

- композиты медицинского назначения // Медицинская техника. 2014. № 1. С. 30-32.
10. Склянчук Е.Д., Просвирина А.А., Малышев И.Ю., Фадеева И.С., Фесенко Н.И., Горшенин В.Н., Телешев А.Т., Ершов Ю.А., Гурьев В.В. Индуцированные коллаген-апатитовым биокомпозитом функциональные ответы перитонеальных макрофагов // Технологии живых систем. 2014. № 6. С. 20-35.
 11. Huang J., Best S., Bonfield W., Brooks R.A., Rushton N., Jayasinghe S.N. et al. In vitro assessment of the biological response to nano-sized hydroxyapatite // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2004. Vol. 15. PP. 441-445.
 12. Pezzatini S., Solito R., Morbidelli L., Lamponi S., Boanini E., Bigi A. et al. The effect of hydroxyapatite nanocrystals on microvascular endothelial cell viability and functions // J. Biomed. Mater. Res. 2006. Vol. 76 A. PP. 656-663.
 13. Кесель Б.А., Федоров А.Д., Гимушин И.Ф., Кесель Б.А., Федоров А.Д., Гимушин И.Ф., Волков Г.А., Гатауллин Р.Ш., Воскобойников Д.В., Весельев Д.А. Роторно-пульсационный аппарат (РПА) / Патент № 2166986 РФ. БИ № 11. 2006.
 14. Ковалева Е.С., Филиппов Я.Ю., Путляев В.И., Третьяков Ю.Д., Иванов В.К., Силкин Н.И., Галиуллина Л.Ф., Родионов А.А., Мамин Г.В., Орлинский С.Б., Салахов М.Х. Биорезорбируемые порошковые материалы на основе $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$ // Ученые записки Казанского университета. Серия «Естественные науки». 2010. Т. 152. № 1. С. 79-98.
 15. Saenger A.T., Kuhs W.F. Golden Book of Phase Transitions // Wrocław. 2002. Vol. 1. PP. 100-123.

Андрей Терентьевич Телешев,
д-р хим. наук, профессор,
Московский педагогический
государственный университет,
Владимир Николаевич Горшенин,
канд. физ.-мат. наук, ст. научный сотрудник,
Марина Андреевна Яковлева,
канд. биолог. наук, научный сотрудник,
Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН,
Владимир Андреевич Фомичев,
студент,
Московский педагогический
государственный университет,
г. Москва,
Роман Сергеевич Фадеев,
канд. биолог. наук, ст. научный сотрудник,
Институт теоретической
и экспериментальной биофизики РАН,
Владислав Валентинович Минайчев,
студент,
Пуцинский государственный
естественно-научный институт,
Владимир Семенович Акатов,
д-р физ.-мат. наук, профессор,
Институт теоретической
и экспериментальной биофизики РАН,
г. Пуццо, Московская обл.,
e-mail: lina.invers@gmail.com

И.Б. Римшан, Н.Н. Журбина, У.Е. Курилова, Д.И. Рябкин, А.Ю. Герасименко

Биосовместимый наноматериал для восстановления целостности рассеченных биологических тканей

Аннотация

Описана технология получения биосовместимого наноматериала для лазерного восстановления целостности рассеченных фрагментов биоткани – трахеи крупно-рогатого скота. Исследована прочность на разрыв швов, полученных путем лазерного облучения биосовместимого наноматериала, нанесенного на края рассеченных биотканей. Максимальная прочность на разрыв облученных швов при использовании биосовместимого наноматериала, состоящего из 25 % мас. альбумина, 1 % мас. коллагена, 1 % мас. многостенных углеродных нанотрубок и 0,1 % мас. красителя индоцианина зеленого, достигала ~0,196 МПа. Изучена биосовместимость наноматериала методом МТТ-теста. Налучшее влияние на пролиферативную активность клеток оказало разведение биосовместимого наноматериала в культуральной среде с клетками до концентраций 1/10, 1/20, 1/160 и 1/320.

Введение

Одной из важных задач современной хирургии является создание новых методов восстановления целостности рассеченных биологических тканей, так как существующие традиционные способы с использованием шовных материалов, сшивающих аппаратов, скобных соединений, клеевых композиций и других средств имеют ряд недостатков [1], [2]. В последнее время уделяется большое внимание методу лазерного восстановления целостности биологических тканей. Данный метод обладает важными преимуществами в хирургии: быстрое заживление ран, сокращение времени операции, снижение вероятности появления фиброза или его полное отсутствие [3]-[5].

