

**Ключевые слова:** макропористые носители, биосовместимые покрытия, эксцизионные раны, ранозаживление, плазма крови.

**Ключові слова:** макропористі носії, біосумісні покриття, ексцизійні рани, ранозагоювання, плазма крові.

**Key words:** macroporous scaffolds, biocompatible coatings, excision wounds, wound healing, blood plasma.

Проблема заживления поврежденных обширных участков кожи, несмотря на наличие многочисленных методов лечения, остается актуальной в современной медицине. Репаративная способность кожи человека в отличие от кожи животных существенно ограничена: заживление ран происходит без контракции, а путем эпителизации и формирования грануляционной ткани, что увеличивает сроки, необходимые для восполнения дефекта [4].

Временно выполнять барьерные функции травмированных участков кожных покровов позволяет использование раневых покрытий из различных материалов природного и искусственного происхождения. Они не только способствуют поддержанию нормального водного баланса кожи, но и предотвращают возможность микробной контаминации раны [2]. Кроме того, применяемые материалы могут служить матрицей для пролиферации и дифференцировки клеток, обеспечивающих восстановление целостности поврежденных участков и их нормальное функционирование [1, 6].

Большинство раневых покрытий создаются на основе таких природных биополимеров, как коллаген, гиалуроновая кислота, альгинат, хитозан и фиброин шелка [1, 2]. Перспективно применение матриц на основе плазмы крови, которые не только являются биосовместимыми и биodeградируемыми,

The task of healing the extensive areas of injured skin, despite the numerous therapeutic methods, has still remained relevant in current medicine. The reparative ability of human skin, unlike the animal one, is very limited, *i. e.* the wound healing proceeds without any contraction, but via epithelization and granulation tissue formation resulting in a longer reparation of the defect [4].

The use of wound dressings, derived from various materials of natural and artificial origins enables a temporary recovery of barrier functions of injured skin areas. They not only promote the maintenance of the normal skin water balance, but prevent a possible microbial wound contamination as well [2]. In addition, the applied materials may be the matrix for cell proliferation and differentiation, ensuring the restoration in injured areas and their normal functioning [1, 6].

Most wound dressings are designed on the basis of such natural biopolymers as collagen, hyaluronic acid, alginate, chitosan and silk fibroin [1, 2]. It is promising to apply the blood plasma-based matrices, which are not only biocompatible and biodegradable, but capable to recreate a normal microenvironment for implementing the potential of the own tissues and cells in wound healing as well [3].

This research purpose was to assess the healing features of the full-layer excision wounds in mice using the blood plasma-based macroporous scaffolds.

Відділ кріобіохімії, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:  
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: rogulska.elena@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:  
23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: rogulska.elena@gmail.com

Надійшла 26.01.2018  
Прийнята до друку 19.02.2018

Received January, 26, 2018  
Accepted February, 19, 2018

© 2018 O.Yu. Rogulska 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.

но и позволяют воссоздать нормальное микроокружение для реализации потенциала собственных тканей и клеток при ранозаживлении [3].

Цель настоящей работы – оценка особенностей заживления полнослойных эксцизионных ран у мышей при применении макропористых носителей на основе плазмы крови.

Экспериментальные полнослойные эксцизионные раны кожи выполняли на спинках 5–6 месячных мышей-самцов линии Balb/c. Эксперименты были проведены в соответствии с Законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№ 3447-IV от 21.02.2006 г.) при соблюдении требований Комитета по биоэтике Института, согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Раны наносили до фасции с помощью дермопанча («Medax», Германия) диаметром 6 мм под общим наркозом (2%-й раствор седизина и 1%-й раствор пропофола). Для воссоздания картины заживления дефектов кожных покровов, характерной для человека, использовали модифицированную нами модель шинированных эксцизионных кожных ран мышей, обеспечивающую предотвращение контракции краев ран [7].

Для изучения процесса заживления эксцизионных ран в присутствии носителей на основе плазмы крови ( $n = 10$ ) применяли полимерные макропористые матрицы, полученные криогелированием смеси плазмы крови с 5,2 мМ мочевиной и 0,04 мМ L-цистеином [5]. Трехмерные носители имели разветвленную широкопористую структуру с сечением пор от 100 до 250 мкм. Матрицы толщиной 100 мкм и диаметром 5 мм стерилизовали этиловым спиртом, а перед помещением в полость раны отмывали раствором Хенкса. Контролем служили самостоятельно заживающие эксцизионные раны ( $n = 10$ ).

