

На правах рукописи

Сошникова

Сошникова Юлия Михайловна

**СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ ПРИ
НЕРАЗРУШАЮЩЕМ ЛАЗЕРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ С ДЛИНОЙ
ВОЛНЫ 1,56 МКМ**

02.00.04 – физическая химия

02.00.09 – химия высоких энергий

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва 2015

Работа выполнена на Химическом факультете Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова и в Институте Проблем Лазерных и Информационных Технологий Российской академии наук.

Научные руководители:

академик РАН,
доктор химических наук, профессор
Лунин Валерий Васильевич

кандидат физико-математических наук
старший научный сотрудник
Баум Ольга Игоревна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор
Ванников Анатолий Вениаминович
ФБГУН «Институт физической химии
и электрохимии им. А.Н. Фрумкина» РАН

кандидат физико-математических наук
старший научный сотрудник
Залесский Александр Дмитриевич
ФБГУН «Институт химической физики
имени Н.Н. Семенова» РАН

Ведущая организация:

ФБГУН «Институт Биохимической Физики
имени Н.М. Эмануэля» РАН

Защита состоится «2» октября 2015 года в 15:00 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.90 по химическим наукам при Московском Государственном Университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 199991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Химический факультет, ауд. 446.

С текстом диссертации можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу г. Москва, Ломоносовский просп., 27.

Автореферат размещен на сайте химического факультета www.chem.msu.ru и на сайте ВАК <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан « » 2015 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук, доцент



Шилина М.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Изучение физико-химических свойств хрящевой ткани, таких как состояние коллагена, протеогликанов и хондроцитов хрящевой структуры, при неразрушающем лазерном воздействии, а также определение стабильности полезных лазерно-индуцированных изменений являются важнейшими задачами развития методов лазерной терапии хряща. Неравномерность лазерного нагрева инициирует локальное протекание неравновесных процессов, подлежащих выявлению и изучению. Неразрушающая лазерная модификация хрящевой ткани применяется в медицинских технологиях изменения ее формы [1] и активации клеточной регенерации при лечении болезней спины и суставов [2]. В основе обоих процессов лежит общий принцип направленной доставки тепла в малый объем хрящевой ткани в количестве, достаточном для достижения полезного эффекта при минимальном повреждении элементов структуры ткани. Безопасность воздействия для клеток и компонентов хрящевого матрикса является ключевым критерием оценки эффективности метода лазерной модификации. Локальность лазерного воздействия обеспечивает ряд преимуществ, заключающихся в снижении общей доли возможных повреждений клеток, коллагена и протеогликанов хрящевой структуры. Тем не менее, сохраняют актуальность вопросы контроля поглощения излучения, усиления полезного эффекта воздействия при снижении общей лазерной мощности. В методе лазерной коррекции формы полезным эффектом является релаксация механических напряжений в матриксе хряща, состоящего из коллагена и протеогликанов. Данный метод предложен в 1993 году для коррекции формы носовой перегородки [3]. Впоследствии он также стал применяться в операциях по изменению формы ушной раковины [4]. Реберный хрящ является новым в данной области материалом, перспективным для изготовления биоимплантатов при закрытии дефектов трахеи в операциях по лечению стеноза [5]. К началу настоящей работы какие-либо данные о возможности лазерно-индуцированной релаксации напряжений в реберном хряще полностью отсутствовали. Остается открытым вопрос о проведении эффективного и безопасного лазерного изменения его формы.

Управление поглощением лазерного излучения и локализация лазерного воздействия позволит контролировать процесс изменения формы, а также обеспечит безопасность процедуры для клеток и компонентов матрикса.

В методе лазерного лечения дегенеративных заболеваний полезный эффект представляет собой активацию пролиферативной и синтетической активности хондроцитов хряща в поврежденных областях ткани, а также расширение субмикропор хрящевой ткани для ускорения циркуляции жидкости, содержащей питательные вещества. Подробно изучены аспекты взаимодействия лазерного излучения с суставным хрящом и межпозвоночным диском [2]. Однако решение проблемы локализации лазерного воздействия в зонах повреждений и снижения возможного негативного влияния на соседние здоровые области ткани представляет собой актуальную задачу.

Одним из возможных решений может быть введение в хрящевую ткань добавок, поглощающих лазерное излучение, которыми могут служить биосовместимые наночастицы. Аспекты влияния наночастиц на компоненты хряща до и после его лазерной модификации необходимо изучать с целью определения безопасности их использования для диагностики и локализации лазерного воздействия.

Объектами исследования являлись реберный и суставной хрящи при их лазерной модификации, а также импрегнации биосовместимыми наночастицами магнетита Fe_3O_4 , стабилизированными в крахмальном растворе. В работе исследовалось состояние коллагена, протеогликанов и хондроцитов хрящевой ткани. Отдельные разделы посвящены вопросам лазерного изменения формы реберного хряща, не изученного ранее, а также синтезу и характеристике наночастиц, используемых в исследовании.

Цель работы состояла в исследовании структурных изменений при неразрушающей лазерной модификации реберного и суставного хрящей на разных уровнях их структурной организации. В работе использовались такие методы исследования структуры, как оптическая (ОМ), просвечивающая (ПЭМ) и атомно-силовая микроскопия (АСМ), гистохимия и гистология, рассеяние ИК излучения, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Для характеристики био-

совместимых наночастиц и их дисперсий применяли ПЭМ, динамическое лазерное светорассеяние (ДЛС), аналитическое ультрацентрифугирование (АУЦ).

В ходе работы решали следующие **основные задачи**:

1. Определение параметров и условий лазерного воздействия на реберный хрящ, приводящих к стабильному изменению его формы при отсутствии денатурации коллагена.
2. Определение состояние коллагена и протеогликановой подсистемы в модифицированном реберном и суставном хрящах.
3. Определение состояния хондроцитов в модифицированном реберном и суставном хрящах.
4. Синтез и характеристика стабильных дисперсий наночастиц магнетита с заданным распределением по размерам.
5. Проведение импрегнации наночастиц в интактную и модифицированную хрящевую ткань сустава и ребер
6. Анализ кинетики импрегнации и распределения наночастиц в интактной и модифицированной ткани.
7. Исследование влияния наночастиц на коллаген, протеогликаны и хондроциты хрящевой структуры.

Научная новизна

В данной работе впервые проведена ИК лазерная модификация формы реберного хряща с получением стабильной новой формы и показана безопасность найденных условий воздействия для коллагена хрящевой структуры. Обнаружен эффект нелинейного термомеханического поведения хрящевой ткани в зависимости от порядка двустороннего облучения. Впервые для микроструктурных исследований хрящевой ткани использованы наночастицы и показана безопасность наночастиц магнетита для коллагена, протеогликанов и хондроцитов хряща. Предложен метод импрегнации наночастиц в хрящевую ткань и изучена кинетика импрегнации. Продемонстрирована способность наночастиц избирательно проникать в субмикроразрывы хрящевой структуры.