На прочность хирургических лазерных швов биологических тканей оказывают влияние режим работы лазера, характеристики биотканей, контроль температуры ткани. Сложностей, связанных с подбором режима лазерной обработки, можно избежать при использовании специальных биосовместимых материалов в жидком или гелеобразном виде, кото-

рые изготавливаются с заданными агрегатными, оптическими и биологическими характеристиками. Данные материалы наносятся на поверхности соединяемых участков ткани, далее поверхности сжимаются друг с другом и производится облучение лазером. Процесс лазерной обработки должен проходить так, чтобы при минимальном количестве поглощенной энергии лазерного излучения происходила коагуляция нанесенного биосовместимого материала, соединяющего участки биоткани. Различные добавки к связующим веществам в составе биосовместимых материалов существенно влияют на прочность и качество лазерных швов [6]-[8]. Высокие значения прочности на разрыв достигаются при использовании наполнителей из наночастиц [9]. В последние годы одним из способов повышения прочности биосовместимых материалов является добавление в их состав углеродных нанотрубок (УНТ). Данные частицы способны значительно увеличить прочность материалов, а также могут выступать в роли хромофоров, поглощая лазерное излучение, тем самым не допуская перегрева биотканей.

Ориентирующее действие направленного лазерного излучения на водно-белковые дисперсные среды УНТ служит причиной самосборки последних [10]. Такой прочный и легкий (за счет высокой пористости) объемный каркас из УНТ обеспечивает заселение клетками и создает условия для самоорганизации биологических тканей. При использовании в составе наноматериала УНТ можно ожидать структурирования шовного материала и увеличения его прочности. Для улучшения биосовместимости материал может содержать различные биологические регуляторы клеточной активности или белковые компоненты. Применение материала уменьшает вероятность термического повреждения краев раны, увеличивает эластичность, прочность и герметичность соединения тканей, что приводит к ускорению процесса заживления раны [11].

В данной статье описана технология получения биосовместимого наноматериала на основе водно-белковой дисперсии углеродных нанотрубок. Путем лазерного облучения наноматериала, нанесенного на края рассеченных биологических тканей, получены швы. Исследованы прочность на разрыв данных швов биотканей, а также биосовместимость наноматериала методом МТТ-теста.

Материалы и методы

Изготовление биосовместимого наноматериала

В качестве составных компонентов биосовместимого наноматериала были использованы одностенные или многостенные УНТ, а в качестве связующего вещества бычий сыворо-

точный альбумина (БСА), коллаген и дистиллированная вода. Кроме того, в состав биосовместимого наноматериала был включен биосовместимый краситель индоцианин зеленый (ИЦЗ). Для получения биосовместимого наноматериала была подготовлена водная дисперсия УНТ. Затем в полученную дисперсию были добавлены суспензия коллагена и порошок БСА. Благодаря солубилизирующему действию БСА, УНТ образовывали устойчивую дисперсионную взвесь на срок от 7 до 14 дней.

Восстановление целостности рассеченной биологической ткани

В качестве биологической ткани для лазерного восстановления была выбрана трахея крупно-рогатого скота (ТКРС). Биологическую ткань тщательно промывали в проточной воде, после чего были сформированы фрагменты ткани в виде полос длиной $(4 \pm 0,1)$ см, шириной порядка 5 мм и толщиной 2...3 мм.

Фрагмент ТКРС рассекали на две равные части, затем с использованием шприца осуществляли нанесение биосовместимого наноматериала на границы соединяемых частей биологической ткани. После этого края частей ТКРС плотно соединяли и точно обрабатывали лазерным излучением вдоль линии шва. Лазер работал в непрерывном режиме на длине волны 808 нм. Диаметр одной точки соответствовал диаметру пучка лазерного излучения и составлял около 1 мм. Время воздействия на одну точку составляло 120 с. Мощность излучения адаптивно варьировалась в зависимости от температуры нагрева биоткани. Температура области лазерного воздействия не превышала 65 °С.

