

Импульсная ультразвуковая микроскопия материалов и объектов тканевой инженерии

Е. А. Храмцова^{1,*}, Е. С. Мороков^{1,†}, Т. Е. Григорьев^{2,3}, Е. А. Губарева⁴,
А. С. Сотниченко⁴, Е. В. Кувейда⁴, В. М. Левин¹, Ю. С. Петронюк⁵

¹Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН
Россия, 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4

²Национальный научно-исследовательский центр «Курчатовский Институт»
Россия, 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

³Институт элементоорганических соединений имени А. Н. Несмеянова РАН
Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 28

⁴Кубанский государственный медицинский университет. Россия, 350063, Краснодар, ул. Седина, д. 4

⁵Научно-технологический центр уникального приборостроения РАН. Россия, 117342, Москва, ул. Бутлерова, д. 15
(Статья поступила 04.07.2017; Подписана в печать 13.09.2017)

В работе представлены результаты экспериментального изучения возможностей применения импульсной акустической микроскопии для неинвазивной характеристики материалов и объектов тканевой инженерии. Изучены особенности визуализации акустическими методами нетканого матрикса, выполненного из тонких синтетических волокон полисульфона диаметром 4–8 мкм, а также нетканого материала на основе хитозана с толщиной волокон 100–400 нм. Предложены ультразвуковые методики для наблюдения объемной микроструктуры натуральных тканевых матриксов, получаемых удалением клеточного содержимого из органов-доноров. Для отображения распределения мелкомасштабных структурных элементов в поперечных сечениях образцов тканевых матриксов развиты методики визуализации с применением динамической фокусировки внутри объекта и последующего полутонного отображения структуры — B/D (*brightness–depth*) методика. Результаты исследования позволяют предложить недоступные ранее методики характеристики объемной архитектуры материалов, используемых для создания тканевых матриксов, в т. ч. для оценки ориентированности волокон, степени их смачиваемости водными растворами, оценки размеров и структуры пор, ячеек матрикса.

PACS: 43.35.Yb; 61.25.Nq; 87.80.Rb; 87.85.jf

УДК: 534.8, 539.2

Ключевые слова: акустическая микроскопия, децеллюляризованные легкие, матрикс, нетканый материал, полисульфон, регенеративная медицина, хитозан.

ВВЕДЕНИЕ

Регенеративная медицина является быстро развивающейся и перспективной отраслью современного здравоохранения и требует дополнительных материалов и методов в смежных областях, таких, например, как биохимия, физика полимеров и т. д. в регенеративной медицине ведутся постоянные разработки и доклинические испытания новых материалов и методик, а также возникает необходимость в новых методах контроля на всех этапах создания тканеинженерного продукта от разработки матрикса заканчивая постимплантационным контролем. Главным требованием к методам и диагностическим приборам является их неинвазивность. Разработка таких методов поможет быстрее и качественнее создавать новые материалы и включать полученные образцы в доклинические и клинические исследования.

Целью данной работы является анализ применимости классических методов акустической микроскопии в области тканевой инженерии, а так же разработка и анализ новых режимов исследования биологических

тканей применительно к объектам регенеративной медицины. Ультразвук легко проникает в толщу плотных непрозрачных объектов, поэтому методы акустической микроскопии применяются для изучения не только поверхности объекта, но и его внутренней микроструктуры. Акустические изображения формируются на основе вариаций пространственных упругих свойств различных структурных элементов вещества или биологической ткани. Контраст, основанный на вариациях упругих свойств, выражен в большей степени, чем различия физической или оптической плотности. Поэтому качественные акустические изображения можно получать без предварительной фиксации, обезживания, контрастирования, окраски и других процедур, без которых невозможно изучение биоматериала в оптическом или электронном микроскопе. Неинвазивность метода является критическим моментом в регенеративной медицине, т. к. применяются высокотехнологичные дорогостоящие материалы и эксперименты проводятся в условиях ограниченного количества экспериментальных животных на продолжительном временном отрезке.