Защищаемые положения:

1. Возможно получить стабильную новую форму реберного хряща без денатурации коллагена при воздействии лазерного излучения с длиной волны 1,56 мкм.
2. Скорость импрегнации и распределение вошедших в хрящевую ткань наночастиц магнетита со средним диаметром 50 нм характеризуют состояние микроструктуры хряща.
3. Импрегнация наночастиц магнетита при концентрации до 10 мкг/мл не приводит к дополнительным изменениям структуры коллагена, протеогликанов при лазерном воздействии с длиной волны 1,56 мкм и не увеличивает степень клеточных изменений.

Практическая значимость работы состоит в непосредственном применении метода лазерного изменения формы реберного хряща для изготовления имплантатов в клинических операциях по закрытию дефектов стенки трахеи. Импрегнация магнитных наночастиц в микродефекты хрящевой структуры может быть применена для управления поглощением излучения в методах лазерной коррекции формы хряща и регенерации хряща, а также для проведения ранней диагностики дегенеративных заболеваний хряща, благодаря установленной способности наночастиц концентрироваться в области структурных повреждений.

Личный вклад соискателя заключается в проведении экспериментальной работы по лазерной модификации хрящевой ткани, обработке и анализу ее результатов. Соискателем синтезированы наночастицы магнетита, предложен и осуществлен метод их стабилизации на основе анализа литературных данных. Соискателем лично проводились исследования методами атомно-силовой микроскопии, динамического светорассеяния и рассеяния ИК излучения, а также подготовлены основные публикации по данной работе. Гистологические и гистохимические исследования, АУЦ, ПЭМ, ДСК проводились при непосредственном участии соискателя. Соискателем проанализированы и обобщены результаты работы, сформулированы выводы и защищаемые положения.

Апробация работы

Результаты работы докладывались на всероссийских и международных конференциях, в частности, на конференциях «Медицинская физика и инновации в медицине» в 2012, 2013 и 2014 г. (г. Троицк), «Лазеры и лазерно-информационные технологии: фундаментальные проблемы и применения» ИЛЛА (2014 г., Шатура), междисциплинарном научном форуме Moscow Science Week XII (2014 г., Москва), IV Съезде биофизиков России (2012 г., Нижний Новгород), Ломоносовских чтениях (2013 г., Москва), на международной конференции Advanced Laser Technologies (2013 г., Черногория). Результаты работы дважды (в 2013 и 2014 г.) отмечены первой премией Конкурса научных работ молодых ученых и специалистов ИПЛИТ РАН им. В.С. Голубева, а также дипломом первой степени Всероссийского молодежного Самарского конкурса-конференции научных работ по оптике и лазерной физике (2014 г. Самара). Работа поддержана грантами Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 11-02-92614-КО_a, № 11-08-00574_a, в том числе молодежным грантом № 12-08-31367 мол_a под руководством автора работы.

Публикации

Основные результаты работы изложены в 5 научных статьях, опубликованных в рецензируемых ведущих российских и зарубежных журналах в 2011 – 2014 гг., таких как Перспективные Материалы, Lasers in Surgery and Medicine, Journal of Nanoparticle Research, Proceedings of SPIE.

Объем работы

Диссертация состоит из Введения, четырех глав и Заключения и содержит 102 страницы текста, включая 48 рисунков, 11 таблиц и библиографию из 121 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность структурных исследований хрящевой ткани при лазерном воздействии, сформулированы основные задачи и цель исследования.

Глава 1 диссертации представляет собой обзор литературы, который состоит из трех разделов. **Раздел 1.1** обобщает информацию об имеющихся к настоящему времени данных о структуре хряща и процессах, происходящих при ее лазерной модификации, а также актуальных проблемах деградации хрящевой ткани. **Раздел 1.2** посвящен методам лечебного лазерного воздействия на хрящ. Подробно описан процесс выбора оптимальных лазерных параметров, а также проблемы ранней диагностики деградации хряща и локализации воздействия. В **Разделе 1.3** рассмотрены методы исследования структуры хрящевой ткани. Представлены результаты проводившихся ранее микроскопических, спектроскопических, калориметрических и гистохимических исследований хряща при лазерном воздействии. В **Разделе 1.4** сформулированы требования к наночастицам для диагностики и структурных исследований биологической ткани, обоснован выбор типа наночастиц для импрегнации в хрящевую ткань и методов их характеристики.

Глава 2 посвящена описанию и анализу результатов лазерного изменения формы реберного хряща. В **Разделе 2.1** представлены используемые в этой части работы экспериментальные методы:

2.1.1 Лазерное облучение

Пластины свиного реберного хряща толщиной 3 мм механически изгибались и облучались эрбиевым волоконным лазером ($\lambda = 1,56$ мкм, LSC, Arguo Medical Inc.). Мощность лазера изменялась в пределах от 1 до 2,5 Вт, время экспозиции от 5 до 20 с при импульсно-периодическом воздействии с длиной импульса 500 мс и частотой 1,4 Гц. Диаметр лазерного пятна составлял 3,0 мм. Контроль температуры нагрева осуществлялся при помощи термопары, расположенной на периферии лазерного контактора. Для каждого режима воздействия путем фотофиксации в течение 24 ч после облучения измерялась динамика достижения стабильной кривизны и стабильный радиус кривизны.

2.1.2 Дифференциальная сканирующая калориметрия проводилась для определения степени денатурации коллагена в лазерно-модифицированном хряще. Измерения проводились в диапазоне температур 25 - 100°C, скорость нагрева составляла 10°C/мин (DSC20, Mettler TA4000). Образцы (0,5 мм толщиной и 4 мм

диаметром) выделялись из облученного и интактного хряща. Значения энтальпии рассчитывались на грамм образца, высушенного при 50°C до постоянной массы. Разделы 2.2-2.6 посвящены анализу результатов лазерного изменения формы. Стабильные значения кривизны достигались образцами за 20 мин после лазерного воздействия при помещении их в физиологический раствор. Экспериментально выявлен нелинейный термомеханический эффект лазерного изменения формы хрящевых пластин при облучении их растянутой и сжатой сторон в различных последовательностях: при облучении сначала сжатой, а потом растянутой поверхности хрящевого полукольца (I порядок облучения) наблюдался более выраженный эффект конечной кривизны, чем в обратном порядке (II порядок облучения) (Табл.1).

Таблица 1. Радиусы кривизны хрящевых пластин, измеренные через 24 часа после лазерного воздействия для различных последовательностей облучения.

Параметры лазера, мощность и время экспозиции	Радиус кривизны, мм	
	<i>I порядок облучения</i>	<i>II порядок облучения</i>
1,8 Вт 15 с	50±3	59±3
2,0 Вт 12 с	44±2	49±2
2,2 Вт 6 с	37±1	40±2

Значения тепловых эффектов для интактного и модифицированного хряща, полученные из анализа термограмм ДСК, лежат в диапазоне 2 – 4 Дж/г, что существенно ниже значения теплового эффекта денатурации коллагена в 65±5 Дж/г [7]. Статистических различий между эффектами для интактного и модифицированного хряща не выявлено, что свидетельствует об отсутствии заметных термических повреждений структуры коллагена при лазерном воздействии для выбранных параметров изменения формы (Табл.2).

Таблица 2. Результаты ДСК анализа для интактного и облученного хряща.