Процесс заживления экспериментальных и контрольных ран оценивали макроскопическим, планиметрическим и гистологическим методами на 3-и, 7-, 14-и 28-е сутки. Площадь ран в ходе планиметрических исследований измеряли на фотоснимках с использованием программы «ImageJ» (National Institutes of Health, США).

Для проведения гистологических исследований кожные лоскуты из области раны иссекали, фиксировали в 10%-м растворе забуференного формалина и заключали в среду «TissueTec» («O.C.T. Compound», Великобритания). Срезы толщиной 5–6 мкм получали на криотоме «Slee Cryostat MEV» («Slee Medical GmbH», Германия). После окрашивания срезов по стандартной методике гематоксилином и эозином полученные гистологические препараты изучали с помощью светового микроскопа, оборудованного

The experimental full-thickness excision skin wounds were made on the backs of 5–6-month-old male Balb/c mice. Experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine ‘On the Protection of Animals Against Cruelty’ (№ 3447-IV of February 21, 2006), following the requirements of the Committee in Bioethics of the Institute, agreed with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The wounds were excised to the fascia with a 6 mm biopsy punch (Medax, Germany) under general anesthesia (2% Sedazin and 1% Propofolium solutions). To reconstruct the human inherent healing pattern of skin defects we used our modified model of splinted excision skin wounds in mice, preventing the wound edge contraction [7].

To study the excision wound healing process in the presence of the blood plasma-based scaffolds ( $n = 10$ ), we applied the polymeric macroporous matrices, obtained by cryogelling a mixture of blood plasma with 5.2 mM urea and 0.04 mM L-cysteine [5]. The 3D scaffolds had a branched wide-porous structure with a pore cross section from 100 to 250  $\mu\text{m}$ . The matrices of 100  $\mu\text{m}$  thick and 5 mm diameter were sterilized with ethyl alcohol, and washed with Hanks solution before placing into a wound cavity. The self-healing excision wounds served as the control ( $n = 10$ ).

The healing process of experimental and control wounds was assessed by macroscopic, planimetric and histological methods to days 3, 7, 14 and 28. The wound area during planimetric studies was measured from photographs using the ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

For histological examination, the cutaneous flaps from the wound area were excised, fixed in a 10% buffered formalin solution and embedded into the Tissue-Tec medium (O.C.T. Compound, UK). The 5–6  $\mu\text{m}$  thick sections were obtained with the Slee Cryostat MEV cryotome (Slee Medical GmbH, Germany). After staining the sections according to the standard technique with hematoxylin and eosin, the obtained histological preparations were examined using a light microscope equipped with a digital camera DCM300 with a photo / video output XSP-139TP (JNOEC, Japan–China).

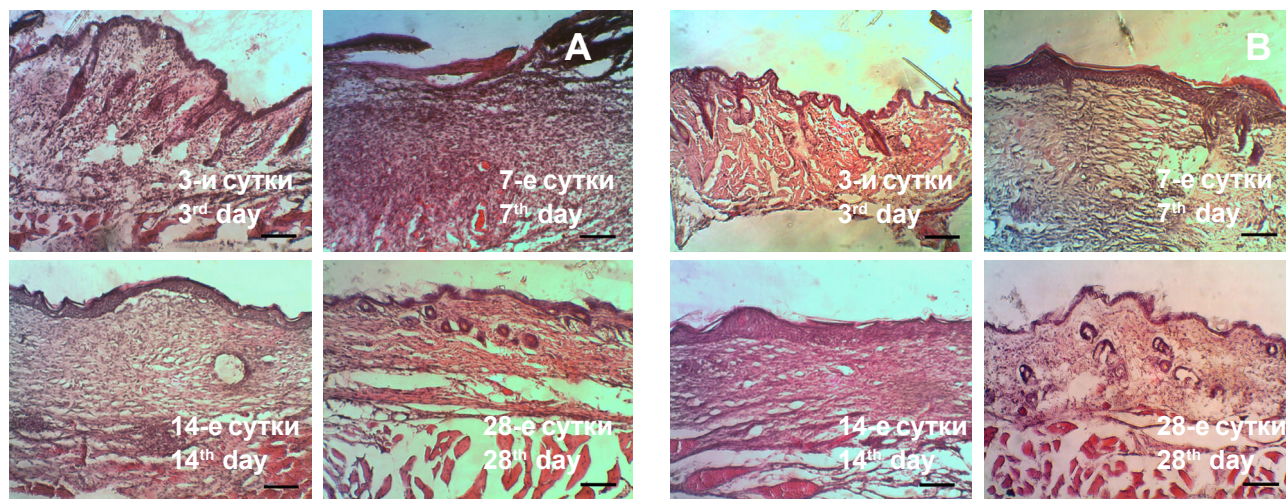
The quantitative data distribution was evaluated by the Shapiro-Wilk test, and Mann-Whitney criterion was used to confirm the significance of differences between the samples. The differences were considered as significant if  $p < 0.05$ .