*E-mail: alyonushk@gmail.com

†E-mail: es_morokov@yahoo.com

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках работы были исследованы синтетические нетканые матриксы на основе полисульфона и хитозана, полученные методом электроспиннинга, представляющие собой нетканые маты из пересекающихся волокон, а так же образцы децеллюляризованных легких крысы.

Полисульфон представляет собой синтетический аморфный гидрофобный полимер, с высокими термическими, электрическими и механическими свойствами [1]. Средний диаметр волокон полученного нетканого материала 4.3 мкм, плотность упаковки 3%, толщина образца 1.5 мм.

Хитозан — полисахарид, основным источником которого является хитин, второй по степени распространенности природный полимер после целлюлозы. Хитозану присуща биосовместимость, биodeградируемость, отсутствие токсичности на фоне высокой биологической и сорбционной активности [2]. Средний диаметр волокон полученного нетканого материала 250 нм, плотность упаковки 20%, толщина образца 120 мкм.

Децеллюляризованные образцы легких крысы были получены детергентно-энзиматическим методом, описанным в статье [3].

Электроспиннинг

Суть метода электроформования заключается в образовании жидкого волокна из полимерного раствора. в качестве коллектора используется подвижный диск, совершающий вращательные движения. Отличительной особенностью электроспиннинга является то, что процесс осуществляется в одну стадию и на приемном электроде сразу формируется готовый материал [2].

Ультразвуковые исследования

Для ультразвуковых исследований использовался сканирующий импульсный акустический микроскоп SIAM-2 модель 2009-2011, разработанный в лаборатории акустической микроскопии Института биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН, с акустической линзой на рабочей частоте 100 МГц и угловой апертурой 11°. Фокусное расстояние данной линзы в иммерсии составляет 5.5 мм, фокальное пятно диаметром 40 мкм, длина фокальной перетяжки 0.9 мм. в качестве иммерсионной жидкости для сканирования во всех экспериментах использовалась бидистиллированная вода.

В акустической микроскопии применяется несколько стандартных методов ультразвуковой визуализации [4]. В-скан получается при передвижении линзы параллельно поверхности образца вдоль одной линии с определенным шагом сканирования. При последовательном построчном сканировании поверхно-

сти создается массив цифровых данных, на основе которого можно реконструировать срез в любой плоскости объекта. Такие растровые изображения называются С-сканами.

Для получения изображения отдельных структур или слоев на разных уровнях в объеме образца используется установка временных акустических ворот — ограничение временного интервала, в пределах которого принимаются все отразившиеся от объекта ультразвуковые сигналы. При этом сигналы, пришедшие раньше или позже установленного интервала времени, не принимаются и не участвуют в формировании визуального изображения.

Электронная микроскопия

Исследование микроструктуры нетканного материала на основе полисульфона проводилось на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) Helios Nanolab (FEI) 600 напряжение 2 кВ.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ

В качестве одного из первых объектов для исследования был выбран образец нетканого матрикса с заданной меньшей толщиной волокон ~4 мкм, чем длина волны зондирующего ультразвукового пучка ~15 мкм. Прием эхосигналов и формирование на их основе акустических изображений возможно только за счет рассеянного на волокнах ультразвука (режим ультрамикроскопии). Изображения, выполненные в ультрамикроскопическом режиме, дают информацию о наличии рассеивателей малого размера и его распределении по объему образца, но не о его реальных размерах и форме. Отображение этих элементов возможно за счет рэлеевского рассеяния на них и регистрации рассеянного излучения акустическим объективом. Размер частиц и форма влияют на эффективность рассеяния и, соответственно, яркость соответствующих пятен изображения [5].

