С.А. Агеева, В.И. Елисеенко, А.Ю. Герасименко, Л.П. Ичкитидзе, В.М. Подгаецкий, С.В. Селищев

ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СОВМЕСТИМОСТИ НАНОКОМПОЗИТОВ, СОЗДАННЫХ ЛАЗЕРНЫМ МЕТОДОМ

Аннотация

Описаны результаты экспериментов in vivo по биосовместимости и замещению хрящевой ткани кролика объемным нанокомпозитным материалом, изготовленным лазерным методом. Показана возможность применения исследованных нанокомпозитов в качестве имплантатов в хрящевую ткань животных.

Трудности, присущие ряду областей хирургии и сопутствующих дисциплин, которые возникают при необходимости восстановления сплошности биологических тканей в случае радикальных онкологических операций и при последствиях сложных стоматологических травм, заставляют обратить особое внимание на поиск новых способов соответствующего консервативного лечения. Сходная проблема существует и в случае необходимости преодолении осложнений (в т. ч. послеоперационных) в развитии ребенка, отягощенном такими врожденными пороками развития человека, как незаращение (расщепление) неба и другие подобные заболевания глотки [1], [2].

Определенное продвижение в этой области может быть связано с использованием последних достижений биомедицинской наноинженерии по созданию экологически чистой технологии лазерного наноформирования на основе вводно-белковых дисперсий углеродных нанотрубок [3].

Используемый в медицинских целях наноматериал должен быть биосовместимым, т. е. не отторгаться клетками организма, биорезорбируемым – постепенно растворяться в среде организма, замещаясь на биологическую ткань, и биоактивным – допускать размножение и развитие клеток, являясь источником строительного материала для растущих органов. В идеале наноматериал должен обеспечивать регенерацию тканей человеческого организма. При выполнении этих условий он вполне может быть использован в качестве имплантата для лечения указанных выше заболеваний.

Углеродные нанотрубки проявляют уникальные электрические, структурные и механические свойства, что делает возможным их использование в качестве наноразмерных строительных блоков при конструировании новых функциональных материалов. В связи с этим становится возможным создание композитов на основе углеродных нанотрубок для медико-биологических применений. Принципиальная пригодность углеродных нанотрубок для направления роста, развития и ветвления живых нервных, костных и стволовых клеток была продемонстрирована в [5]-[7]. Таким образом, одной из многообещающих областей использования нанотрубочных композитов может быть восстановление поврежденных или деградированных биологических тканей.

Известно, что традиционные методы хирургического протезирования сталкиваются с определенными трудностями. В связи с этим в качестве заполняющего материала хирургических имплантатов были предложены объемные нанокомпозиты, изготовленные при испарении воды из растворов бычьего сывороточного альбумина с углеродными нанотрубками под действием теплового и, предположительно, ориентирующего действия лазерного излучения [4]. Выбор хорошо растворимого глобулярного белка – альбумина, осуществляющего в организме человека и животных транспортную функцию, был обусловлен успешным опытом его применения в составе лазерных биопрепоев [8].

Методы исследования

Изготовление нанокомпозитов проводится с использованием установки, представленной на *рис. 1*. В состав установки входят: источник лазерного излучения 1 со световодным выводом излучения 2; стакан 4 с облучаемой водно-альбуминовой суспензией 3; штатив 5 с цанговым зажимом для фиксации и закрепления волоконного световода 2 и термопары; перемещаемый столик 6 со стаканом 4 и препаратор 5. В комплект установки входят также инфракрасный пирометр – термометр «Optris MiniSight» (7) – и электронный термопарный измеритель температуры 8 (мультиметр DT 832).

В качестве источника излучения используется ИК непрерывный диодный лазер (длина волны генерации $\lambda_{ген}$ = 0,97 мкм). Мощность излучения на оптоволоконном выходе лазера составляет 10…15 Вт.

