



УЛЬТРАЗВУКОВАЯ ОЦЕНКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТНОГО НАПОЛНИТЕЛЯ ПО ОБЪЕМУ НАБУХШИХ ПОРИСТЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

О.Р. Куликова^{1*}, Е.А. Храмцова¹, К.Г. Антипова², Т.Д. Пацаев², Е.С. Мороков¹,
К.И. Луканина², В.М. Левин¹, Т.Е. Григорьев²

¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
119334, Российская Федерация, Москва, ул. Косыгина, 4

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»
123182, Российская Федерация, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Регенеративная медицина — быстро развивающаяся междисциплинарная область. Основным интересом представляют новые материалы и механизмы их взаимодействия с живым организмом. Методы исследования изучаемых объектов должны обеспечивать как объёмную визуализацию, так и предоставлять оценку количественных характеристик неинвазивно. Перспективными для этих целей являются методы, основанные на применении ультразвука и отображающие вариации упругих свойств образцов.

Ключевые слова: пористый матрикс, хитозан, композит, акустическая микроскопия

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности: пористые матриксы на основе хитозана разработаны в рамках ВНИР НИЦ «Курчатовский институт», ультразвуковые исследования проведены при поддержке гранта РФФИ № 20-33-70095.

Для цитирования: Куликова О.Р., Храмцова Е.А., Антипова К.Г., Пацаев Т.Д., Мороков Е.С., Луканина К.И., Левин В.М., Григорьев Т.Е. Ультразвуковая оценка распределения трикальцийфосфатного наполнителя по объёму набухших пористых матриксов на основе хитозана для биомедицинского применения. *Биомедицина*. 2021;17(3E):42–47. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-42-47>

Поступила 16.04.2021

Принята после доработки 13.05.2021

Опубликована 20.10.2021

ULTRASONIC ASSESSMENT OF THE DISTRIBUTION OF TRICALCIUM PHOSPHATE FILLER OVER THE VOLUME OF SWOLLEN POROUS MATRICES BASED ON CHITOSAN FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Olga R. Kulikova^{1*}, Elena A. Khramtsova¹, Kristina G. Antipova², Timofey D. Patsaev²,
Egor S. Morokov¹, Ksenia I. Lukanina², Vadim M. Levin¹, Timofey E. Grigoriev²

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences
119334, Russian Federation, Moscow, Kosyгина Str., 4

² National Research Center “Kurchatov Institute”
123098, Russian Federation, Moscow, Akademika Kurchatova Square, 1

Regenerative medicine is a rapidly developing interdisciplinary field of science. Of primary interest are new materials and mechanisms of their interaction with living organisms. Investigation methods should

provide 3D visualization and analysis of quantitative characteristics, while having no effect on the objects under study. For these purposes, methods based on ultrasound and those displaying variations in the elastic properties of samples are promising.

Keywords: porous matrix, chitosan, composite, acoustic microscopy

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements: porous matrices based on chitosan were developed by NRC «Kurchatov Institute». Ultrasound studies were carried out with the support of the RFBR Grant No. 20-33-70095.

For citation: Kulikova O.R., Khramtsova E.A., Antipova K.G., Patsaev T.D., Morozov E.S., Lukanina K.I., Levin V.M., Grigoriev T.E. Ultrasonic Assessment of the Distribution of Tricalcium Phosphate Filler over the Volume of Swollen Porous Matrices Based on Chitosan for Biomedical Applications. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):42–47. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-42-47>

Submitted 16.04.2021

Revised 13.05.2021

Published 20.10.2021

Введение

В регенеративной медицине проведённые в мировой практике экспериментальные ультразвуковые исследования показали свою эффективность [4, 6, 7]. Биосинтетические матрицы при одинаковом составе биополимеров могут быть сформованы различными методами, что позволяет применять их для замещения целого ряда дефектов тканей. Перспективными являются матрицы, имеющие структуру гидрогелей, что связано не только с их доступностью и разнообразием, но и возможностью создания раневых покрытий [3], применения в ортопедии для замены и восстановления утраченной части хряща, костной ткани [1], а также использования как несущей конструкции активных матриц, содержащих клетки, факторы роста, лекарственные препараты. Гидрогелевые матрицы, их структура и упруго-механические свойства были исследованы ультразвуковыми методами [2, 5, 8].