На рис. 1,а,б приведены результаты исследования образца полисульфона методом сканирующей акустической микроскопии. Полученные данные подтверждаются результатами сканирующей электронной микроскопии (рис. 1,в). На акустическом изображении приповерхностного слоя визуализированы протяженные волокна с включениями в виде воздушных пузырьков диаметром 0.1–0.2 мм (рис. 1,а). На рис. 1,б в толще образца видны включения воздуха диаметром до 1 мм, которые остались в процессе смачивания и являются существенным технологическим дефектом изготовления матрикса. Электронная микроскопия подтверждает диаметр и упаковку волокон, однако СЭМ изображения не могут отразить эффективность смачивания и дефекты, расположенные в толще объекта в отличие от акустической микроскопии.

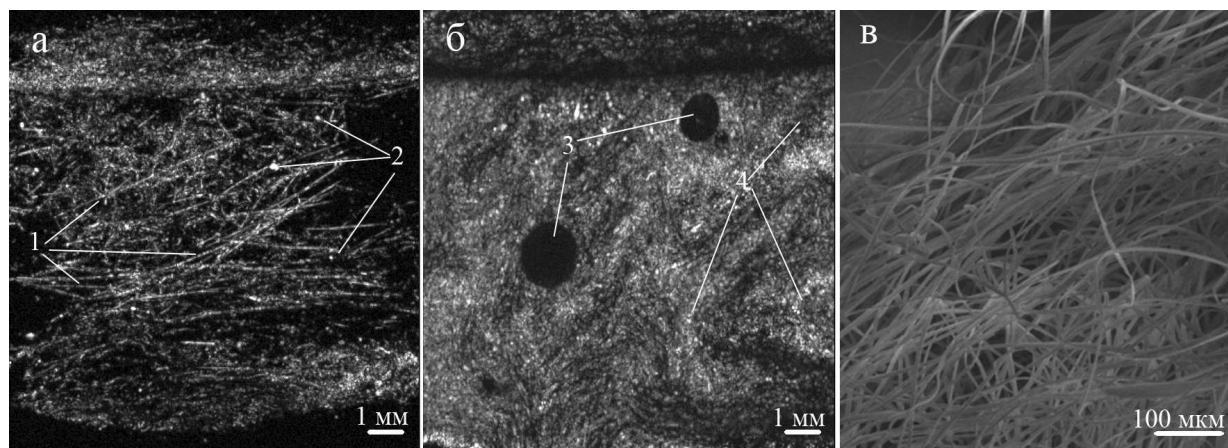


Рис. 1: Образец нетканого материала на основе полисульфона с плотностью упаковки 3%: *а, б* — акустические изображения (С-сканы) на глубине 50 мкм и 200 мкм соответственно, полученные на рабочей частоте 100 МГц. 1 — протяженные отдельные волокна, 2 — мелкие пузырьки воздуха. 3 — тени от крупных пузырьков воздуха в объеме, 4 — циркулярные неоднородности плотности упаковки материала; *в* — СЭМ изображение

