

Исследование структуры и свойств Structure and properties investigation

**Физические методы
исследования и контроля**

**Physical methods
of investigation and monitoring**

DOI: <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2020-86-1-26-31>

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИЛАКТИДНЫХ МАТРИКСОВ МЕТОДОМ РЕНТГЕНОВСКОЙ МИКРОТОМОГРАФИИ

© **Юрий Станиславович Кривоносов^{1*}, Марина Валерьевна Чукалина¹,
Алексей Владимирович Бузмаков¹, Виктор Евгеньевич Асадчиков¹,
Андрей Артемьевич Русаков¹, Александра Олеговна Марьянац²,
Владимир Карпович Попов², Иллариий Олегович Занин³,
Владислав Леонидович Кулик³**

¹ Институт кристаллографии имени А. В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН; Россия, 119333, Москва, Ленинский пр. 59; *e-mail: Yuri.S.Krivososov@yandex.ru

² Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН; Россия, 108840, г. Троицк, ул. Пионерская 2; e-mail: vladikarpov@gmail.com

³ НОУ «Школяр»; Россия, 142432, Московская обл., г. Черноголовка, Школьный бульвар 20; e-mail: larryzanin@mail.ru

*Статья поступила 14 мая 2019 г. Поступила после доработки 21 октября 2019 г.
Принята к публикации 23 октября 2019 г.*

Трехмерные матриксы из биodeградируемых полимеров — перспективный материал для решения задач регенеративной медицины. Их широко применяют при восстановлении целостности и функций тканей и органов с помощью биоискусственных тканеинженерных конструкций. Цель работы — исследование структуры пористых биорезорбируемых полимерных матриксов для тканевой инженерии методом рентгеновской микротомографии. Образцы получали методом сверхкритической флюидной пластификации D,L-полилактида и его последующего вспенивания в цилиндрических пресс-формах. Томография дает возможность создать трехмерную модель объекта, оценить не только интегральную пористость матрикса (как это делают традиционные сорбционные методы), но и распределение пор по размерам и пространству. Это позволяет оптимизировать параметры технологических процессов изготовления полилактидных матриксов требуемой для тех или иных биомедицинских применений архитектуры и прогнозировать ход протекания процессов их биорезорбции в ферментативных средах. Исследования проводили с использованием лабораторного микротомографа (материал анода — молибден, время сканирования образца — 120 мин, размер пикселя детектора — 9 мкм). Томографическую реконструкцию выполняли алгебраическим методом. Необходимую для расчета структурных характеристик исследуемых матриксов процедуру бинаризации реализовывали методом, включающим выбор глобального порога. Проведенные расчеты пористости и однородности ее распределения в объеме полимера и оценка удельной площади поверхности пор показали изотропность пространственной структуры полилактидных матриксов.

Ключевые слова: полимерные пористые матриксы; рентгеновская микротомография; бинаризация результатов томографии; пористость.

STUDY OF POLYLACTIDE MATRICES USING X-RAY MICROTOMOGRAPHY

© **Yuriy S. Krivososov^{1*}, Marina V. Chukalina¹, Alexey V. Buzmakov¹,
Victor E. Asadchikov¹, Andrey A. Rusakov¹, Alexandra O. Mariyanats²,
Vladimir K. Popov², Illarij O. Zanin³, Vladislav L. Kulik³**

¹ Shubnikov Institute of Crystallography, FSRC “Crystallography and Photonics”, RAS; Leninskiy pr. 59, Moscow, 119333 Russia; *e-mail: yuri.s.krivososov@yandex.ru

² Institute of Photon Technologies, FSRC “Crystallography and Photonics”, RAS; Pionerskaya ul. 2, Troitsk, 108840, Russia; e-mail: vladikarpopov@gmail.com

³ Nonprofit general education institution “ShkolYar”, Shkolniy bulvar 20, Chernogolovka, Moscow obl., 142432, Russia; e-mail: larryzanin@mail.ru

Received May 14, 2019. Revised October 21, 2019. Accepted October 23, 2019.