Тип образца	Температура фазового перехода, °С	Тепловой эффект, Дж/г
<i>Интактный</i>	70±5	3±1
<i>Облученный в режиме коррекции формы</i>	70±10	3±1

Основные выводы главы 2: (1) установлена возможность ИК-лазерного изменения формы реберного хряща; (2) порядок облучения влияет на конечную кривизну имплантата; (3) заметные термические повреждения структуры коллагена в лазерно-модифицированном хряще отсутствуют.

Глава 3 посвящена синтезу и характеристике наночастиц магнетита и их импрегнации в хрящевую ткань. В **Разделе 3.1** дано описание экспериментальных методов.

3.1.1 Синтез наночастиц магнетита. Использовали реактивы марки «ч.д.а»: тетрагидрат хлорида железа II $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, гексагидрат хлорида железа III $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 25%-ный водный раствор аммиака, картофельный крахмал. Реакцию проводили в водной среде, через которую предварительно пропускали аргон, по следующей схеме:



При комнатной температуре соли железа смешивали в стехиометрических количествах и добавляли к смеси раствор крахмала различных концентраций в соотношении (1:1). При непрерывном перемешивании к смеси прикапывали раствор аммиака до приобретения смесью устойчивой черной окраски. pH среды составлял 12. Смесью перемешивали в течение 15 мин. Затем осадок магнетита промывали дистиллированной водой и высушивали в инертной атмосфере при комнатной температуре.

3.1.2 Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и электронная дифракция. Анализ морфологии и распределения наночастиц магнетита проводили на электронном микроскопе JEOLJEM-2000 FXII (JEOL Ltd., Japan) при величине ускоряющего напряжения 200 кВ, высушивая каплю дисперсии наночастиц при комнатной температуре на ультратонком полимерном слое в центре медной подложки диаметром 3 мм.

3.1.3 Динамическое лазерное светорассеяние (ДЛС). Анализ распределения наночастиц в водных дисперсиях проводили на фотометре лазерного светорассеяния Zetasizer Nano ZS (Malvern, Great Britain), снабженном He-Ne лазером ($\lambda = 633$ нм, мощность 4 мВт). Обработку данных осуществляли в программе DynalS, по-

лучая распределения гидродинамических радиусов (R_h) и значения индексов полидисперсности (PIs).

3.1.4 Аналитическое ультрацентрифугирование (АУЦ). Измерения распределения фракции наночастиц размером менее 10 нм проводили на аналитической ультрацентрифуге Beckman (Palo Alto, USA) Model E Spinco, снабженной оптической системой измерения поглощения. Скорость вращения ротора составляла 24 000 об/мин. Поглощение измеряли на длине волны 340 нм. Скорость седиментации вещества определяли при 20°C. Седиментационные коэффициенты рассчитывали из дифференциального распределения коэффициентов [$c(s)$ от s] в программе SEDFIT. Средние значения коэффициентов седиментации образцов были получены интегрированием распределений $c(s)$.

3.1.5 Импрегнация наночастиц магнетита в хрящевую ткань. Пластины суставного и реберного хряща толщиной 1,5 – 2 мм фиксировали на дне цилиндрических кювет, которые заполняли водной дисперсией наночастиц магнетита концентрации 2 мг/мл и выдерживали в течение 20 мин. Импрегнация наночастиц осуществлялась диффузией из водной дисперсии. Исследовали три типа образцов хряща: (1) интактный, (2) модифицированный лазером, (3) модифицированный лазером с приложением постоянного магнитного поля 2000 Гаусс в процессе импрегнации наночастиц.

3.1.6 Оптическая фотометрия для анализа кинетики импрегнации наночастиц в хрящевую ткань. Скорость диффузии наночастиц в реберный и суставной хрящ для (1) – (3) типов импрегнации рассчитывалась путем измерения оптической плотности срезов ткани толщиной 0,5 мм, содержащих профиль импрегнации наночастиц за 75 ч, при прохождении через них белого света, сгенерированного диодным источником. Оптическая плотность хряща определялась по изменению интенсивности прошедшего света вдоль направления от поверхности импрегнации к периферии, которая фиксировалась камерой высокого разрешения Sony DCR-TRV40E и анализировалась в графическом редакторе. Коэффициенты диффузии рассчитывались на основе решения уравнения диффузии для полуограниченного тела [6].

В Разделах 3.2-3.4 приведены результаты структуры наночастиц и их анализ. На Рис.1 представлены результаты ПЭМ для нестабилизированных и стабилизированных крахмалом наночастиц. Можно видеть, что в присутствии крахмала наночастицы Fe_3O_4 имеют более узкое распределение по размерам и доля наблюдаемых агломератов существенно ниже. Средний размер нестабилизированных частиц составил 8 ± 4 нм, а стабилизированных крахмалом 6 ± 1 нм.

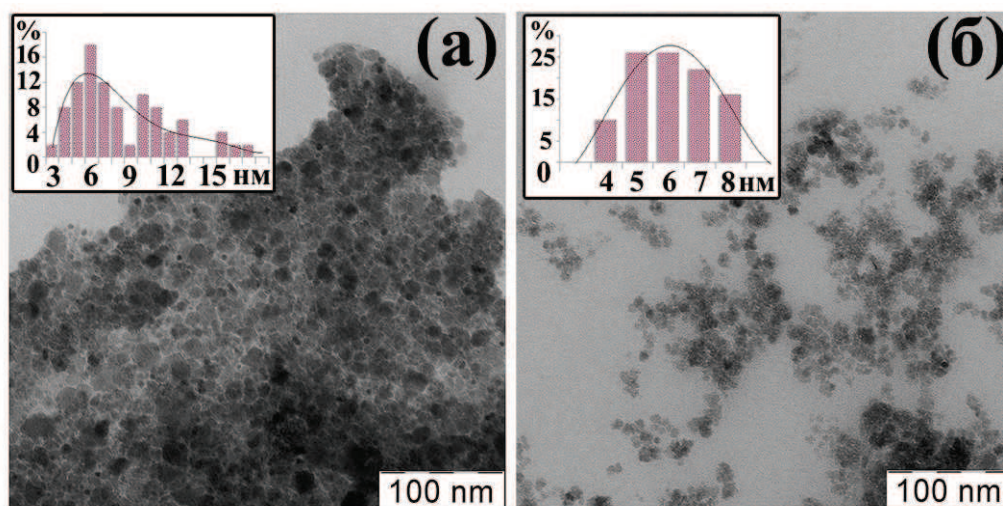


Рисунок 1. ПЭМ изображения (а) нестабилизированных и (б) стабилизированных крахмалом наночастиц Fe_3O_4 . На вставках приведены диаграммы распределения по диаметру.