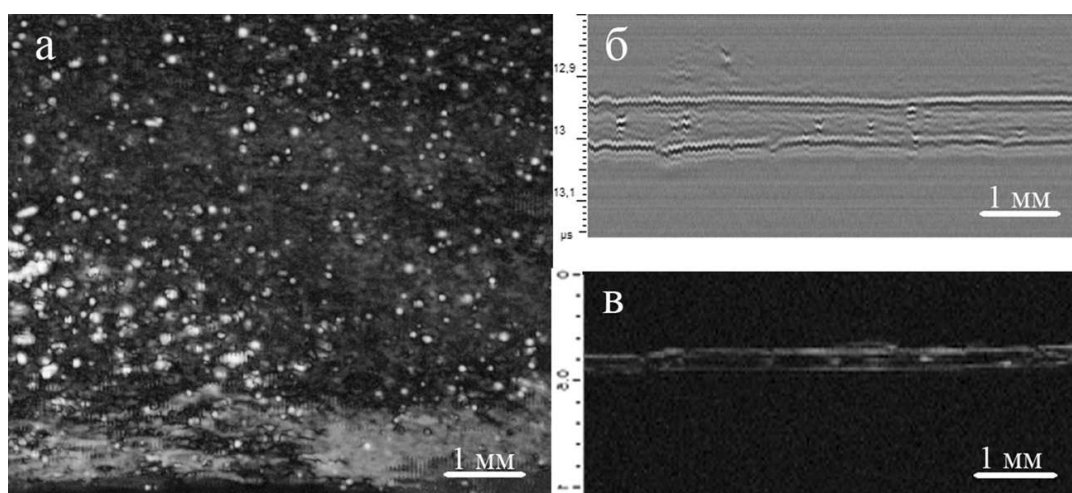


Рис. 2: Акустические изображения нетканого материала на основе хитозана с плотностью упаковки 20%: *а* — С-скан внутренней структуры пленки, пузырьки воздуха отображены в виде яркие включений; *б* — вертикальное сечение образца (В-скан); *в* — вертикальное сечение образца с динамической фокусировкой (В/Д-скан). Толщина образца 120 мкм

Вторым образцом для исследования был выбран нетканый материал на основе хитозана, характеризующийся большей плотностью волокон, их меньшей толщиной, и гидрофильностью. Благодаря данным особенностям материала, характер дефектов тоже будет отличаться: множественные переплетения тонких волокон в сочетании с высокой плотностью, задерживают большое количество мелких пузырьков (диаметр 0.05–0.1 мм) (рис. 2), образец существенно сложнее смочить, не смотря на его гидрофильность.

На образце хитозана был опробована методика В/Д-сканирования (рис. 2, в). Суть этого типа сканирования состоит в методах обработки данных, позволяющих формировать вертикальные акустические изображения, при динамическом изменении положения фокуса ультразвукового пучка: В/Д-сканы

(brightness/depth) [6]. Изменение фокуса линзы на фиксированное значение по направлению к поверхности объекта вдоль постоянной линии сканирования позволяет шаг за шагом получать В-сканы с разным положением фокальной зоны в объеме образца. Визуализируя таким образом элементы структуры по всей глубине образца, формируется срез объекта с вертикальной разверткой по реальному латеральному размеру (в миллиметрах). Такой режим построения акустических изображений широко используется в медицинских УЗИ аппаратах и ультразвуковых системах, использующих в качестве источника/приемника фазированные решетки [7]. В высокочастотной импульсной акустической микроскопии В/Д-режим визуализации широко используется при исследовании мягких тканей человека и животных благодаря близким значени-

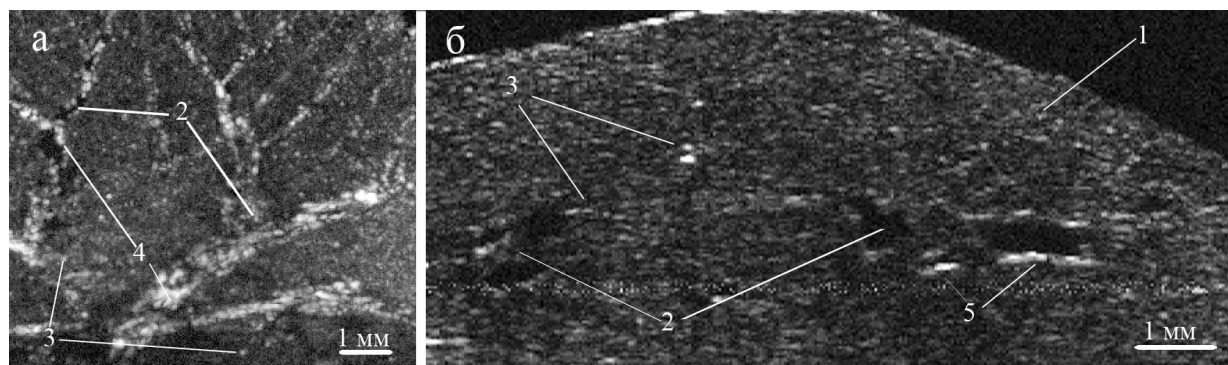


Рис. 3: Акустические изображения децеллюляризованных легких крысы: а — С-скан интегральной структуры бронхиол на глубине 3.5 мм. б — В/D-скан объекта, где 1 — строма, 2 — бронхиолы, 3 — пузырьки воздуха в строме, 4 — пузырьки воздуха на стенках бронхиолы, 5 — уплотнения тканей на стенках бронхиол