Three-dimensional matrices of biodegradable polymers are promising materials for regenerative medicine. They are widely used in restoring the integrity and functions of tissues and organs using bio-artificial tissue engineering structures. We present the results of studying the structure of porous bioresorbable polymer matrices for tissue engineering using X-ray microtomography. Samples were obtained by supercritical fluid plasticization of D,L-polylactide with subsequent foaming in cylindrical molds. The tomographic method makes it possible to construct a three-dimensional voxel model of the object under study and gain apart from the estimate on the integral matrix porosity (characteristic data obtained by traditional sorption procedures) additional information about the size and spatial distribution of pores thus providing a possibility of optimization of the process parameters for production of polylactide matrices required for specific biomedical applications of architectonics, as well as forecasting the processes of their bioresorption in enzymatic media. The experiments were carried out on a laboratory microtomograph (Mo anode, the scan time of the sample is 120 min, the detector pixel size is 9 μm). Tomographic reconstruction was performed by algebraic method. The binarization procedure required for calculation of the structural characteristics of studied matrices was implemented by the method with the choice of a global threshold. Calculations of the porosity and homogeneity of the porosity distribution in the bulk, as well as estimation of the specific surface area of pores revealed the isotropy of the spatial structure of polylactide matrices.

Keywords: polymer porous matrices; X-ray microtomography; binarization of the tomography results; porosity.

Введение

Сегодня биорезорбируемые (постепенно растворяющиеся в организме) полимеры активно используют в технологиях современной регенеративной медицины. С их помощью решают задачи восстановления утраченных тканей или органов путем создания искусственных или гибридных тканеинженерных конструкций (ТИК).

Пористые полимерные структуры — биодеградируемые трехмерные матриксы — ключевой элемент для трансплантации клеток. Они обеспечивают их жизнедеятельность в период формирования новой ткани требуемого типа [1 – 3]. При создании таких полимерных матриксов необходимо добиться наличия у них определенных биологических и физико-химических характеристик: низкой цитотоксичности, высоких биосовместимости и механической прочности, а также оптимальной скорости биодеградации (или биорезорбции) с образованием нетоксичных компонентов. Кроме того, принципиально важно, чтобы матриксы для ТИК имели систему взаимосвязанных пор, обеспечивающую беспрепятственное прорастание живых клеток вглубь матрикса, доставку к ним необходимых питательных веществ и свободное удаление продуктов их жизнедеятельности [4, 5].

Цель работы — исследование структуры пористого полилактидного матрикса методом рентгеновской микротомографии (РМТ) для оптимизации технологических процессов изготовления биорезорбируемых матриксов требуемой для кон-

кретных биомедицинских применений архитектоники и прогноза процессов их биорезорбции в живом организме.

Материалы, оборудование, методы

Для изготовления биорезорбируемых пористых полимерных матриксов использовали D,L-полилактид марки Purasorb PDL05 (PURAC Biochem bv, Нидерланды). Формирование пор осуществляли с применением сверхкритического диоксида углерода sc-CO_2 , способного пластифицировать аморфные и частично кристаллические полимеры за счет эффекта снижения их температуры стеклования T_g [6]. Полимер сначала загружали в специальную пресс-форму с необходимыми геометрическими параметрами и пластифицировали под действием sc-CO_2 при температуре $T = 35^\circ\text{C}$ и давлении $P = 10,0$ МПа. Затем пластифицированная полимерная масса вспенивалась в процессе контролируемого сброса давления диоксида углерода до атмосферного значения. Это приводило к формированию в ней разветвленной пористой структуры [7, 8].