Распределение по гидродинамическому радиусу наночастиц в их водной дисперсии, полученное методом ДЛС, позволяет оценить размер частиц с учетом их взаимодействия с молекулами крахмала и агломерации. На Рис.2 представлены данные ДЛС для дисперсий наночастиц магнетита, полученных в присутствии различных концентраций крахмала. Средние значения гидродинамических радиусов и индексов полидисперсности (PI) для концентраций крахмала 0,1, 0,5 и 1,0% (масс.) составляют 85 ± 6 нм ($PI = 0.44 \pm 0.04$), 48 ± 1 нм ($PI = 0.52 \pm 0.04$), и 33 ± 1 нм ($PI = 0.45 \pm 0.03$), соответ-

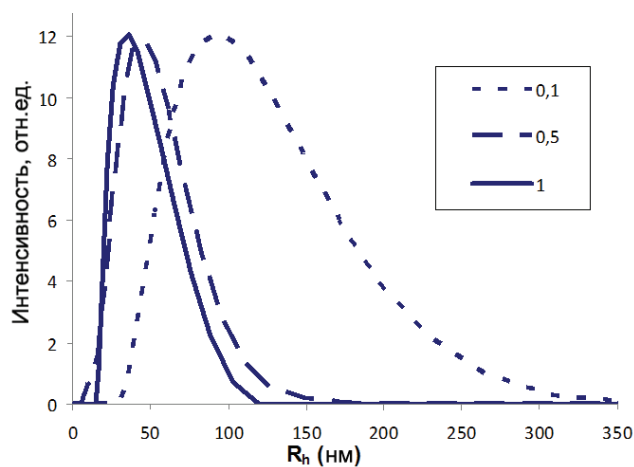


Рисунок 2. Распределение по гидродинамическому радиусу для водных дисперсий наночастиц магнетита при различных концентрациях крахмала. $T = 25^{\circ}C$.

ственно. Следовательно, увеличение концентрации крахмала в исследуемом диапазоне приводит к уменьшению среднего гидродинамического радиуса частиц. Методом ДЛС установлено, что полученные дисперсии стабильны при увеличении температуры до 70⁰С, а также при хранении при комнатной температуре в течение как минимум 7 суток. Так как ДЛС анализ чувствителен для частиц большого размера (> 10 нм), то для исследования фракции малых частиц использовали метод АУЦ. Центрифугированием (1800 g, 15 мин) предварительно отделяли крупные частицы. Полученные коэффициенты седиментации для дисперсий, содержащих 0,1, 0,5 и 1,0 % крахмала, составляют 15,0, 12,4 и 10,0 S, соответственно. Средние значения стоксовских радиусов для трех типов дисперсий составляют 4,9, 4,8 и 3,7 нм. Несмотря на близкие значения радиусов, наблюдается тенденция к уменьшению среднего размера частиц и сужению распределения при увеличении концентрации крахмала. Таким образом, варьируя концентрацию крахмала в исследуемом диапазоне можно влиять на распределение наночастиц.

В Табл.3 представлены значения коэффициентов диффузии наночастиц магнетита в хрящевую ткань, полученные в фотометрическом эксперименте для облученной и интактной ткани, а также при приложении магнитного поля.

Предварительное лазерное облучение хряща позволяет увеличить скорость диффузии на порядок величины. Как было установлено ранее, механизм неразрушающего лазерного воздействия на ткань подразумевает образование дополнительных пор и каналов хрящевой структуры [9], что может приводить к увеличению скорости диффузии наночастиц. Прило-

Таблица 3. Значения D для трех различных типов импрегнации.

Образец	Коэффициент диффузии D , см ² /с
Интактный	$(3 \pm 1) \cdot 10^{-9}$
Облученный	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-8}$
Облученный, импрегнация с приложением магнитного поля	$(1,60 \pm 0,65) \cdot 10^{-7}$

ложение магнитного поля в процессе импрегнации, в свою очередь, также увеличивает скорость диффузии наночастиц на порядок величины. Следовательно, маг-

нитное поле может быть использовано для управления процессом импрегнации наночастиц.

Основные выводы главы 3: (1) размерное распределение наночастиц Fe_3O_4 зависит от наличия и концентрации стабилизатора; (2) крахмальные дисперсии наночастиц стабильны при увеличении температуры до $70^{\circ}C$ и при хранении; (3) скорость импрегнации наночастиц Fe_3O_4 является магнитоуправляемой и зависит от состояния ткани.

Глава 4 посвящена структурным исследованиям лазерно-модифицированной и импрегнированной наночастицами хрящевой ткани. В **Разделе 4.1** дается описание экспериментальных методов:

4.1.1 Отбор и приготовление образцов сустава и ребер. Образцы суставного и реберного хряща готовили в виде цилиндров диаметром основания 2,0 мм и толщиной 1,5 – 2,0 мм. Общее число образцов составило 48 и 36 для суставного и реберного хряща, соответственно.

4.1.2 Лазерная модификация суставного и реберного хряща. Лазерное воздействие на реберный хрящ проводилось аналогично описанному в пункте 2.1.1. Модификацию свиного суставного хряща в режиме регенерации проводили с помощью эрбиевого волоконного лазера ($\lambda = 1,56$ мкм), доставляя излучение через кварцевое волокно диаметром 600 мкм. Воздействие осуществляли на цилиндры суставного хряща диаметром 2,0 мм и толщиной 1,5 мм. Терапевтические параметры лазерного воздействия, используемые для регенерации суставного хряща, были выбраны на основе анализа литературных данных [2]: мощность 0,7 Вт, время экспозиции 5 с при длине импульса 500 мс и частоте 1,4 Гц.. Контроль температуры поверхности хряща при лазерном облучении проводили с помощью тепловизора Testo, установленного под углом 30° по отношению к направлению лазерного луча.

4.1.3 Импрегнация наночастиц магнетита в хрящевую ткань сустава и ребер проводилась аналогично п.3.1.5 при концентрации наночастиц 10 мкг/мл.

4.1.4 Гистология и гистохимия для определения состояния хондроцитов, коллагена и протеогликанов в лазерно-модифицированном хряще. Образцы су-

ставного хряща и хряща ребер фиксировались в 10%-ном нейтральном формалине, заливались в парафин. Срезы 4-5 мкм готовили на микротоме, делили на три группы, которые окрашивали различными индикаторами: (1) гематоксилином и эозином для определения степени клеточных изменений, (2) пикрафуксином по Ван-Гизону на коллагеновые волокна и (3) толуидиновым синим на кислые гликозамингликаны (ГАГ). Срезы просматривались на микроскопе Longway LCX-121S и фотографировались с помощью камеры DEM200 MiniSee (программа обработки Scope Photo).

4.1.5 ПЭМ хрящевой ткани для анализа распределения импрегнированных наночастиц и состояния хондроцитов, коллагена, протеогликанов. Срезы хряща 20 – 30 нм толщиной, окрашенные уранилацетатом, анализировали на формваровых подложках, помещенных в центр медной бленды, на электронном микроскопе Jeol JEM-1011 при величине ускоряющего напряжения 80 кВ.

4.1.6 АСМ хрящевой ткани для анализа состояния микроструктуры коллагена хряща в лазерно-модифицированном хряще. Интактную и модифицированную лазером структуру хрящевой ткани исследовали с помощью атомно-силового микроскопа Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara, USA). Срезы толщиной 20 мкм готовили с помощью криомикротомы и расправляли на стеклянных подложках. Высотные профили получали на воздухе при комнатной температуре с помощью сканирующего зонда из нитрида кремния в бесконтактном режиме при частоте сканирования 1,5 Гц и резонансной частоте 2,0 В. Данные анализировались в программе Gwyddion 2.03.