ям скоростей распространения звуковых волн в тканях и иммерсии [6, 8]. В результате акустомикроскопических исследований нетканых образцов выявлено, что В/D-режим является эффективным и информативным.

В отличие от нетканого матрикса с заданными характеристиками, ткани организма обладают сложной слоистой структурой с акустоупругими свойствами близкими к иммерсии, что усложняет получение контрастных акустических изображений. В регенеративной медицине редко используются целые органы или фрагменты нативной ткани. Перспективным в данной области представляется изготовление децеллюляризованных органов с последующим заселением клеточным компонентом. Децеллюляризованный орган представляет собой внеклеточный матрикс, состоящий в основном из коллагена, что с точки зрения построения и анализа акустических изображений, имеет ряд преимуществ.

На рис. 3 представлены акустические изображения децеллюляризованных легких крысы. На С-скане (рис. 3,а) отображена строма легкого с проходящими внутри ветвящимися бронхиолами с более высокой плотностью относительно стромы. На рис. 3,б показан В/D-скан, который предоставляет дополнительную информацию по структуре легкого, показаны уплотнения тканей на стенках бронхов, в объеме стромы видны пузырьки воздуха. На изображении различимы: толщина стенок бронхиол, объемная проекция ветвления бронхиол в строме легкого. Показано, что оба типа акустических изображений (С- и В/D-скан) взаимно

дополняют друг друга при описании объемной микро-структуры структуры биологических тканей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы ультрамикроскопии и В/D-сканирования предоставляют новые возможности для качественной объемной визуализации объектов регенеративной медицины. Методика В/D-сканирования имеет ряд преимуществ, в т. ч. легкость понимания и интерпретации полученных данных широким кругом специалистов, работающих с биологическими образцами — медиков и гистологов. В/D-изображения имеют вид, сравнимый с гистологическими срезами, кроме того В/D-сканы обладают более высокой контрастностью и детальностью, относительно В-сканов и может использоваться как предварительный этап перед гистологическими исследованиями для определения упругих свойств тканей в нативном состоянии. Скорость получения изображений достаточно высока и не превышает 10 мин, что является важным параметром при исследовании образцов *in vivo*. К ограничениям данного метода можно отнести небольшую толщину объектов (в пределах 6 мм), что связано с фокальным расстоянием и рабочей частотой используемой линзы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 15-33-20986, № 16-02-00855а, № 17-03-01361а).

- [1] Штейнберг Е. М., Сергеева Е. А., Зенитова Л. А., Абдуллин И. Ш. Вестн. Казан. технол. ун-та. 2012. **15**, № 20. С. 168.
- [2] Хоменко А. Ю., Попрядухин П. В., Богомолова Т. Б., Добровольская И. П., Мамагулашвили В. Г., Шепелев А. Д., Чвалун С. Н., Юдин В. Е., Иванькова Е. М. Рос. Нанотех. 2013. **8**, № 9–10. С. 41.
- [3] Куевда Е. В., Губарева Е. А., Сотниченко А. С., Гуме-

- нюк И. С., Гилевич И. В., Поляков И. С., Порханов В. А., Маккиарини П. Совр. проблемы науки и обр. 2015. № 3.
- [4] Петронюк Ю. С., Мороков Е. С., Левин В. М. Изв. РАН. Физика. 2015. **79**, № 10. С. 1425.
- [5] Levin V. M., Petronyuk Y. S. Phys. Procedia. 2015. **70**. С. 631.
- [6] Passmann C., Ermert. H. IEEE Ultrason. Symp. Proc. 1994. P. 1661.