Параметры образующейся пористости можно менять, варьируя режимы сверхкритической флюидной (СКФ) пластификации полимера и давление CO_2 [9]. На рис. 1 представлены образец исследуемого пористого полилактидного матрикса и его внутренняя структура, полученная с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Исследования проводили с использованием лабораторного микротомографа [9] (источник излучения с трубкой с молибденовым анодом GE ISOVOLT 3003, ускоряющее напряжение — 40 кВ, ток — 20 мА, энергия зондирующего излу-

чения — 17,5 кэВ, монохроматор — кристалл пирографита, расстояния монохроматор — образец и образец — детектор — 1,2 и 0,03 м) (рис. 2). В каждом эксперименте измеряли 400 проекций в угловом диапазоне 200° с шагом $0,5^\circ$. Размер пик-

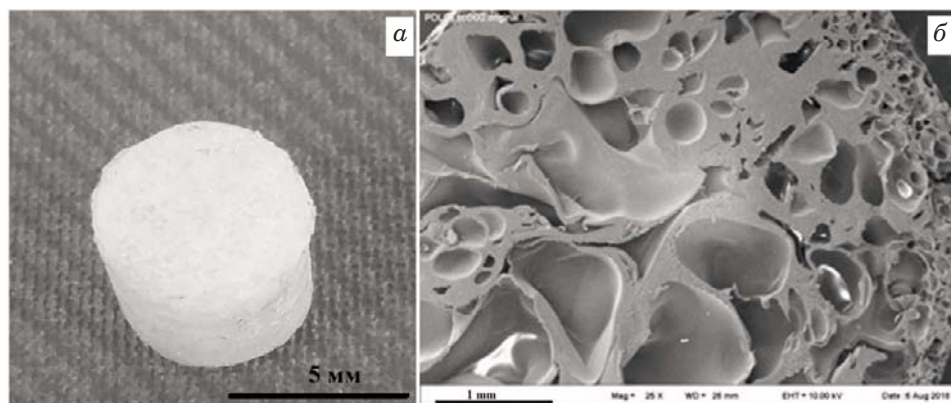


Рис. 1. Пористый матрикс из PDL05 (а) и его структура, полученная с помощью СЭМ (б)

Fig. 1. Porous PDL05 matrix (a) and matrix structure obtained on a scanning electron microscope (b)

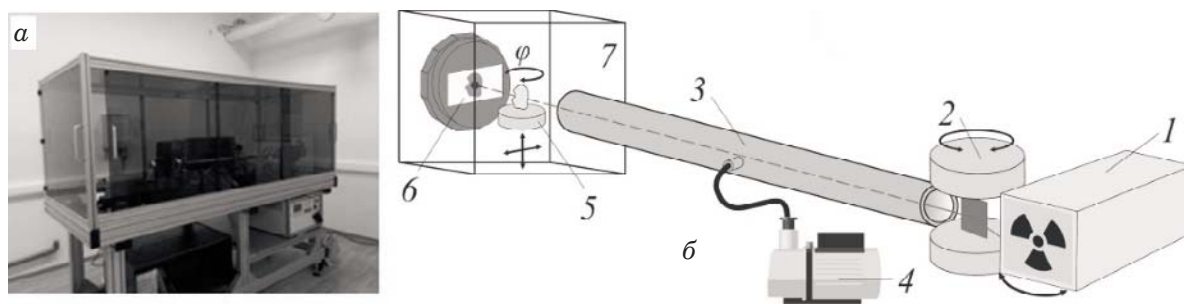


Рис. 2. Рентгеновский микротомограф (а) и его принципиальная блок-схема (б): 1 — рентгеновская трубка; 2 — кристалл-монохроматор; 3 — вакуумный объем; 4 — форвакуумный насос; 5 — координатный стол с гониометрическим устройством для вращения образца; 6 — рентгеновский детектор XIMEA xiRAY11; 7 — биозащита

Fig. 2. X-ray microtomograph (a) and block diagram (b): 1 — X-ray tube; 2 — crystal-monochromator; 3 — vacuum volume; 4 — forepump; 5 — coordinate table with a goniometer device for sample rotation; 6 — X-ray detector XIMEA xiRAY11; 7 — biological protection