Нанокомпозиты получали путем испарения под действием лазерного облучения жидкостной компоненты 25…40 % рабочих водных дисперсий альбумина с концентрацией углеродных нанотрубок от 0,1 до 0,3 вес. % (без учета влияния наличия остаточного аморфного углерода и частиц никелевого и железного катализатора, используемого при изготовлении нанотрубок). Качество полученного наноматериала зависело от интенсивности и длительности облучения, причем консистенция материала могла варьироваться от резиноподобной (в случае испарения меньшей части воды и при ма-

лой дозе облучения) до твердой, стеклообразной (при практически полном испарении воды и большой дозе облучения).

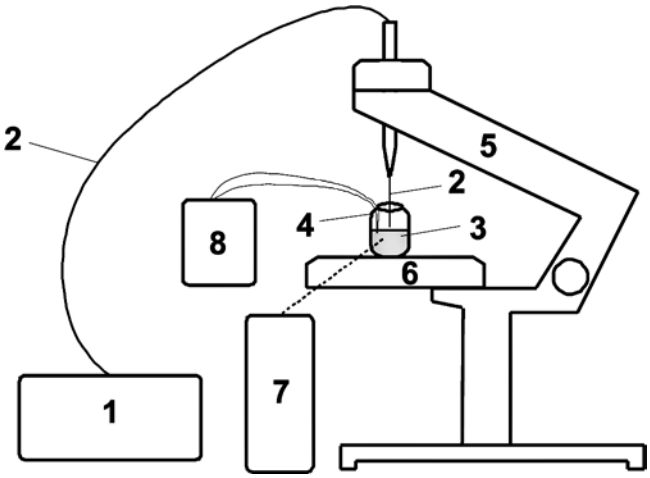


Рис. 1. Установка для изготовления нанокомпозиционных материалов

Подготовка эксперимента

Для участия в первоначальных испытаниях на биосовместимость (аллергентная проба) были использованы два карликовых кролика (самец и самка) возрастом 9 месяцев, массой 0,5 кг (*рис. 2а-в*). В качестве вводимых препаратов использовались свежеприготовленная 25%-ная водная дисперсия альбумина (I) и нанотрубочный материал, изготовленный на основе этой дисперсии, с многослойными углеродными нанотрубками типа «Таунит», при концентрации 0,3 мас. % (II).

Перед проведением исследования ушные раковины кроликов протиралась ватным тампоном, смоченным в 70%-ном растворе этилового спирта. В качестве местной анестезии использовался 2%-ный анестезирующий раствор лидокаина гидрохлорида. С целью сравнения результатов каждому кролику в правое ухо вводили препарат (I), а в левое – препарат (II).

В экспериментах по исследованию возможности имплантационного применения объемных нанокомпозитов был использован кролик породы «Русский великан» возрастом 10 месяцев и весом 8 кг. В экспериментах применяли два вида нанокомпозитов: содержащий многослойные углеродные нанотрубки с концентрацией 0,1 мас. %, изготовленные в Московском институте электронной техники (III), и содержащий однослойные углеродные нанотрубки фирмы «Нанокарблайт» с той же концентрацией (IV).

От указанных образцов композита стерильным хирургическим скальпелем были отколоты фрагменты (сколы). Методика подготовки к испытаниям была аналогична описанной выше. Хирургическим скальпелем на обработанный участок ушной раковины наносили продольный надрез длиной около 20 мм, доходящий до хряща. После освобождения участка хряща от надхрящницы из хряща извлекали фрагмент (1) размером порядка $10\times5\times1$ мм^3 (*рис. 3а*). В полученный после удаления рассеченный участок вставляли аналогичный по размерам скол нанокомпозита (2). Оставшийся участок надреза длиной около 10 мм был выбран в качестве контрольной зоны. В левое ухо животного вводили образец нанокомпозитов III, в правое – образец нанокомпозитов IV (*рис. 3б*).

Для предотвращения расхождения краев раны средняя часть разреза между введенным нанокомпозитом и контрольной зоной была стянута хирургической нитью. После наложения шва на рассеченный участок наносили 25%-ный водный раствор БСА, после чего в течение 10…20 с выполняли лазерную сварку прооперированного участка (*рис. 3в*).