4.1.6 Измерение пропускания ИК излучения для определения влияния наночастиц магнетита на поглощение. Анализ проводили на установке, снабженной детектором прошедшего ИК излучения, тепловизором и системой позиционирования образца. Воздействие на образцы хряща толщиной 1 мм осуществляли эрбиевым волоконным лазером с длиной волны 1,56 мкм через волокно диаметром 600 мкм в непрерывном режиме (1 Вт, 50 сек). Образец находился на расстоянии 5 мм от излучающего волокна и на 10 мм перед принимающим волокном.

В Разделах 4.2-4.6 приводятся результаты и их анализ. Профили поверхности интактного и облученного лазером в режиме коррекции формы хряща, полученные методом АСМ, приведены на Рис. 3. Можно видеть, что лазерная модификация приводит к расширению пористой структуры хряща и увеличению перепада высот анализируемой поверхности в 3 – 4 раза. Средняя (R_a) и среднеквадратичная (R_{ms}) шероховатость поверхности межклеточного матрикса реберного хряща на микроуровне (при анализе участков 5x5 мкм) составляет, соответственно, 15 ± 3 нм и 18 ± 3 нм для интактного и 29 ± 4 нм и 37 ± 5 нм для облученного в режиме коррекции формы. Как было показано ранее, развитие дефектов хрящевой структуры на ранних стадиях таких заболеваний, как артрит, происходит на уровне молекулярной организации коллагена с нарушением его фибриллярной структуры [8].

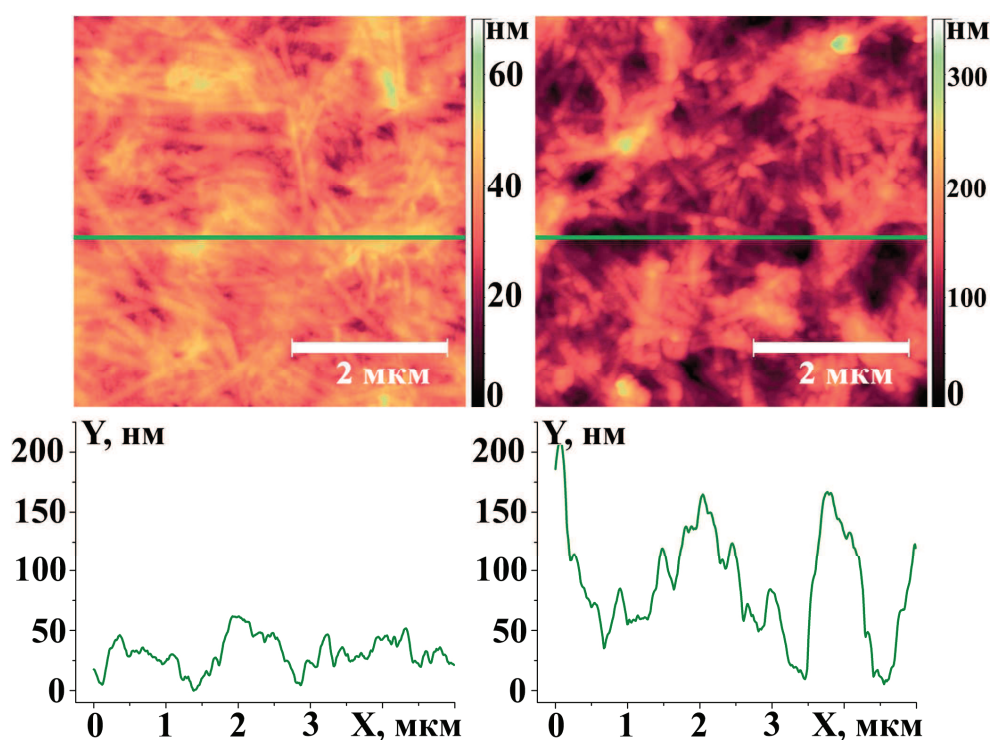


Рисунок 3. АСМ изображения поверхности интактного (слева) и облученного (справа) реберного хряща (режим высоты). Графические профили высоты (внизу) соответствуют координатам линии на изображении.

Таким образом, процесс лазерно-индуцированного образования субмикропор может быть использован для моделирования ранних стадий хрящевой деградации. Структура коллагена для хряща, в котором с помощью лазерного воздействия моделировался процесс ранней деградации, представлена на Рис.4а. Грани-

цы коллагеновых фибрилл размыты, и периодичность проявляется слабо (Рис.4в), в то время как для интактного хряща (Рис.4б) наблюдается четко выраженная периодичность, которая составляет 62 ± 7 нм (Рис.4г).