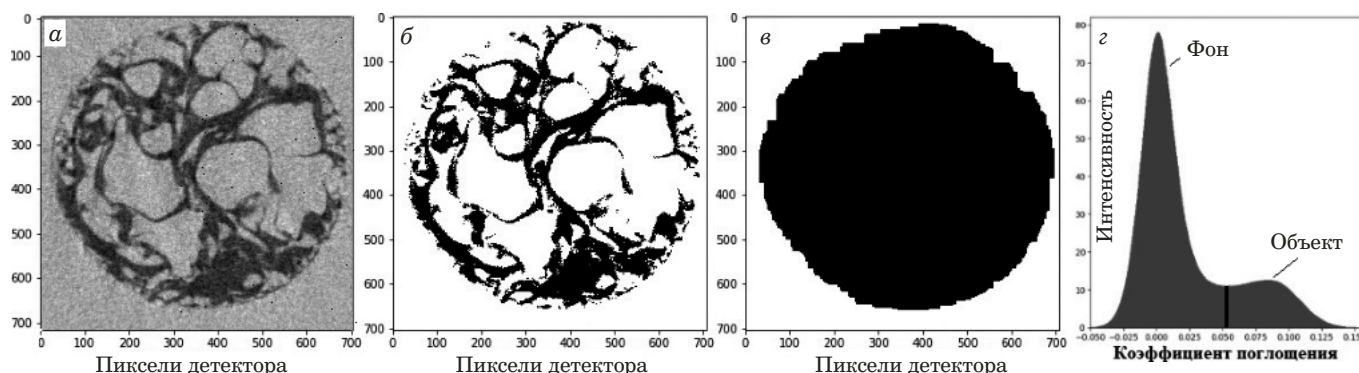


Рис. 3. Сечения полимера после томографической реконструкции (а), глобальной пороговой бинаризации (б), выполнения морфологической операции «закрывание» (с) и гистограмма линейного коэффициента поглощения, построенная по восстановленному изображению (д)

Fig. 3. Polymer cross sections after tomographic reconstruction (a), global threshold binarization (b), morphological operation «closing» (c) and histogram of the linear absorption coefficient based on the reconstructed image (d)

села детектора составлял 9×9 мкм, общее время сканирования — 120 мин. Томографическую реконструкцию и расчет макромолекулярных характеристик осуществляли с помощью специального программного обеспечения [10, 11].

Обсуждение результатов

Макромолекулярные параметры полимера рассчитывали с использованием процедуры глобальной пороговой бинаризации восстановленного изображения. Величину порога определяли по результатам анализа гистограммы, построенной по линейным коэффициентам поглощения восстановленного изображения (в нашем случае гистограмма была бимодальной с четким разделением максимумов, относящихся к фону на изображении и объекту). Отметим, что уширение максимумов фона и объекта на гистограмме связано со статистическим разбросом параметров экспериментальных измерений и флуктуациями линейного коэффициента поглощения.

На рис. 3 представлены сечения полимера после реконструкции, процесса бинаризации, морфологической операции «закрытие» и гистограмма линейного коэффициента поглощения.

Пористость рассчитывали следующим образом:

$$P = (1 - V_p/V_s) \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где V_s , V_p — объемы образца и полимера (вычисляли суммированием вокселей бинаризованного массива, для расчета V_s предварительно выполняли операцию «закрытие»).

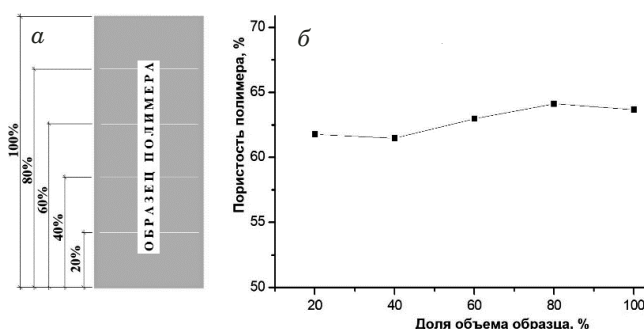


Рис. 4. Схема разбиения образца полимера на под-объемы (а) и зависимость пористости полимера от доли объема образца (б)

Fig. 4. Scheme of splitting (into sub-volumes) of the polymer sample (а) and values of the polymer porosity calculated in each of sub-volumes (б)

Для характеристики распределения пор во внутреннем пространстве образца рассчитывали величины пористости для нескольких подобъемов разного размера (рис. 4). Установили, что пористость полимера колеблется в пределах от 61,5 до 64,1 % в объеме образца.