The general condition of mice with the control and experimental excision wounds was satisfactory within all the observation terms, the animals had a good appetite and high motor activity.

цифровой камерой DCM300 с фото/видео выходом «XSP-139TP» («JNOEC», Япония–Китай).

Распределение количественных данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка, а для подтверждения значимости отличий между выборками применяли критерий Манна-Уитни. Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

During visual examination to day 3 of observation the wound surface in the experimental group animals was whitish with clearly outlined contours of the blood plasma-based macroporous scaffold (BPMS), the bottom of the control wounds was pinkish. A small amount of exudate was noted in both wound groups.



**Рис. 1.** Гистологическая картина заживления полнослойных эксцизионных кожных ран у мышей: **А** – самостоятельное заживление; **В** – внесение МНПК (3-и сутки – срез подлежащих тканей, 7-, 14- и 28-е сутки – зона раневого дефекта). Окраска гематоксилином и эозином. Масштабная линейка – 100 мкм.

**Fig. 1.** Histological picture of full-thickness excision skin wound healing in mice: **A** – self-healing; **B** – BPMS application (day 3 – section of underlying tissues; days 7, 14 and 28 – wound defect area). H&E staining. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .

Общее состояние мышей с контрольными и экспериментальными эксцизионными ранами во все сроки наблюдения было удовлетворительным, животные имели хороший аппетит и высокую двигательную активность.

При визуальном осмотре на 3-и сутки наблюдения поверхность ран у животных экспериментальной группы была белесой с отчетливо очерченными контурами макропористого носителя на основе плазмы крови (МНПК), дно контрольных ран было розоватым. В обеих группах ран отмечалось незначительное количество экссудата.

На 7-е сутки заживления в ранах обеих групп был сформирован светлый ободок краевого эпителия, имевший различную ширину. При этом в ранах экспериментальной группы визуально определялись матрицы из плазмы крови, хотя их размер был существенно меньше по сравнению с предыдущим сроком наблюдения.

К 14-м суткам все раны практически полностью зажили. Визуально закрытые раневые дефекты располагались ниже уровня окружающих тканей, что было особенно выражено в ранах с самостоятельным заживлением.

To day 7 of healing a bright rim of marginal epithelium with different width was formed in wounds of both groups. Herewith in the wounds of experimental group, there were visualized the matrices from blood plasma, although their size was significantly less as compared with that in previous observation term.

To day 14 all the wounds were almost completely healed. The closed (by visual control) wounds were located below the level of surrounding tissues, which was especially pronounced in wounds with self-healing.

To day 28 of observation, at the site of self-healing wounds and with applied BPMS, the hair coat was restored.

The findings of planimetric studies allowed establishing the rate of wound closure in experimental and control groups as not different (Fig. 1). To day 3 the area of wound surface reduced by 18–19%, and to day 7 it did by 41%. To day 14 of observation, quite a complete epithelialization was observed in wounds of both groups.

The histological examination of wounds in the control group to day 3 demonstrated the wound defect filling with fibrin, the wound bottom was filled with necrotic



К 28-м суткам наблюдения на месте ран с самостоятельным заживлением и при применении МНПК восстановился шерстный покров.