- [7] Kubota Jun, Ishii Junichi, Sasaki Soji Acoust. Im. 1982. 11. P. 597.
[8] Vogt M., Ermert H. High-resolution ultrasound. Bioengi-

neering of the Skin: Skin Imaging & Analysis. CRS press, 2007.

Impulse acoustic microscopy for regenerative medicine materials investigation

E. A. Khramtsova^{1,a}, E. S. Morokov^{1,b}, T. E. Grigoriev^{2,3}, E. A. Gubareva⁴, A. S. Sotnichenko⁴, E. V. Kuevda⁴, V. M. Levin¹, Y. S. Petronyuk⁵

¹N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy of Sciences. Moscow 119334, Russia

²National Research Center «Kurchatov Institute». Moscow 123182, Russia

³A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds Russian Academy of Sciences. Moscow 119334, Russia

⁴Kuban State Medical University. Krasnodar 350063, Russia

⁵Scientific and Technological Center of Unique Instrumentation RAS. Moscow 117342, Russia

E-mail: ^aalyonushk@gmail.com, ^bes_morokov@yahoo.com

This paper is aimed to present the possibilities of pulsed acoustic microscopy using for noninvasive characterization of materials and tissue engineering objects. The features of visualization by acoustic methods of a non-woven matrix made of thin polysulfone fibers with diameter 4–8 μ as well as a non-woven material based on chitosan with fiber diameter 100–400 nm were studied. To display small-sized cylindrical elements of the structure of matrixes — polymer fibers and strands, collagen fibers of natural tissues, an ultramicroscopic regime based on recording scattered radiation was used. Ultrasonic methods for observing the bulk microstructure of natural extracellular matrix obtained by removing cellular contents from donor organs are proposed. To display the distribution of small-scale structural elements in the cross sections of tissue matrix samples, imaging techniques are developed with the use of dynamic focusing within the object and subsequent halftone mapping of the structure — the B/D (brightness–depth) technique. The results of the research make it possible to characterize the bulk architecture of materials used in regenerative medicine.

PACS: 43.35.Yb; 61.25.Hq; 87.80.Rb; 87.85.jf

Keywords: acoustic microscopy, chitosan, decellularized lungs, matrix, non-woven scaffold, polysulfone, regenerative medicine.

Received 04 July 2017.

Сведения об авторах

1. Храмцова Елена Александровна — мл. науч. сотрудник; тел.: (499) 137-83-47, e-mail: alyonushk@gmail.com.
 2. Мороков Егор Степанович — науч. сотрудник; тел.: (499) 137-83-47, e-mail: es_morokov@yahoo.com.
 3. Григорьев Тимофей Евгеньевич — канд. физ.-мат. наук, нач. отдела, науч. сотрудник; тел.: (499) 196-92-84, e-mail: timgrigo@yandex.ru.
 4. Губарева Елена Александровна — канд. мед. наук, зав. лабораторией; тел.: (499) 137-83-47, e-mail: corpus@ksma.ru.
 5. Сотниченко Александр Сергеевич — канд. мед. наук, науч. сотрудник; тел.: (499) 137-83-47, e-mail: corpus@ksma.ru.
 6. Кувда Елена Вячеславовна — канд. мед. наук, науч. сотрудник; тел.: (499) 137-83-47, e-mail: corpus@ksma.ru.
 7. Левин Вадим Моисеевич — канд. физ.-мат. наук, зав. лабораторией; тел.: (499) 137-83-47, e-mail: levin1943@gmail.com.
 8. Петронюк Юлия Степановна — канд. физ.-мат. наук, зав. лабораторией; тел.: (499) 137-83-47, e-mail: jps7@mail.ru.
-