Для практического использования полимера в регенеративной медицине необходимо знать размеры пор и площадь их поверхности. Количественную характеристику элементов пористой структуры образца получали с помощью расчета гистограммы распределений линейных размеров пор и толщин стенок полимерного матрикса. Для этого использовали метод построчного сканирования бинаризованного массива данных восстановленного изображения полимера. В каждой строке за толщины стенок принимали длины непрерывных отрезков Δx (состоящие из элементов

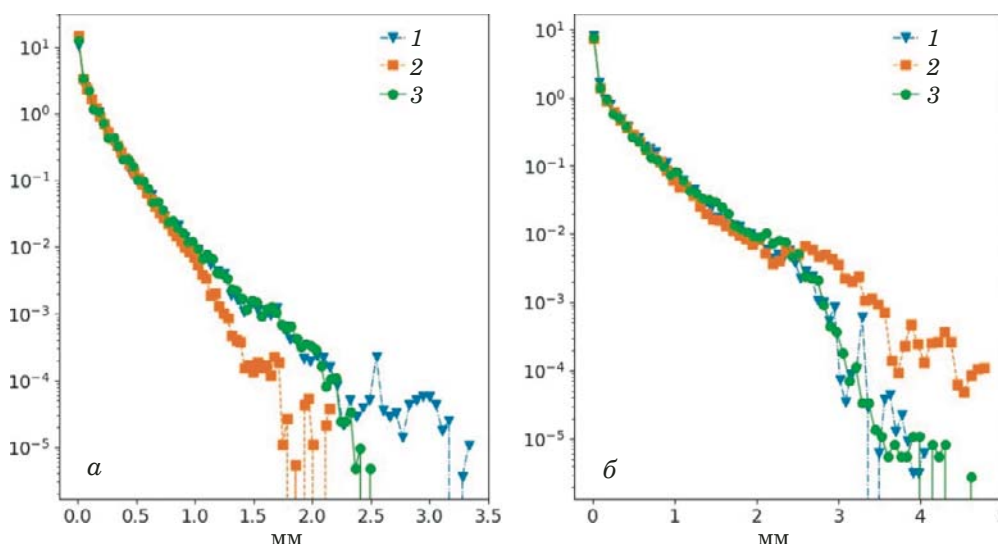


Рис. 5. Гистограммы распределений линейных размеров стенок полимера (а) и пор (б), рассчитанные вдоль взаимно перпендикулярных осей XYZ (соответственно кривые 1 – 3)

Fig. 5. Histograms of the distributions of linear dimensions of polymer walls (а) and pore sizes (б) calculated along mutually perpendicular axes XYZ (curves 1 – 3)

изображения с координатами x_i , где $i = 1, 2, \dots, n$), для которых выполнялось условие

$$\begin{cases} P(x_{i=0}) = 0; \\ P(x_{i=n+1}) = 0; \\ P(x_{i=1\dots n}) = 1, \end{cases}$$

где $P(x_i)$ — значение элемента бинаризованного изображения (может принимать значения 0 или 1) с координатой x_i .

За линейные размеры пор принимали длины отрезков Δx , удовлетворяющих условию

$$\begin{cases} P(x_{i=0}) = 1; \\ P(x_{i=n+1}) = 1; \\ P(x_{i=1\dots n}) = 0. \end{cases}$$

Распределения рассчитывали независимо вдоль произвольно выбранных взаимно перпендикулярных осей XYZ. Результат расчета приведен на рис. 5. Видно, что распределения размеров пор и стенок полимера, полученные вдоль разных направлений (кривые 1–3), совпадают друг с другом в диапазонах 0,01–0,9 (для толщин стенок) и 0,01–2,5 мм (для размеров пустот). Несовпадение кривых в диапазонах 0,9–3,5 и 2,5–5,0 мм соответственно прежде всего можно объяснить тем, что данные диапазоны сопоставимы с размерами исследуемого образца. Таким образом, проведенные расчеты показали, что распределение линейных размеров исследованной пористой структуры изотропно по направлениям.