Гидрогелевые матрицы на основе хитозана, кроме биосовместимости и биорезорбируемости, обладают остеокондуктивными свойствами, т. е. выполняют роль пассивного матрикса при формировании костной ткани, композиты на его основе активно применяются для создания костных имплантов [9]. При этом особый интерес в этой области представляют матрицы,

имеющие открытые поры, которые обеспечивают проникновение клеток в объём имплантата и неоваскуляризацию. Улучшить свойства матрикса можно за счёт добавления остеоиндуктивных факторов роста, например BMP-2, которые будут стимулировать биоминерализацию имплантата [10].

В данной работе был смоделирован процесс биоминерализации пористого матрикса на основе хитозана, за счёт разной степени наполнения минеральными компонентами, для определения возможностей метода акустической микроскопии в визуализации структуры и оценке состава такого типа матриц.

Материалы и методы

Изготовление матриц. Предварительно получен 2% р-р хитозана (Primex ChitoClear HQG 43040 — 600 кДа) в 2% уксусной кислоте (УК, особо чистая, ООО «Компонент-Реактив», Россия). Объёмная доля наполнителя — трикальцийфосфат (ТКФ, «Sigma Aldrich», США) — варьировалась в пределах от 1 до 25 об.%. Для улучшения механических свойств образцы шивали 2,5% глутаровым альдегидом (ГА) в 2% УК (из расчёта 1% от веса полимера). Пористость получаемого материала поддерживали на уровне 98,8%. Для получения композитов компоненты смешивали с частицами ТКФ (диаметр частиц — 70 нм, высота — 200 нм) в пропорциях из таблицы.

Таблица. Концентрации компонент для получения композитов
Table. Concentrations of components for obtaining composites

Объёмная доля ТКФ, %	Массовая доля ТКФ, %	ТКФ, г	2% хитозан, г	2,5% ГА, г	H ₂ O, г
0	0	0	7,80	0,06240	2,17360
5	12,71	0,01884	7,41	0,05928	2,55892
10	26,84	0,03768	7,02	0,05616	2,94424
25	80,51	0,0942	5,85	0,04680	4,10020

Растворы гомогенизировали на магнитной мешалке в течение 6 ч. Для более равномерного диспергирования частиц ТКФ полимерный раствор помещали в ультразвуковую ванну на 30 мин. Гомогенизированные растворы замораживали на установке, обеспечивающей температурный градиент, для формирования направленных пор в материале. Замороженные образцы лиофилизировали в течение 48 ч на установке Martin Christ Alpha 2-4LSC в режиме «main-drying» с глубиной вакуума 0,250 мбар. За 2 ч до извлечения образцов использовали режим «final drying» с глубиной вакуума 0,010 мбар. Таким образом, были получены высокопористые композиты с ориентированными порами.

Морфологию образцов изучали методом сканирующей электронной микроскопии с помощью системы Versa 3D DualBeam («FEI», США) в режиме высокого вакуума. Изображения получали во вторичном электронном режиме с ультранизким ускоряющим напряжением 1 кВ. Образцы ориентировали вдоль направления пор.

В работе использовался сканирующий импульсный акустический микроскоп SIAM-2010, разработанный в Институте биохимической физики РАН, оснащённый линзой 50 МГц, 30°, фокусное расстояние — 4 мм, обеспечивающей латеральное разрешение порядка 36 мкм. Режим получения изображений: С-скан — реконструкция изображения плоскости образца, перпендикулярной оси линзы, и расположенной в зоне фокуса при сканировании; В/D-скан — реконструкция изображения, соответствующая поперечному сечению через образец по направлению оси линзы и полученная при использовании динамической фокусировки во время сканирования.