Таблица 1

Результаты исследования прочности на разрыв

Состав биосовместимого наноматериала	Номер образца	Толщина, мм	Ширина, мм	Сила разрыва, Н	Прочность, МПа	Среднее значение прочности, МПа
БСА 25 % мас.; коллаген 1 % мас.; ОУНТ 0,1 % мас.; ИЦЗ 0,1 % мас.	1	4,1	5,1	1,2	0,1	0,191
	2	1,1	5,1	1,8	0,2	
	3	3,1	5,1	1,6	0,2	
	4	2,1	5,1	2,1	0,2	
	5	1,1	5,1	3,2	0,3	
БСА 25 % мас.; коллаген 1 % мас.; ОУНТ 1 % мас.	1	3,1	5,1	1,9	0,1	0,104
	2	4,5	6,1	1,3	0,04	
	3	3,4	5,4	1,5	0,08	
	4	2,1	5,4	1,2	0,1	
	5	2,1	5,2	1,8	0,2	
БСА 25 % мас.; коллаген 2 % мас.; МУНТ 1 % мас.	1	3,1	5,1	4,8	0,3	0,178
	2	3,1	5,1	1,9	0,1	
	3	3,1	5,1	1,7	0,1	
	4	3,1	5,1	2,6	0,2	
	5	3,1	5,1	3,1	0,2	
БСА 25 % мас.; коллаген 1 % мас.; МУНТ 1 % мас.; ИЦЗ 0,1 % мас.	1	2,1	5,1	2	0,187	0,196
	2	2,1	5,1	2,3	0,215	
	3	2,1	4,1	2,3	0,267	
	4	2,1	5,1	2,1	0,196	
	5	4,1	5,1	2,4	0,115	
БСА 25 % мас.; коллаген 2 % мас.; ИЦЗ 0,1 % мас.	1	3,1	6,1	0,9	0,1	0,08
	2	1,1	5,1	0,6	0,3	
	3	3,1	5,1	0,8	0,1	
	4	2,1	6,1	1	0,08	
	5	3,1	6,1	0,7	0,08	
Сплошные образцы (контроль)	1	2,1	2,1	14,3	3,2	4,2
	2	2,1	2,1	13,9	3,2	
	3	1,1	2,1	9	3,9	
	4	1,1	2,1	15,1	6,5	

После окончания формирования лазерного шва каждый образец проходил измерение прочности на разрыв с помощью цифрового динамометра. Используя данные о геометрических параметрах, для каждого образца вычисляли значение прочности на разрыв, затем среднее значение прочности на разрыв для каждого состава биосовместимого наноматериала. Для этого в проделанные отверстия на краях образца вставляли металлические зажимы. Далее один из зажимов закрепляли к крючку динамометра, а другой – к специальному держателю. После этого держатель оттягивали шаговым двигателем до момента разрыва образца на две части, при этом фиксировали значение приложенной силы.

Оценка токсичности биосовместимого наноматериала

Влияние наноматериала на выживаемость клеток было исследовано с использованием МТТ-теста. Культуральную среду с суспензией мезенхимальных стволовых клеток (МСК) помещали во все лунки 96-луночного планшета в количестве 1 мл на лунку. Экспериментальную дисперсию в количестве 1 мл помещали в первую лунку планшета, после чего с использованием дозатора половину смеси культуральной среды, клеток и экспериментальной дисперсии из первой лунки переносили во вторую и смешивали с находящейся там культуральной средой и клетками. Таким образом происходило разведение экспериментальной дисперсии в культуральной среде с клетками для получения следующих концентраций дисперсии относительно исходной концентрации: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280. Далее планшеты помещали в CO₂-термостат на 48 ч. После инкубирования клеток осуществляли добавление в лунки с образцами МТТ [бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия], а затем добавление ДМСО (диметилсульфоксида). После завершения реакции ДМСО с МТТ и образования кристаллов формазана фиолетового цвета полученную суспензию перемешали в 96-луночный культуральный планшет для проведения фотокалориметрических исследований.

Исследования оптической плотности образцов напрямую зависели от пролиферативной активности МСК в присутствии наноматериалов и проводились с помощью микропланшетного фотометра «Immunochem-2100». Для возбуждения использовали длину волны 545 нм, что обусловлено первым пиком поглощения электронного спектра МТТ.

Прочность на разрыв

Полученные значения прочности на разрыв биоткани, восстановленной лазерным методом с использованием биосовместимого наноматериала, приведены в *табл. 1*.

Прочность швов биоткани, полученных с использованием биосовместимого наноматериала с нанотрубками, была выше, чем без них. Прочность швов, полученных с использованием наноматериала на основе МУНТ, выше, чем с использованием одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ) в той же белковой матрице. Схожая закономерность наблюдалась и при добавлении лазерного красителя ИЦЗ в указанные выше составы биосовместимого наноматериала.