Поскольку водные растворы взаимодействуют с пористой структурой полимера через ее поверхность, определяли значение удельной поверхности, от которой зависит эффективность процессов резорбции. Величину удельной поверхности находили из соотношения

$$S_{уд} = S_p/V_s, \quad (2)$$

где S_p — площадь поверхности пор.

$S_{уд}$ рассчитывали на основе данных восстановленного изображения с помощью стереологического подхода [12].

Параметры исследуемого образца в итоге составили: размеры цилиндрического образца (мм) $D = 5,7$, $h = 4,9$; пористость — 63,7 %; удельная поверхность — 10,8 мм⁻¹.

Заключение

Методом рентгеновской микротомографии исследован образец пористого матрикса из D,L-полилактида марки Purasorb PDL05. На основе восстановленного трехмерного изображения объ-

екта рассчитаны пористость (колеблется в пределах от 61,5 до 64,1 % в объеме образца) и удельная поверхность (10,8 мм⁻¹). Предложен метод оценки пространственного распределения пор в объеме полимера. На основе расчетов характеристик пористой структуры, проведенных вдоль трех взаимно перпендикулярных осей, установлено, что распределение пор по размерам изотропно по направлениям. Полученные результаты могут быть использованы для анализа гистограмм яркостей и разработки способа для анализа несбалансированных классов полимеров [13].

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН (в части «проведения экспериментов») и Российского фонда фундаментальных исследований (в части реконструкции рентгеновских микротомографических изображений и их анализа, проект № 18-29-26019, и в части СКФ формирования биорезорбируемых пористых матриксов, проект № 16-29-07356).

ЛИТЕРАТУРА

1. **Севастьянов В. И.** Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины / Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2014. Т. XVI. № 3. С. 93–108.
2. Биосовместимые материалы: учеб. пособие. / Под ред. Севастьянова В. И., Кирпичникова М. П. — М.: МИА, 2011. — 544 с.
3. **Сургученко В. А.** Матрикс для тканевой инженерии и гибридных органов. Биосовместимые материалы: учеб. пособие. — М.: МИА, 2011.
4. **Антонов Е. Н., Бухарова Т. Б., Дунаев А. Г. и др.** Новые «старые» полилактиды для тканеинженерных конструкций / Перспективные материалы. 2017. № 2. С. 14–25.
5. **Karageorgiou V., Kaplan D.** Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis / Biomaterials. 2005. Vol. 26. N 27. P. 5474–5491.
6. **Tai H., Popov V., Shakesheff K., Howdle S.** Putting the fizz into chemistry: applications of supercritical carbon dioxide in tissue engineering, drug delivery and synthesis of novel block copolymers / Biochemical Society Transactions. 2007. Vol. 35. P. 516–521.
7. **Bogorodski S. E., Krotova L. I., Mironov A. V., Popov V. K.** Fabrication of highly porous bioresorbable polymer matrices using supercritical carbon dioxide / Russ. J. Physical Chemistry B. 2013. Vol. 7. N 8. P. 916–923.
8. **Bogorodski S. E., Vasilets V. N., Krotova L. I., Minaeva S. A., Mironov A. V., Nemets E. A., Surguchenko V. A., Popov V. K., Sevastianov V. I.** Fabrication of bioactive highly porous polymer matrices for tissue engineering / Inorganic Materials: Applied Research. 2013. Vol. 4. N 5. P. 448–456.
9. **Бузмаков А. В., Асадчиков В. Е., Золотов Д. А. и др.** Лабораторные микротомографы: конструкция и алгоритмы обработки данных / Кристаллография. 2018. Т. 63. № 6. С. 1007–1011.
10. **Чукалина М. В., Бузмаков А. В., Николаев Д. П. и др.** Рентгеновская микротомография с использованием лабораторного источника: техника измерений и сравнение алгоритмов реконструкции / Измерительная техника. 2008. № 2. С. 19–24.