Результаты

За состоянием карликовых кроликов наблюдали в течение месяца, заживление проходило без отклонений и аллергических реакций. Таким образом, введение раствора альбумина и водного раствора альбумина с углеродными нанотрубками в ухо кроликов не вызывало аллергических реакций



а) б) в)

Рис. 2. Введение под надхрящницу в ушной хрящ кролика образца дисперсии альбумина с углеродными нанотрубками (а); вид уха кролика после введения препарата (б); вид кроликов через 3 недели после операции (в)

животных, что позволило сделать вывод о биосовместимости этих препаратов.

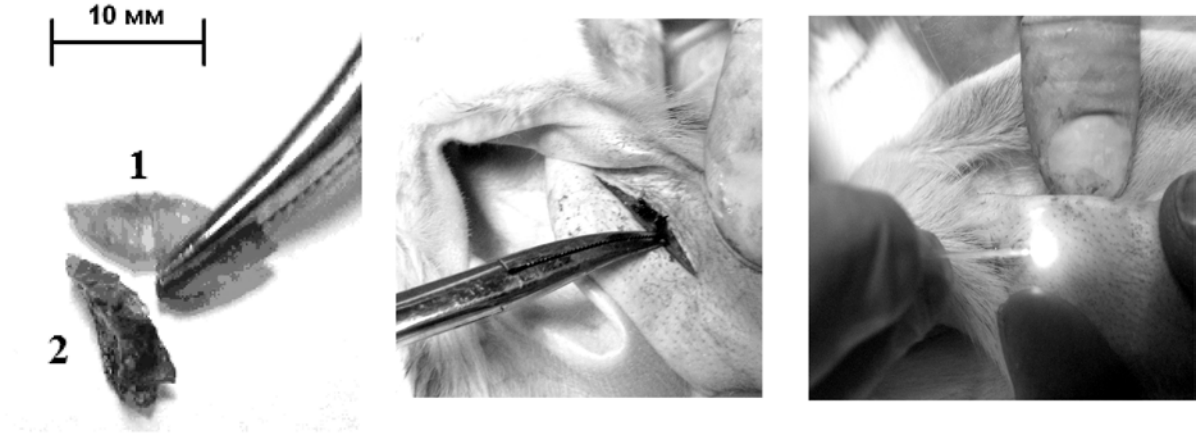
Состояние кролика породы «Русский великан» отслеживали на протяжении 70 дней после операции. Через 10 дней на внутренней стороне правого уха рана была покрыта сухой, тонкой, не отторгающейся корочкой. С внешней стороны уха было видно покраснение кожи со слабовыраженными признаками хондроперихондрита. На левом ухе рана была в хорошем состоянии, покрыта сухой, начинающей отторгаться по краям корочкой. Признаков хондроперихондрита не было выявлено.

На 21-й день после операции на внутренней стороне правого уха рана была в хорошем состоянии, покрыта сухой, не отторгающейся корочкой. С внешней стороны уха были видны признаки утолщения хряща. На левом ухе были более выражены деструктивные процессы, хотя не было повреждения хряща насквозь. Корочка была более сухая, чем на правом ухе, заживление происходило медленнее. Эпителизация на обоих ушах еще не началась.

Через 35 дней после операции на внутренней стороне правого уха корочка постепенно начинала отторгаться, но эпителизации еще не было. На левом ухе корочка отторглась, на месте имплантации наблюдался рост здоровой ткани и эпителизация.