Пролиферативная активность

Для исследований были приготовлены дисперсии с использованием ОУНТ высокой чистоты (до 95 %). Первая водная дисперсия состояла из ОУНТ и БСА с концентрациями 0,1 и 25 % соответственно (ОУНТ + БСА). Вторая дисперсия состояла из ОУНТ (0,1 %), БСА (25 %) и коллагена с концентрацией 2 % (ОУНТ + БСА + коллаген).

Диаграмма усредненных значений оптической плотности групп образцов представлена на *рис. 1*. В качестве контроля использовалась группа лунок культурального планшета без наноматериала. Из графика видно, что обе дисперсии оказывают сходное влияние на пролиферативную активность клеток. Наименьшее влияние на рост и развитие клеток наблюдалось при разведении дисперсий 1/20, 1/160 и 1/320. При дальнейшем разведении было замечено снижение пролиферативной активности. В сравнении с контролем наибольшее воздействие на клетки оказывали обе дисперсии при разведении 1/80.

Заключение

По результатам экспериментов установлено, что максимальная прочность на разрыв лазерных швов достигается при использовании биосовместимого наноматериала на основе МУНТ, БСА, коллагена и ИЦЗ. Положительное влияние ИЦЗ на прочность швов может объясняться наличием у данного красителя пика поглощения на длине волны генерации использованного в эксперименте лазера. Образцы биосовместимого материала без углеродных нанотрубок имеют низкую прочность лазерных швов трахеи крупно-рогатого скота, поскольку связующее вещество лишено армирующего каркаса.

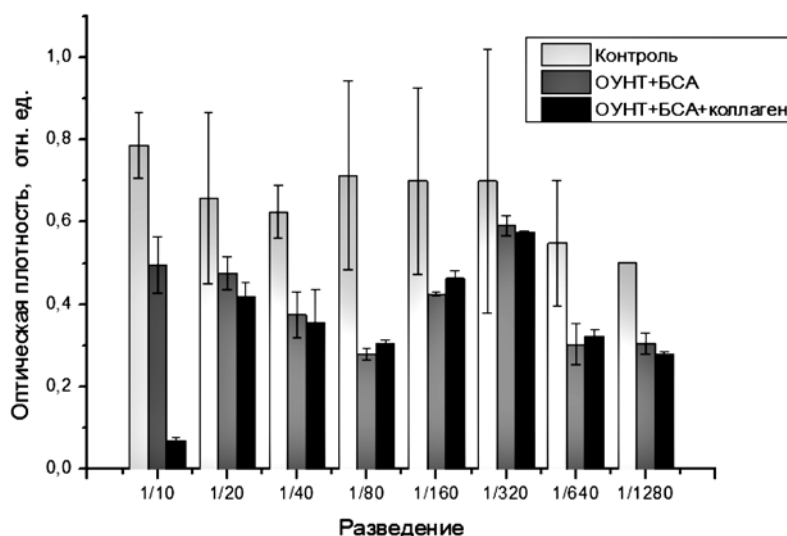


Рис. 1. Зависимость оптической плотности образцов с клетками от концентрации водно-белковых дисперсий ОУНТ

Методом МТТ-теста установлено влияние наноматериала на пролиферативную способность мезенхимальных стволовых клеток. Наименьшее влияние на рост и развитие клеток наблюдалось при разведении наноматериала до концентраций 1/20, 1/160 и 1/320 относительно исходной концентрации дисперсии. При дальнейшем разведении было замечено снижение пролиферативной активности клеток в присутствии наноматериала.

Работа выполнена при поддержке ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Фонд содействия инновациям)» (соглашение № 9724 ГУ/2015 от 15.02.2016 г.).

Список литературы:

1. *Soni A. et al.* Comparing cyanoacrylate tissue adhesive and conventional subcuticular skin sutures for maxillofacial incisions – A prospective randomized trial considering closure time, wound morbidity, and cosmetic outcome // *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2013. Vol. 71. № 12. PP. 2152-e1-2152-e8.
2. *Coulthard P. et al.* Tissue adhesives for closure of surgical incisions // *Cochrane Database Syst Rev*. 2010. Vol. 12. № 5. 48 p.
3. *Su Y.L. et al.* Experiment and simulation of biotissue surface thermal damage during laser surgery // *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part E: Journal of Process Mechanical Engineering*. 2015. PP. 581-589.
4. *Matteini P. et al.* In vivo carotid artery closure by laser activation of hyaluronan-embedded gold nanorods // *Journal of Biomedical Optics*. 2010. Vol. 15. № 4. PP. 041508-1-041508-6.
5. *Esposito G. et al.* Present status and new perspectives in laser welding of vascular tissues // *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*. 2011. Vol. 25. № 2. PP. 145-152.
6. *Simhon D. et al.* Laser Soldering of Rat Skin, Using Fiberoptic Temperature Controlled System // *Lasers in Surgery and Medicine*. 2001. Vol. 29. PP. 265-273.