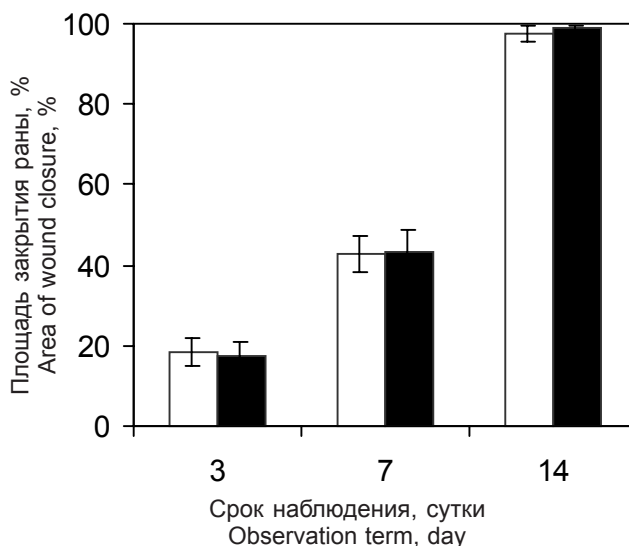
Результаты планиметрических исследований позволили установить, что скорость закрытия ран в экспериментальной и контрольной группах не отличалась (рис. 1). На 3-и сутки площадь раневой поверхности сокращалась на 18–19%, а к 7-м суткам – на 41%. На 14-е сутки наблюдения в ранах обеих групп отмечалась практически полная эпителизация.

При гистологическом изучении ран контрольной группы на 3-и сутки отмечалось заполнение раневого дефекта фибрином, дно раны заполнено некротическими тканями, а сосуды в подлежащих тканях были расширены и полнокровны (рис. 2). В окружающих рану тканях выявлялась диффузная воспалительная инфильтрация полиморфоядерными лейкоцитами, что свидетельствовало о нормальном течении фазы воспаления. На этом же сроке наблюдения в экспериментальной группе в зоне дефекта определялась пористая структура МНПК с ячейками, обрастающими фибробластоподобными клетками, при практически полном отсутствии признаков воспалительной реакции.

На 7-е сутки при самостоятельном заживлении ран наблюдались подрастание краевого эпителиального пласта под струп и формирование ранней грануляционной ткани, основу которой составляли новообразованные сосуды капиллярного типа. В группе с применением МНПК также отмечались активная пролиферация молодых соединительнотканых клеток и формирование тонкостенных сосудов, заполненных эритроцитами.

На 14-е сутки в ранах обеих групп продолжалось формирование грануляционной ткани с преобладанием клеток фибробластического ряда, синтезирующих коллаген. Макропористый носитель полностью деградировал и замещался новообразованными и мигрировавшими в зону дефекта клетками.

К 28-м суткам эксперимента в группе ран с самостоятельным заживлением сформированная соединительная ткань преобразовалась в плотную рубцовую, что подтверждалось наличием грубых и хаотично расположенных пучков коллагеновых волокон. Эпидермис был несколько утолщен, а его микрорельеф сглажен по сравнению с нативной кожей, в собственно дерме сформировались дериваты кожи – волосяные фолликулы и сальные железы. Соединительная ткань, заполнившая раневой дефект ран экспериментальной группы, преобразовалась в рыхлую рубцовую ткань с упорядоченно ориентированными нежными коллагеновыми волокнами. Эпидермис имел нормальный микрорельеф, отмечалось наличие многочисленных дериватов кожи, что свидетельствовало о гистотипическом характере заживления раневого дефекта.



**Рис. 2.** Закрытие эксцизионных ран в разные сроки наблюдения при самостоятельном заживлении (□) и внесении МНПК (■).

**Fig. 2.** Excision wound closure at different observation terms in self-healing (□) and BPMS application (■).

tissues, and the vessels in underlying tissues were enlarged and full-blooded (Fig. 2). In the tissues surrounding the wound there was revealed a diffuse inflammatory infiltration with polymorphonuclear leukocytes, which testified to a normal course of inflammatory phase. A porous structure of BPMS with the wells, covered with fibroblast-like cells, was determined in the defect area in the experimental group at the same observation term, under virtually no signs of inflammatory reaction.