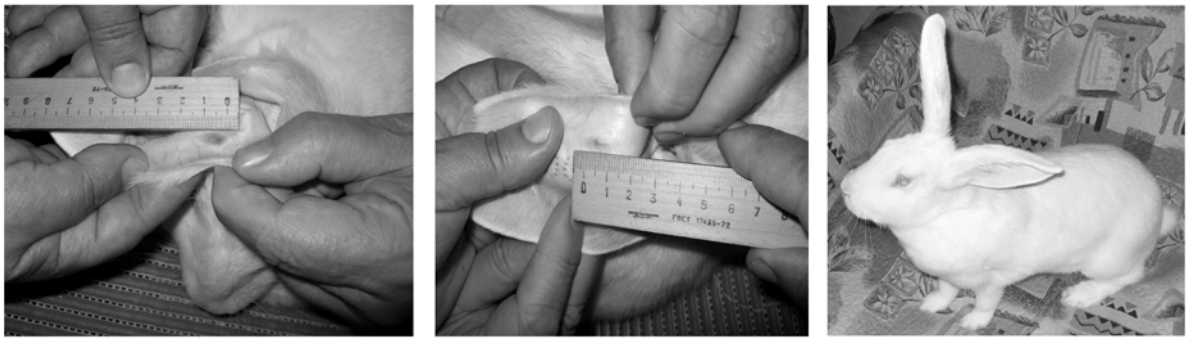
На 70-й день после операции на правом ухе послеоперационная ранка полностью заэпителизировалась, рубцовая ткань была довольно нежная, розового цвета, в центре ее небольшая корочка размером 1×1 мм (*рис. 4а*). На левом ухе ранка заэпителизировалась, имелась небольшая корочка размером 2×1 мм, которая возвышалась над грубыми рубцами. Прощупывалось утолщение хряща в нижних отделах послеоперационного поля (*рис. 4б*). Вид ушей кролика на 70-й день после операции позволял констатировать практическое залечивание операционных ранок животного, т. е. замещение хрящевой ткани кролика объемным композитным материалом на нанотрубочной основе, изготовленным лазерным методом. Характер поведения и вид кролика через 10 недель после операции (*рис. 4в*) были вполне нормальны.

Для уточнения состояния краев дефекта хряща был выполнен анализ гистологических препаратов участка левого уха кролика в области повреждения, результаты которого показаны на *рис. 5*. Материал был забран у животного на 70-е сутки после операции. Он был фиксирован в 10%-ном нейтральном формалине. Кусочки ткани заливались в парафин. На микротоме готовили срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином.



а) б) в)

Рис. 3. Имплантация нанокомпозитов: а) – извлеченный сегмент хряща (1) и фрагмент нанокомпозита (2); б) – замещение удаленного сегмента хряща нанокомпозитом; в) – лазерная сварка места операции



а) б) в)

Рис. 4. Правое (а) и левое (б) ухо кролика; вид кролика через 10 недель после операции (в)

На *рис. 5а* изображены анатомические элементы гистологии участка операционного шва, представляющие собой хрящ (1), надхрящницу (2), ретикулиновые волокна (3) и капилляр (4). На *рисунке* наблюдаются также участки отека (5) и дефекта хряща (6). На *рис. 5б* показан вид хондроцитов (хрящевых клеток, определяющих основные физиологические процессы в хряще) на участке операционного шва, на *рис. 5в* приведены для сравнения литературные данные о виде хондроцитов [9].

В результате гистологического исследования было установлено, что надхрящница сохранена во всех препаратах. Структура хряща также была сохранена, имел место нерезко выраженный отек матрикса. В центральных участках обнаруживался участок, не содержащий хондроцитов, а представленный ретикулиновыми и нежными коллагеновыми волокнами без неспецифической клеточной пролиферации.

В ряде препаратов на месте введения образца нанокомпозита происходило формирование пролиферирующих хрящевых капсул, содержащих хондроциты различной степени зрелости.

Встречались комплексы пролиферирующих капсул различной величины и формы, также содержащих хондроциты различной степени дифференцировки. В последующем они соединяются, формируя подобие симпласта, результатом чего является восстановление непрерывности структуры гиалинового хряща.