11. **Бузмаков А. В., Асадчиков В. Е., Золотов Д. А. и др.** Лабораторные рентгеновские микротомографы: методы предобработки экспериментальных данных / Известия РАН. 2019. Т. 83. № 2. С. 194 – 197.
12. **Салтыков С. А.** Стереометрическая металлография. — М.: Металлургия, 1976. — 270 с.
13. **Burnaev E., Erofeev P., Papanov A.** Influence of resampling on accuracy of imbalanced classification / Proc. SPIE 9875. 8th International Conference on Machine Vision (ICMV 2015). 2015. 987521.

REFERENCES

1. **Sevastianov V. I.** Technologies of tissue engineering and regenerative medicine / Vestn. Transplantol. Iskustv. Organov. 2014. Vol. XVI. N 3. P. 93 – 108 [in Russian].
2. **Biocompatible materials** / Ed. by Sevastianov V. I., Kirpichnikov M. P. — Moscow: MIA, 2011. — 544 p. [in Russian].
3. **Surguchenko V. A.** The matrices for tissue engineering and hybrid organs. Biocompatible materials. — Moscow: MIA, 2011 [in Russian].
4. **Antonov E. N., Bukharova T. B., Dunaev A. G., et al.** New “old” polylactides for tissue engineering constructions / Perspekt. Mater. 2017. N 2. P. 14 – 25 [in Russian].
5. **Karageorgiou V., Kaplan D.** Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis / Biomaterials. 2005. Vol. 26. N 27. P. 5474 – 5491.
6. **Tai H., Popov V., Shakesheff K., Howdle S.** Putting the fizz into chemistry: applications of supercritical carbon dioxide in tissue engineering, drug delivery and synthesis of novel block copolymers / Biochemical Society Transactions. 2007. Vol. 35. P. 516 – 521.
7. **Bogorodski S. E., Krotova L. I., Mironov A. V., Popov V. K.** Fabrication of highly porous bioresorbable polymer matrices using supercritical carbon dioxide / Russ. J. Physical Chemistry B. 2013. Vol. 7. N 8. P. 916 – 923.
8. **Bogorodski S. E., Vasilets V. N., Krotova L. I., Minaeva S. A., Mironov A. V., Nemets E. A., Surguchenko V. A., Popov V. K., Sevastianov V. I.** Fabrication of bioactive highly porous polymer matrixes for tissue engineering / Inorganic Materials: Applied Research. 2013. Vol. 4. N 5. P. 448 – 456.
9. **Buzmakov A. V., Asadchikov V. E., Zolotov D. A., et al.** Laboratory Microtomographs: Design and Data Processing Algorithms / Crystallography Reports. 2018. Vol. 63. N 6. P. 1057 – 1061.
10. **Chukalina M. V., Buzmakov A. V., Senin R. A., et al.** Optophysical measurements: X-ray microtomography using a laboratory source: measurement technique and comparison of reconstruction algorithms / Measurement techniques. 2008. Vol. 51. N 2. P. 136 – 145.
11. **Buzmakov A. V., Asadchikov V. E., Zolotov D. A., et al.** Laboratory X-ray Microtomography: Ways of Processing Experimental Data / Bull. RAS. Phys. 2019. Vol. 83. N 2. P. 146 – 149.
12. **Saltykov S. A.** Stereometric metallography. — Moscow: Metallurgiya, 1976. — 270 p. [in Russian].
13. **Burnaev E., Erofeev P., Papanov A.** Influence of resampling on accuracy of imbalanced classification / Proc. SPIE 9875. 8th International Conference on Machine Vision (ICMV 2015). 2015. 987521.