Статистический анализ проводился с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Полученные микрофотографии показывают ячеистую структуру и наличие ориентации пор у образцов. Средний размер пор — 30 мкм. На рис. 1 видны включения частиц ТКФ в стенку губчатого материала.

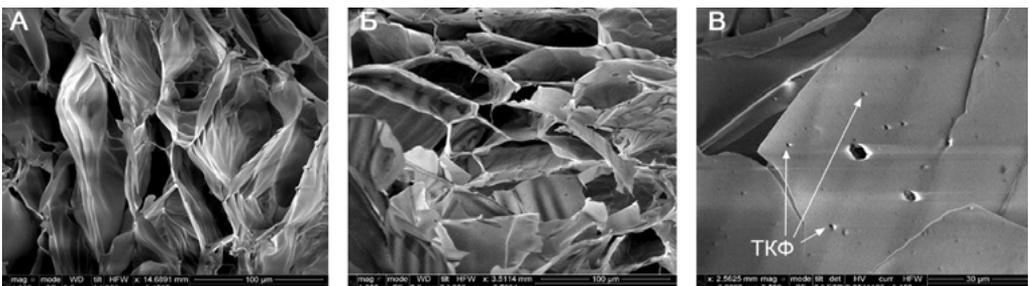


Рис. 1. Микрофотографии образцов губчатых матриц: А — объёмная доля ТКФ 0%, разрешение 100 мкм; Б — объёмная доля 20%, разрешение 100 мкм; В — объёмная доля 20%, разрешение 30 мкм.

Fig. 1. Micrographs of porous matrices: А — volume fraction of TCP 0%, resolution 100 μm ; Б — volume fraction 20%, resolution 100 μm ; В — volume fraction 20%, resolution 30 μm .

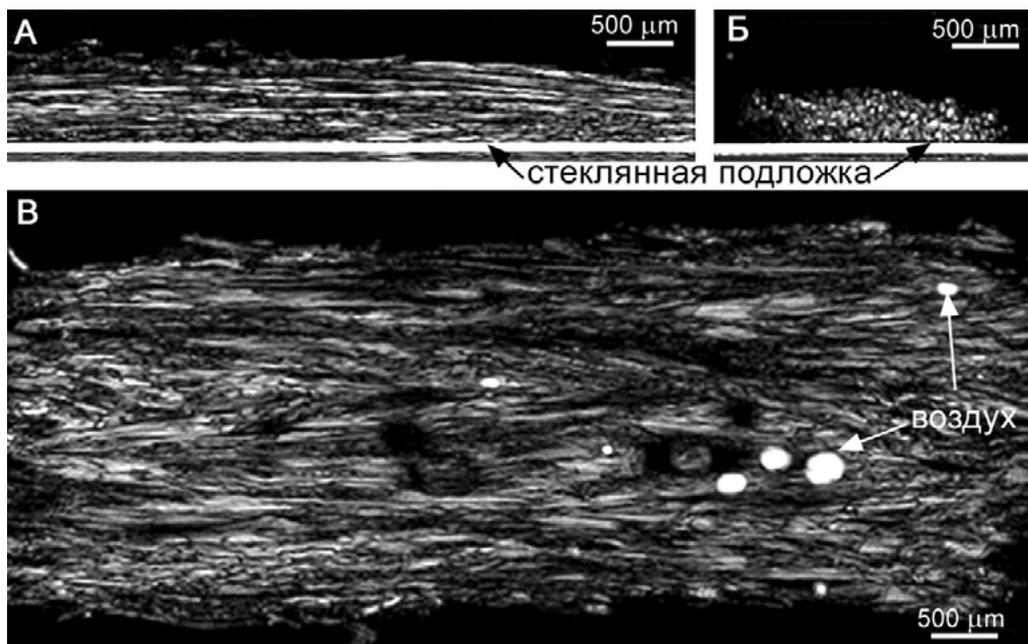


Рис. 2. Акустические изображения набухшего матрикса, частота 50 МГц. А — В/D-скан, продольное сечение пор; Б — В/D-скан, поперечное сечение пор; В — С-скан в объёме образца.