To day 7 under wound self-healing there were observed the growth of marginal epithelial layer under scab and formation of an early granulation tissue, the basis of which were the newly formed vessels of capillary type. In the group with BPMS application, an active proliferation of young connective tissue cells and the formation of thin-walled vessels filled with erythrocytes were also noted.

To day 14 in the wounds of both groups the formation of granulation tissue was in progress, with predominance of fibroblast-like cells, synthesizing collagen. A macroporous scaffold was completely degraded and replaced by newly formed cells migrating towards the defect area.

To day 28 of the experiment in the group of self-healing wounds the formed connective tissue was transformed into a dense scar tissue, that was confirmed by the presence of coarse and chaotically arranged bundles of collagen fibers. The epidermis was slightly thickened, and its surface was smoother as compared with the intact skin, the dermis contained the skin appendages: hair follicles and sebaceous glands. In the animals of experimental group the connective tissue,

Таким образом, применение МНПК не влияло на скорость эпителизации эксцизионных ран, но способствовало более полноценному их восстановлению по сравнению с самостоятельным заживлением. Поскольку трехмерные матрицы на основе плазмы крови оказывают позитивное действие на раневой процесс в экспериментальных ранах, а благодаря макропористой структуре служат средством доставки лекарственных средств и клеток, то сфера их применения в клеточной терапии может быть существенно расширена.

### Литература

1. Clark R.A.F., Ghosh K., Tonnesen M.G. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 2007; 127(5): 1018–1029.
2. Dhivya S., Vijaya V., Santhini E. Wound dressings – a review. *BioMedicine* 2015; 5(4): 24–28.
3. Houdek M.T., Wyles C.C., Stalboerger P.G. et al. Collagen and fractionated platelet-rich plasma scaffold for dermal regeneration. *Plast Reconstr Surg* 2016; 137(5): 1498–506.
4. Isakson M., Blacam C., Whelan D. et al. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: current evidence and future potential. *Stem Cells Int* 2015; 2015: 1–12.
5. Lozinsky V.I., Galaev I.Yu., Plieva F.M. et al. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnol* 2003; 21(10): 445–451.
6. Rustad K.C., Wong V.W., Sorkin M. et al. Biomaterials enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. *Biomaterials* 2012; 33(1): 80–90.
7. Tykhvynskaya O.A., Rogulska O.Y., Volkova N.A. et al. The effect of human adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in the fibrin gel on the healing of full-thickness skin excision wounds in mice. *Cell Organ Transplantology* 2017; 5(1): 14–20.

which filled the wound defect was transformed into a loose scar tissue with well-ordered, soft collagen fibers. The epidermis had a normal surface, there was noted the presence of numerous skin appendages, indicating thereby a histotypic character of wound defect healing.

Thus, the use of BPMS had no effect on epithelialization rate of excision wounds, but contributed to their more complete recovery, if compared with self-healing. Since the 3D blood plasma-based matrices positively affect the wound process in experimental wounds, and due to their macroporous structure they may serve as a means of drug and cell delivery, the scope of their application in cell therapy can be strongly extended.

### References

1. Clark R.A.F., Ghosh K., Tonnesen M.G. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 2007; 127(5): 1018–1029.
2. Dhivya S., Vijaya V., Santhini E. Wound dressings – a review. *BioMedicine* 2015; 5(4): 24–28.
3. Houdek M.T., Wyles C.C., Stalboerger P.G. et al. Collagen and fractionated platelet-rich plasma scaffold for dermal regeneration. *Plast Reconstr Surg* 2016; 137(5): 1498–506.
4. Isakson M., Blacam C., Whelan D. et al. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: current evidence and future potential. *Stem Cells Int* 2015; 2015: 1–12.
5. Lozinsky V.I., Galaev I.Yu., Plieva F.M. et al. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnol* 2003; 21(10): 445–451.
6. Rustad K.C., Wong V.W., Sorkin M. et al. Biomaterials enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. *Biomaterials* 2012; 33(1): 80–90.
7. Tykhvynskaya O.A., Rogulska O.Y., Volkova N.A. et al. The effect of human adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in the fibrin gel on the healing of full-thickness skin excision wounds in mice. *Cell Organ Transplantology* 2017; 5(1): 14–20.