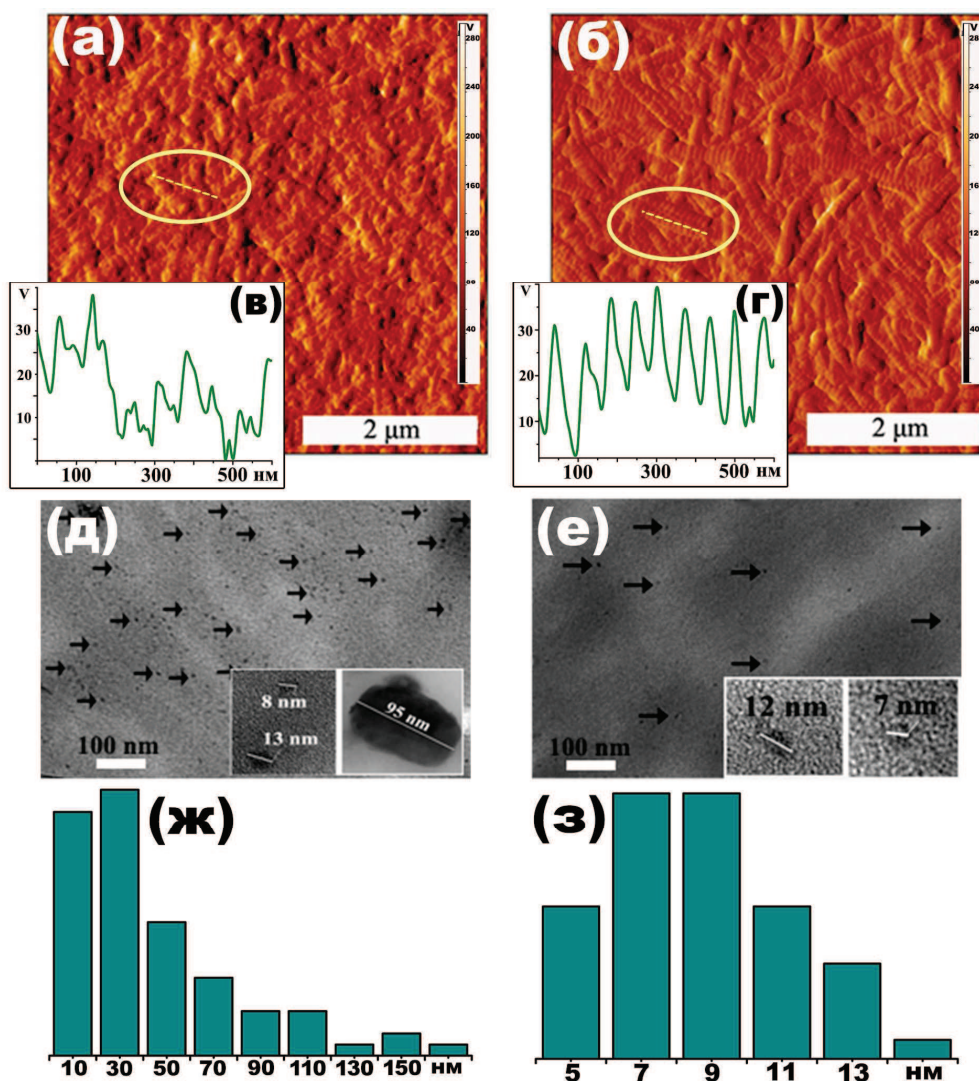


Рисунок 4. Изображения АСМ (а) поврежденной (повреждения моделировались лазерным нагревом низкой интенсивности), (б) интактной поверхности реберного хряща (режим амплитуды). На вставках профили коллагеновых фибрилл (на изображении отмечены желтыми пунктирными линиями): (в) – профиль с неровными очертаниями и нечеткой периодичностью 82 ± 25 нм, (г) – профиль с ровными очертаниями и четкой периодичностью 62 ± 7 нм. ПЭМ изображения (д) поврежденной и (е) интактной структуры. Наночастицы указаны стрелками. На вставках увеличенные изображения отдельных наночастиц, наблюдаемых в структуре данного типа. Размерные распределения наночастиц для (ж) поврежденного и (з) интактного хряща.

Согласно данным ПЭМ анализа (Рис.4д,е). Поврежденный хрящ содержит сравнительно высокую концентрацию наночастиц, размер которых варьируется от 5 до 150 нм (Рис.4ж). Отдельные агломераты наночастиц имеют размер 150 – 200

нм, что соответствует размеру субмикропор, наблюдаемых с помощью АСМ. В интактной структуре хряща наблюдается сравнительно небольшая концентрация частиц малого размера в среднем от 5 до 15 нм (Рис.4з). Таким образом, импрегнация наночастиц с широким распределением по размерам позволяет выявлять структурные особенности хрящевой ткани, такие как наличие наноразмерных дефектов, а размер и концентрация импрегнированных наночастиц зависят от степени деградации.

При анализе срезов облученного хряща, окрашенных уранилацетатом, можно видеть, что наночастицы, проникающие в глубь хряща (более 30 мкм) аккумулируются и концентрируются преимущественно в околклеточном матриксе, что может свидетельствовать о наличии в данной области пор и каналов, образовавшихся в результате лазерного воздействия (Рис.5а). Агломераты наночастиц имеют размер 100 – 230 нм и состоят из 4 – 15 сферических частиц размером 15 – 20 нм (Рис.5б). В контрольных образцах без наночастиц, подвергнутых лазерному воздействию аналогично образцам с наночастицами, наблюдались электронно-прозрачные области околклеточного матрикса, заполненные мелкозернистым веществом нефибриллярного коллагена и протеогликанов (Рис.5в). Анализ интактных образцов показал, что в необлученном хряще околклеточный матрикс в основном заполнен мелкофибриллярным коллагеном и протеогликанами и является более электронно-плотным, чем в облученном (Рис.5г). При этом в структуре межклеточного матрикса для всех групп образцов, включая контрольные, изменений не выявлено. Таким образом, лазерное воздействие изменяет структуру околклеточного матрикса, снижая содержание мелкофибриллярного вещества, предположительно протеогликанов. Эти данные согласуются с результатами предыдущих исследований, показавших, что при облучении в терапевтическом режиме из хрящевой ткани выделяется небольшое количество хондроитинсульфата [9]. Средний размер протеогликановых агрегатов хряща лежит в диапазоне от 200 до 400 нм [10]. В данной работе в околклеточном матриксе наблюдались агломераты наночастиц размером до 230 нм, что примерно соответствует размеру протеогликановых агрегатов.

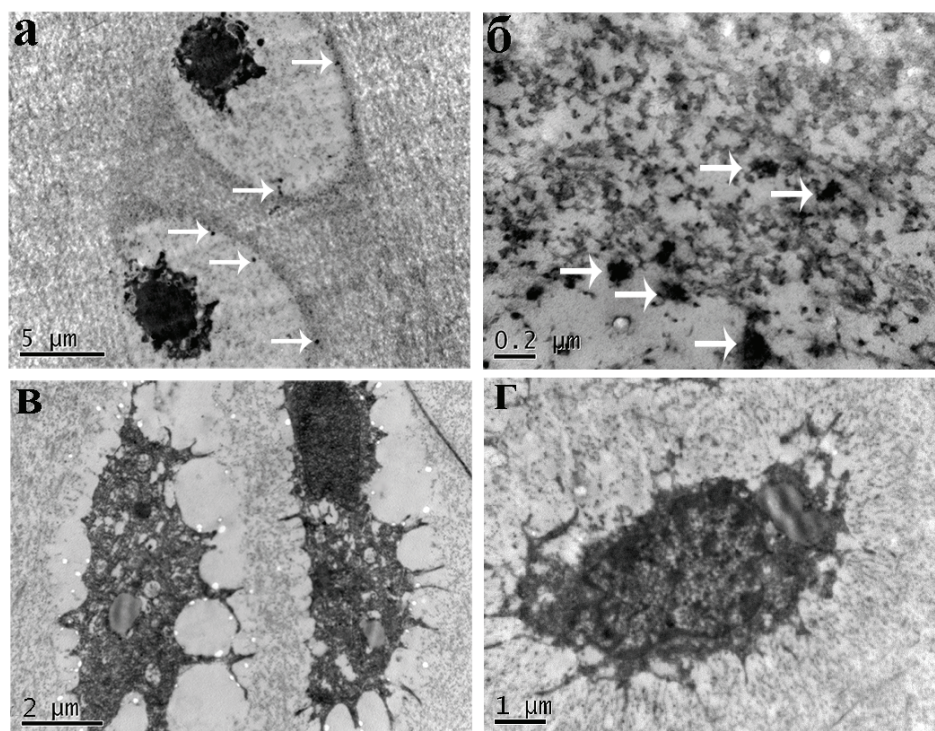


Рисунок 5. ПЭМ изображения суставного хряща, окраска уранилацетат. (а) – два хондроцита в облученном хряще, импрегнированном наночастицами магнетита. Сферические наночастицы и их агломераты расположены на границе околоклеточного и клеточного матрикса (указаны стрелками); (б) – увеличенное изображение агломератов наночастиц размером 150 – 230 нм (указаны стрелками); (в) – два хондроцита в облученном хряще, не импрегнированном наночастицами, электронно-прозрачные области околоклеточного матрикса; (г) – хондроцит интактного хряща, окруженный мелкофибрилярным веществом околоклеточного матрикса.

Влияние наночастиц на компоненты структуры хряща исследовалось при сопоставлении 4-х типов образцов: (1) интактных, (2) облученных лазером, (3) облученных и импрегнированных наночастицами магнетита, (4) облученных, импрегнированных наночастицами магнетита и повторно облученных. Первичное облучение проводилось для моделирования в интактном хряще субмикropористой структуры с размером пор, достаточных для импрегнации наночастиц. Вторичное облучение проводилось с целью изучения влияния лазерного излучения на ткань в присутствии наночастиц.