Fig. 2. Acoustic images of swollen matrices, frequency 50 MHz. А — В/D-scan along pores; Б — В/D-scan cross-section of pores; В — С-scan of the sample volume.

Полученные образцы исследовали с помощью акустической микроскопии после набухания в иммерсионной жидкости (дистиллированной воде). Образец располагался на стеклянной подложке для последующего измерения затухания.

Ультразвуковые изображения (рис. 2) отображают внутреннюю структуру матрикса: поры матрикса протяжённые, интеркалированные, открытые, ориентированы в одном направлении, заполнены иммерсией. На тех же образцах были проведены измерения коэффициента затухания.

Выводы

Разрешение метода является недостаточным для визуализации включений частиц ТКФ, однако не менее информативным является анализ объёмных характеристик. Была проведена ультразвуковая оценка распределения наполнителя по объёму образца

матрикса. Выявлена закономерность затухания ультразвукового сигнала в зависимости от концентрации наполнителя в композитном матриксе.

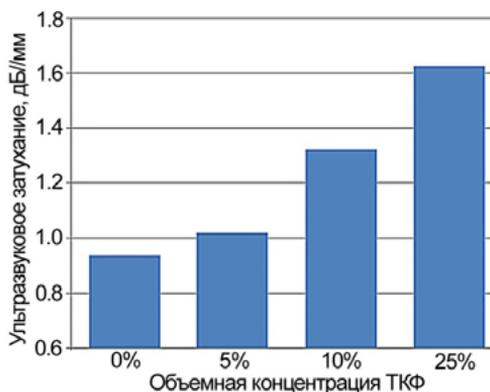


Рис. 3. Зависимость коэффициента затухания, нормированная по толщине образцов, в зависимости от количества наполнителя.

Fig. 3. The attenuation coefficient, normalized by the sample thickness, depending on the amount of filler.

Ультразвуковая микроскопия показала высокую эффективность для неинвазивной визуализации микроструктуры и количественного определения концентрации ТКФ в полученных пористых матриксах.