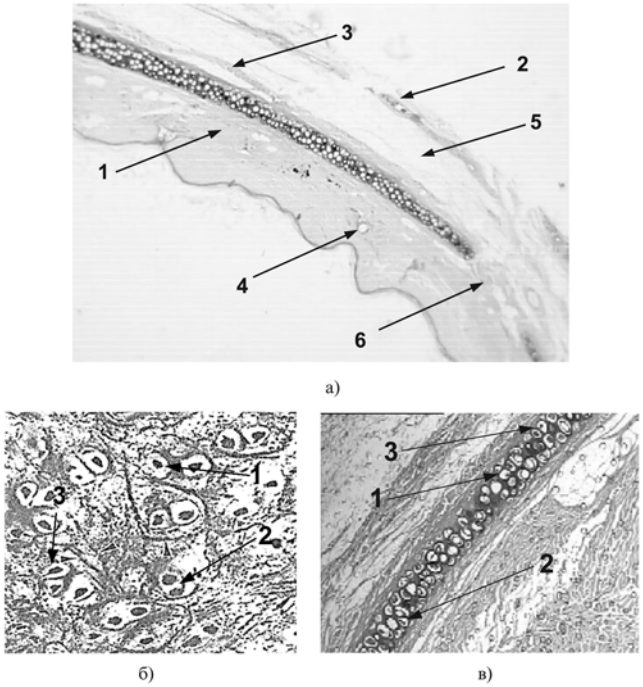


Рис. 5. Гистологическая картина участка операционного шва через 10 недель после операции и литературные данные о виде хондроцитов:
а) – анатомические элементы гистологии участка операционного шва; б) – вид хондроцитов на участке операционного шва (1 – исходные хондроциты; 2 – хондроциты в стадии деления; 3 – разделенные хондроциты после деления); в) – литературные данные (1 – обычный хондроцит; 2 – деление хондроцита; 3 – разделенные хондроциты)

На *рис. 5* можно видеть несколько видов хондроцитов – как исходных, так и находящихся в стадии деления и разделенных после деления. Учитывая слабо выраженную способность хондроцитов к делению в обычных условиях существования в живой ткани (что является одним из факторов, затрудняющих компенсацию хрящевых поражений) [10], можно сделать вывод о стимулирующем действии имплантированных нанокомпозитов на регенерацию хрящевой ткани.

Заключение

Проведенные эксперименты с карликовыми кроликами показали совместимость (отсутствие аллергических реакций) водной дисперсии бычьего альбумина и дисперсии углеродных нанотрубок на этой основе с биологическими тканями. Установлено, что после введения исследованных объемных нанокомпозитов в ушной хрящ кролика осуществляется замена хрящевой ткани нанокомпозиционным материалом. Через 10 недель после введения имплантата были обнаружены здоровая эпителизация и рост хрящевой ткани на месте замены извлеченного сегмента ушного хряща нанокомпозитом.

Таким образом, на модели кролика *in vivo* показана возможность применения исследованных объемных нанокомпозитов, созданных лазерным методом, в качестве имплантантов в хрящевую ткань животных. Техника имплантации с использованием таких нанокомпозитов может быть перспективна для купирования последствий онкологических операций и сложных стоматологических травм, а также при лечении опасных врожденных заболеваний младенческого возраста [11].

Авторы выражают благодарность сотрудникам Центра коллективного пользования «Нанотехнологии в электронике» МИЭТ и коллективу ООО «НПФ ««ДЕЛТАРУС» за содействие в работе и полезные советы.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-02-01114) и Министерства образования и науки РФ в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (государственный контракт № П1482).

Список литературы:

1. *Бернадский Ю.И.* Травматология и восстановительная хирургия челюстно-лицевой области. – М.: Медицинская литература, 1999. 456 с.
2. *Харьков Л.В., Харьков А.Л., Яковенко Л.Н.* Хирургическое и комплексное лечение врожденных дефектов челюстно-лицевой области у детей. Реальные достижения и нерешенные проблемы. – С.-Петербург: Книга плюс, 2005. 488 с.
3. *Андреева И.В., Баграташвили В.Н., Ичкитидзе Л.П. и др.* Исследование механических свойств биосовместимых объемных нанокомпозитов, изготовлен-