Хондроциты

Изменения в структуре хондроцитов (ядра и цитоплазмы) выявлялись на основе анализа срезов ткани, окрашенных гематоксилином и эозином. В интактных образцах выявлено небольшое количество дистрофически измененных хондроцитов, что объясняется механическим воздействием разрезания ткани. Коли-

чество таких измененных клеток колеблется от 5 до 8%. Во всех остальных опытных группах суставного и реберного хряща выявлены качественно одинаковые изменения. Они проявлялись в наличии дистрофически и некротически измененных хондроцитов с явлениями лизиса, пикноза (сморщивания) и рексиса (разрушения) ядра и деструкции цитоплазмы. Все изменения обнаружены в небольшом объеме ткани относительно общего объема в зоне лазерного воздействия (350 - 400 мкм в глубину ткани в центре пятна, постепенно снижаясь к его периферии при диаметре лазерного пятна 600 мкм). Четкой границы между измененной и сохранной тканью не было выявлено: из-за неравномерного нагрева граница является размытой, с максимумом изменений вблизи поверхности в центре пятна. Количественные различия между опытными группами образцов сводились к следующему: в группах (2) и (3) количественного различия не обнаружено: в зонах воздействия имелось по 50—70% дистрофически измененных хондроцитов. Наличие в группе (3) импрегнированных наночастиц не привело к увеличению числа наблюдаемых клеточных изменений по сравнению с образцами группы (2), не содержащими наночастиц. В группе (4) содержание измененных клеток в зоне лазерного воздействия увеличивалось до 70 – 80 %. Все это свидетельствует о том, что основным фактором клеточных изменений является термомеханическое воздействие лазерного облучения.

Коллаген и протеогликаны

Матрикс и суставного, и реберного хряща под влиянием всех факторов изменяется минимально. Снижение интенсивности окрашивания для облученных групп образцов при окраске толуидиновым синим, выявляемое только в зоне клеточных изменений, свидетельствует о некотором снижении содержания кислых гликозаминогликанов и, следовательно, протеогликанов. Эти данные согласуются с результатами ПЭМ. Коллагеновый каркас хрящевой ткани практически не меняется, о чем можно судить по равномерному интенсивному окрашиванию пикрофуксином для всех опытных групп. Таким образом, все наблюдаемые изменения хондроцитов и матрикса хрящевой ткани являются результатом термомеханиче-

ского лазерного воздействия. Импрегнация наночастиц исследуемой концентрации не приводит к дополнительным изменениям структуры хряща.

На Рис.6 приведена динамика прошедшего лазерного ИК излучения ($\lambda=1,56$ мкм) через образцы реберного хряща толщиной 1 мм, содержащие наночастицы магнетита, по сравнению с контролем без наночастиц. Можно видеть, что поглощение излучения тканью с наночастицами возрастает более чем в 3 раза, что приводит к падению интенсивности прошедшего ИК. При этом, согласно данным ИК радиометрии, температура поверхности при воздействии лазерного излучения для хряща, импрегнированного наночастицами по сравнению с контролем, не содержащим наночастиц, возрастает на несколько градусов при длительном нагреве (более 10 сек) и практически не изменяется за время нагрева в течение нескольких секунд (Рис.7).

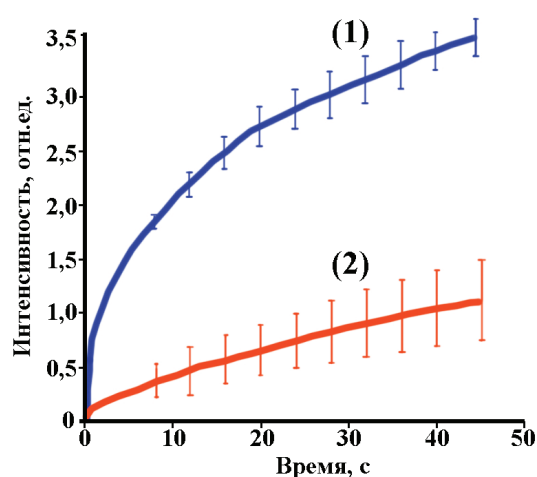


Рисунок 6. Динамика прошедшего ИК лазерного излучения с $\lambda = 1,56$ мкм через образцы реберного хряща толщиной 1 мм. (1) – хрящ без наночастиц, (2) – хрящ, импрегнированный наночастицами Fe₃O₄.

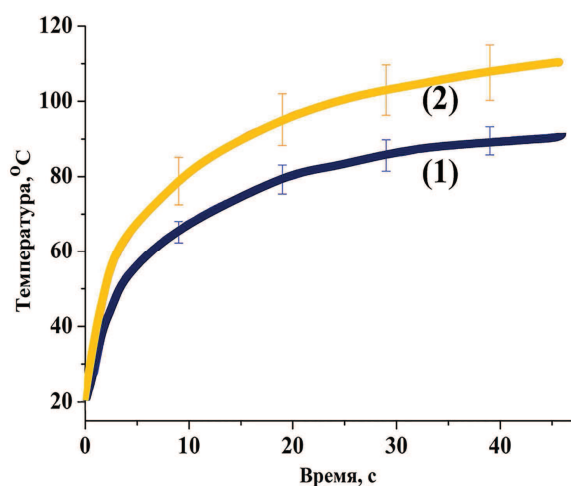


Рисунок 7. Динамика нагрева поверхности реберного хряща при воздействии лазерного излучения с $\lambda = 1,56$ мкм. (1) – хрящ без наночастиц, (2) – хрящ, импрегнированный наночастицами Fe₃O₄.

Основные выводы главы 4: (1) лазерное облучение изменяет микроструктуру хрящевого матрикса и приводит к расширению субмикропор, наиболее выраженному в околочлеточном матриксе; (2) размер и концентрация импрегнированных наночастиц Fe₃O₄ зависят от размера пор и наличия дефектов; (3) импрегнация наночастиц Fe₃O₄ не приводит к дополнительным изменениям клеток и мат-

рикса хряща при лазерном воздействии; (4) импрегнация наночастиц Fe_3O_4 увеличивает поглощение ИК лазерного излучения хрящевой тканью и ускоряет нагрев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Определены оптимальные лазерные режимы для стабильного и безопасного изменения формы реберного хряща, при которых не происходит денатурации коллагена.

2. Обнаружен новый эффект нелинейного термомеханического поведения хрящевой ткани в процессе лазерного изменения его формы. При облучении сначала сжатой, затем растянутой стороны хрящевой пластины конечный радиус кривизны имплантата оказывается меньше, чем при обратном порядке облучения.

3. Получены стабильные к нагреву до $70^\circ C$ и окислению водные дисперсии наночастиц магнетита с распределением по размеру шириной от 5 до 150 нм и максимумом значения гидродинамического радиуса 50 нм. Показано, что на ширину распределения наночастиц можно влиять, изменяя концентрацию стабилизатора.

4. Исследована кинетика импрегнации наночастиц магнетита в хрящевую ткань. Скорость диффузии наночастиц возрастает на порядок величины при наличии дефектов структуры и на два порядка при приложении магнитного поля.

5. Концентрация и размер наночастиц, импрегнированных в хрящевую ткань, зависят от размера пор и наличия дефектов структуры. При лазерном воздействии в терапевтическом режиме происходит расширение субмикропор, повышающее проницаемость ткани для наночастиц и их агломератов размером до 250 – 300 нм.