Данный метод может быть рекомендован как перспективный для исследования процессов биоминерализации матриц в присутствии клеточных компонентов и остеоиндуктивных факторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Grigoriev T.E., Zagoskin Y.D., Belousov S.I., et al. Influence of molecular characteristics of chitosan on properties of *in situ* formed scaffolds. *BioNanoSci.* 2017;7:492–495. DOI: 10.1007/S12668-017-0411-5.
2. Gudur M., Rao R.R., Hsiao Y.S., Peterson A.W., Deng C.X., Stegemann J.P. Noninvasive, quantitative, spatiotemporal characterization of mineralization in three-dimensional collagen hydrogels using high-resolution spectral ultrasound imaging. *Tissue engineering.* 2012;18(12):935–946. DOI: 10.1089/ten.TEC.2012.0180.
3. Gumenyuk A., Ushmarov D., Gumenyuk S., Gayvoronskaya T., Sotnichenko A., Melkonyan K., Manuylov A., Antipova K., Lukanina K., Grigoriev T., Domenyuk D. Potential use of chitosan-based multilayer wound covering in dental practice. *Archiv Euromedica.* 2019;9(3):76–80.
4. Khrantsova E., Morokov E., Lukanina K., Grigoriev T., Petronyuk Y., Shepelev A., Gubareva E., Kuevda E., Levin V., Chvalun S. Impulse acoustic microscopy: A new approach for investigation of polymer and natural scaffolds: Impulse Acoustic Microscopy. *Polymer Engineering and Science.* 2017;57(7):709–715. DOI: 10.1002/pen.24617.
5. Mansour J.M., Gu D.W., Chung C.Y., Heebner J., Althans J., Abdalian S., Schluchter M.D., Liu Y., Welter J.F. Towards the feasibility of using ultrasound to determine mechanical properties of tissues in a bioreactor. *Annals of biomedical engineering.* 2014;42(10):2190–2202. DOI: 10.1007/s10439-014-1079-4.
6. Morokov E., Khrantsova E., Kuevda E., Gubareva E., Grigoriev T., Lukanina K., Levin V. Noninvasive ultrasound imaging for assessment of intact microstructure of extracellular matrix in tissue engineering. *Artificial Organs.* 2019;43(11):1104–1110. DOI: 10.1111/aor.13516.
7. Morokov E.S., Demina V.A., Sedush N.G., Kalinin K.T., Khrantsova E.A., Dmitryakov P.V., Bakirov A.V., Grigoriev T.E., Levin V.M., Chvalun S.N. Noninvasive high-frequency acoustic microscopy for 3D visualization of microstructure and estimation of elastic properties during hydrolytic degradation of lactide and ϵ -caprolactone polymers. *Acta Biomaterialia.* 2020;109:61–72. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.04.011.
8. Ruland A., Chen X., Khansari A., Fay C.D., Gambhir S., Yue Z., Wallace G.G. A contactless approach for monitoring the mechanical properties of swollen hydrogels. *Soft matter.* 2018;14(35):7228–7236. DOI: 10.1039/c8sm01227j.
9. Vasilyev A.V., Kuznetsova V.S., Bukharova T.B., Grigoriev T.E., Zagoskin Y., Korolenkova M.V., Zorina O.A., Chvalun S.N., Goldstein D.V., Kulakov A.A. Development prospects of curable osteoplastic materials in dentistry and maxillofacial surgery. *Heliyon.* 2020;6(8):e04686. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04686.
10. Vasilyev A.V., Kuznetsova V.S., Bukharova T.B., Grigoriev T.E., Zagoskin Y.D., Nedorubova I.A., Babichenko I.I., Chvalun S.N., Goldstein D.V., Kulakov A.A. Influence of the degree of deacetylation of chitosan and BMP-2 concentration on biocompatibility and osteogenic properties of BMP-2/PLA granule-loaded chitosan/ β -glycerophosphate hydrogels. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2021;26(2):261. DOI: 10.3390/molecules26020261.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Куликова Ольга Режаббаевна*, ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
e-mail: olga.kulikova.2012@list.ru

Храмцова Елена Александровна, к.б.н., ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
e-mail: alyonushk@gmail.com

Olga R. Kulikova*, Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: olga.kulikova.2012@list.ru

Elena A. Khrantsova, Cand. Sci. (Biol.), Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: alyonushk@gmail.com

Антипова Кристина Георгиевна, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;
e-mail: kris444ti@yandex.ru

Kristina G. Antipova, National Research Center “Kurchatov Institute”;
e-mail: kris444ti@yandex.ru

Пацаев Тимофей Дмитриевич, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;

Timofey D. Patsaev, National Research Center “Kurchatov Institute”

Мороков Егор Степанович, к.ф.-м.н., ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
e-mail: es_morokov@yahoo.com

Egor S. Morokov, Cand. Sci. (Phys.-Math.), Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: es_morokov@yahoo.com

Луканина Ксения Игоревна, к.т.н., Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;
e-mail: lukanina_ki@nrcki.ru

Ksenia I. Lukanina, Cand. Sci. (Tech.), National Research Center “Kurchatov Institute”;
e-mail: lukanina_ki@nrcki.ru

Левин Вадим Моисеевич, к.ф.-м.н., ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
e-mail: levin1943@gmail.com

Vadim M. Levin, Cand. Sci. (Phys.-Math.), Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: levin1943@gmail.com

Григорьев Тимофей Евгеньевич, к.ф.-м.н., Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;
e-mail: grigoriev@nrcki.ru

Timofey E. Grigoriev, Cand. Sci. (Phys.-Math.), National Research Center “Kurchatov Institute”;
e-mail: grigoriev@nrcki.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author