7. *Züger B.J., Ott B., Mainil-Valter P.* Laser Solder Welding of Articular Cartilage: Tensile Strength and Chondrocyte Viability // *Lasers in Surgery and Medicine*. 2001. Vol. 28. PP. 427-434.
8. *Азеева С.А. и др.* Применение органических красителей при лазерной сварке биологических тканей / Сб. научн. трудов «Лазеры в науке, технике, медицине». Под ред. В.А. Петрова. – М.: МНТОРЭС, 2007. Т. 18. С. 96-100.
9. *Gobin A.M. et al.* Near infrared laser-tissue welding using nanoshells as an exogenous absorber // *Lasers in Surgery and Medicine*. 2005. Vol. 37. № 2. PP. 123-129.
10. *Gerasimenko A.Yu., Glukhova O.E., Savostyanov G.V., Podgaetsky V.M.* Laser structuring of carbon nanotubes in the albumin matrix for the creation of composite biostructures // *Journal of Biomedical Optics*. 2017. Vol. 22 (6). PP. 065003-1-065003-8.
11. *Jenny P., Bernard M.* The aqueous composition used in the treatment of fibrous repair connective tissue by laser / FR Patent № 2952306, 13.05.2011.

Ирина Борисовна Римшиан,

инженер,

Наталья Николаевна Журбина,

инженер,

Ульяна Евгеньевна Курилова,

инженер,

Дмитрий Игоревич Рябкин,

аспирант, инженер,

Александр Юрьевич Герасименко,

канд. физ.-мат. наук, доцент,

ст. научный сотрудник,

кафедра биомедицинских систем,

Национальный исследовательский университет «МИЭТ»,

г. Москва, г. Зеленоград,

e-mail: natalia93zhurbina@gmail.com

С.В. Белов, Ю.К. Данилейко, В.В. Ежов, В.В. Осико, Э.Г. Османов, В.А. Салюк

Лазерная ударно-волновая деструкция как метод эффективного воздействия на патологические покровные биоткани

Аннотация

Описан принципиально новый высокоэффективный вид воздействия на патологические покровные биоткани методом управляемой ударно-волновой деструкции, возникающей в процессе генерации лазерным излучением тепловых микровзрывов мелкодисперсных частиц лазерноконтрастного вещества, нанесенного на патологические участки биоткани. Метод реализуется при использовании лазерного излучения в области прозрачности биотканей (0,6...1,1 мкм) совместно с поглощающим его лазерноконтрастным веществом. Деструкция биоткани в результате термохимической реакции в зоне облучения за счет выделения тепловой и механической энергии полностью совпадает с областью нанесения лазерноконтрастного вещества, не затрагивая свободные области. Механизм воздействия комплексный, со значительным преобладанием механико-акустического компонента, приводящего к радикальному взрывному разрушению поверхностных структур биоткани. Принципиальным отличием метода является возможность управления глубиной ударно-волнового воздействия с помощью изменения интенсивности излучения, и, в отличие от известных лазерных методов, она уменьшается с увеличением интенсивности лазерного излучения.

Введение

В последние годы отмечается увеличение числа дистрофических гинекологических заболеваний наружных половых органов. С возрастом доля этих заболеваний в общем количестве гинекологических заболеваний увеличивается и возрастает вероятность развития их злокачественной трансформации. В настоящее время не существует консервативного метода лечения дистрофических заболеваний наружных половых органов, который мог бы предотвратить рецидив заболевания и развитие злокачественных процессов. Более того, несмотря на широкий арсенал применяемых методов консервативного ле-

чения этой патологии, эффективность их остается относительно невысокой [1], [2]. Хирургическое лечение, несмотря на более высокую эффективность в сравнении с другими методами, отличается драматичностью и высокой частотой послеоперационных осложнений [2].

В последние десятилетия в гинекологической практике достаточно успешное применение находят высокоэнергетические лазеры [3]-[7], среди которых чаще всего применяют CO₂-лазеры, механизм действия которых заключается в преобразовании поглощенной в биоткани энергии лазерного излучения в тепловую. Наряду с высокой эффективностью лечения с применением CO₂-лазера существует опасность возникновения