ных лазерным методом // Медицинская техника. 2009. № 6. С. 1-9.
4. *Подгаецкий В.М., Савранский В.В., Симунин М.М. и др.* Получение объемных нанокомпозиций на основе водного раствора альбумина под действием лазерного излучения // Квантовая электроника. 2007. Т. 37. № 9. С. 801-803.
5. *Mark P., Mattson M.P., Haddon R.C., Rao A.M.* Molecular Functionalization of Carbon Nanotubes and Use as Substrates for Nuronal Growth // J. Mol. Neurosci. 2000. Vol. 14. № 3. PP. 175-182.
6. *Zanello L.P., Zhao B., Hu H., Haddon R.C.* Bone Cell Proliferation on Carbon Nanotubes // Nano Letter. 2006. Vol. 6. № 3. PP. 562-567.
7. *Kam E.J., Kotov N.A.* Electrical Stimulation of Neural Stem Cells Mediated by Humanized Carbon Nanotube Composite Made with Extracellular Matrix Protein // Nano Letters. 2009. Vol. 9. № 1. PP. 273-278.
8. *Неворотин А.И.* Введение в лазерную хирургию. – Санкт-Петербург: Спецлит, 2000. 214 с.
9. *Радостина А.И., Юрина Н.А.* Гистология. – Татарстан: Медицина, 1995. 256 с.
10. *Баграташвили В.Н., Соболь Э.Н., Шехтер А.Б.* Лазерная инженерия хрящей. – М.: Физматлит, 2006. 487 с.
11. *Агеева С.А., Герасименко А.Ю., Елисеенко В.И. и др.* Исследование возможности применения метода лазерной наноинженерии в медицинских целях / III Евразийский конгр. «Медицинская физика». М, 2001. С. 266-268.

Светлана Александровна Агеева,
канд. мед. наук, ст. научный сотрудник,
Владимир Иванович Елисеенко,
д-р мед. наук, зам. директора,
ФГУ «ГНЦ лазерной медицины»,
г. Москва,
Александр Юрьевич Герасименко,
аспирант,
Леван Павлович Ичкитидзе,
канд. физ.-мат. наук, ст. научный сотрудник,
Виталий Маркович Подгаецкий,
д-р физ.-мат. наук, профессор,
Сергей Васильевич Селищев,
д-р физ.-мат. наук, профессор,
зав. кафедрой биомедицинских систем,
Московский государственный институт электронной техники (технический университет),
г. Зеленоград,
e-mail: podgaetsky@yandex.ru

ОБЗОРЫ

Г.П. Иткин, С.В. Селищев

РОТОРНЫЕ НАСОСЫ ДЛЯ ИСКУССТВЕННОГО И ВСПОМОГАТЕЛЬНОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Аннотация

В статье кратко описана история развития роторных насосов для искусственного и вспомогательного кровообращения. Показаны основные преимущества таких насосов перед пульсирующими, особенно при создании имплантируемых систем: это прежде всего миниатюризация, меньшее энергопотребление и стоимость. Показаны основные направления конструирования насосов, которые в основном базируются на конструкции подшипникового узла, являющегося наиболее критичным элементом данных насосов, определяющим ресурс их работы. Более детально рассмотрены осевые насосы. Приведены конкретные примеры коммерческих систем осевых насосов, используемых в клинике.

Клиническое применение аппаратов искусственного кровообращения (АИК) для проведения операций на открытом сердце началось в 50-е годы прошлого столетия. Разработка таких аппаратов потребовала прежде всего создания эффективных устройств для оксигенации крови и нетравматичных насосов. Последняя задача упрощалась тем, что время функционирования АИК определяется временем проведения операции на сердце, которое обычно не превышает 2…3 ч. Поэтому конструкция роликового насоса, предложенная известным американским хирургом М. Дебейки (M. DeBakey), оказалась наилучшим решением проблемы и широко используется до сих пор [1].

В 60-е годы прошлого столетия начали разрабатываться механические насосы для длительной частичной и полной замены сердца (от нескольких дней до нескольких лет). Этому способствовали прежде всего первые успехи трансплантации сердца в кардиохирургических клиниках мира. Уже с самого начала развития сердечной трансплантологии стало очевидным, что возможность обеспечения реципиентов донорскими органами крайне ограниченна. Поэтому первоначально цель разработки механических аналогов сердца основывалась на возможности найти альтернативное решение замены пораженного сердца. При этом ставились задачи как полной (искусственное сердце – ИС), так и