6. Импрегнация наночастиц магнетита в малых концентрациях не вызывает изменений компонентов хряща: хондроцитов, коллагена и протеогликанов. Основной причиной наблюдаемых изменений структуры при лазерном воздействии на хрящ, содержащий наночастицы, является термомеханический эффект неоднородного лазерного нагрева.

7. Импрегнация наночастиц магнетита в хрящевую ткань может быть использована для управления поглощением лазерного излучения с длиной волны 1,56 мкм.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sobol E., Sviridov A., Omelchenko A., Bagratashvili V. Laser reshaping of cartilage. // *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2000. V.17. P. 553–602.
2. Sobol E., Milner T., Shekhter A., Baum O., Guller A., Ignatyeva N., Omelchenko A., Zaharkina O. Laser reshaping and regeneration of cartilage. // *Laser Phys. Lett.* 2007. V.4. №7. P. 488–502.
3. Helidonis E., Sobol E., Kavvalos G., Bizakis J., Cristodoulou P., Velegrakis G., Segas J., Bagratashvili V. Laser shaping of composite cartilage grafts. // *Am. J. Otolaryngol.* 1993. V.14, №6. P. 410–412.
4. Mordon S., Wang T., Fleurisse L., Creusy C. Laser cartilage reshaping in an in vivo rabbit model using a 1.54 micromer:Glass laser. // *Lasers Surg. Med.* 2004. V.34. P.315–322.
5. James W., Forsen J., Rodney P., Lusk R. Costal cartilage tracheoplasty for congenital long-segment tracheal stenosis. // *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2002. V.128. P.1165–1171.
6. Лыков А.В. Теплообмен. М.: Энергия, 1978. 480 С.
7. Holmgren S.K., Taylor K.M., Bretscher L.E., Raines R.T. Code for collagen's stability deciphered. // *Nature.* 1998. V.392. №6677. P.666–667.
8. Stolz M., Gottardi R., Raiteri R., Miot S., Martin I. Early detection of aging cartilage and osteoarthritis in mice and patient samples using atomic force microscopy. // *Nat. Nanotechnol.* 2009. V.4. P.186–192.
9. Jumel K., Harding S.E., Sobol E., Omel'chenko A., Sviridov A., Jones N. Aspects of the structural integrity of chondroitin sulphate after laser irradiation. // *Carbohydrate Polymers.* 2002. V.48. №3. P. 241-245.
10. Hardingham T.E., Fosang A.J. Proteoglycans: many forms and many functions. // *FASEB J.* 1992. V.6. №3. P.861 - 870.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Омельченко А.И., Обрезкова М.В., Сошникова Ю.М., Павлова С.С., Соболев Э.Н. Магнитная сепарация биофункциональных наночастиц из водных дисперсий оксидов железа в аксиально-симметричном магнитном поле. // Перспективные материалы. 2011. Т. 10. С. 212 – 215.
2. Baum O.I., Soshnikova Yu.M., Sobol E.N., Korneychuk A.Y., Obrezkova M.V., Svistushkin V.M., Timofeeva O.K., Lunin V.V. Laser reshaping of costal cartilage for transplantation. // Lasers in Surgery and Medicine. 2011. V.43. №6. P.511-515.
3. Baum O.I., Soshnikova Yu.M., Omelchenko A.I., Sobol E.N. Nanoparticles for diagnostics and laser medical treatment of cartilage in orthopaedics. // Proceedings of SPIE. 2013. V. 8595. Colloidal Nanocrystals for Biomedical Applications VIII. 85951K. doi: 10.1117/12.2008536.
4. Soshnikova Yu.M., Roman S.G., Chebotareva N.A., Baum O.I., Obrezkova M.V., Gillis R.B., Harding S.E., Sobol E.N., Lunin V.V. Starch modified magnetite nanoparticles for impregnation into cartilage. // Journal of Nanoparticle Research. 2013. V.15. P. 2092-2102.
5. Soshnikova Yu.M., Baum O.I., Shcherbakov E.M., Omelchenko A.I., Shekhter A.B., Lunin V.V., Sobol E.N. Laser Radiation Effect on Chondrocytes and Intercellular Matrix of Costal and Articular Cartilage Impregnated With Magnetite Nanoparticles. // Lasers in Surgery and Medicine. 2015. V.47. №3. P.243-251.

Тезисы докладов:

1. Сошникова Ю.М., Роман С.Г., Баум О.И. Поглощающие наночастицы для структурной диагностики хрящевой ткани. // Сборник конкурсных докладов XII Всероссийского молодежного Самарского конкурса-конференции научных работ по оптике и лазерной физике. 2014. С. 415 – 421.
2. Сошникова Ю.М., Роман С.Г., Джиллис Р., Баум О.И., Омельченко А.И., Щербаков Е.М., Кесельман М.М., Шехтер А.Б., Соболев Э.Н. Исследование

- микроструктуры хряща с использованием магнитных наночастиц. // Материалы XI конференции «Лазеры и лазерно-информационные технологии: фундаментальные проблемы и применения» ILLA-2014. Т. «Лазерные технологии для медицины» С. 9.
3. Соболев Э.Н., Баум О.И., Омельченко А.И., Свиридов А.П., Воробьева Н.Н., Захаркина О.Л., Сошникова Ю.М., Южаков А.В., Щербаков Е.М., Шехтер А.Б., Гуллер А.Е., Большунов А.В., Басков А.В., Свистушкин В.М. Перспективные лазерные технологии модификации структуры и реконструкции тканей в отоларингологии, ортопедии и офтальмологии. // Материалы XI конференции «Лазеры и лазерно-информационные технологии: фундаментальные проблемы и применения» ILLA-2014. «Лазерные технологии для медицины». С. 3.
 4. Soshnikova Yu.M., Baum O.I., Omelchenko A.I., Roman S.G., Chebotareva N.A., Sobol E.N. Magnetite nanoparticles for laser therapy and diagnostics of cartilage diseases. // Book of abstracts of «12-th International Conference on Advanced Laser Technologies». 2013. P.38.
 5. Сошникова Ю.М., Баум О.И., Омельченко А.И., Щербаков Е.М., Кесельман М.М., Шехтер А.Б., Соболев Э.Н. Метод ранней диагностики дегенеративных заболеваний хряща с использованием магнитных наночастиц. // Сборник трудов VI Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине» (ТКМФ-6). 2014. С.238.
 6. Роман С.Г., Сошникова Ю.М., Чеботарева Н.А., Омельченко А.И., Соболев Э.Н. Характеристика наночастиц магнетита для применения в лазерной терапии поврежденной хрящевой ткани. // Материалы IV Съезда биофизиков России. Симпозиум IV «Новые тенденции и методы в биофизике». 2012. С.80.
 7. Соболев Э.Н., Омельченко А.И., Баум О.И., Сошникова Ю.М., Ватрина А.С. Магнитные наночастицы для лазерной диагностики и регенерации хряща. // Сборник тезисов конференции «Ломоносовские чтения». 2013. Секция Физики. С.120.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор сердечно благодарит академика РАН Лунина Валерия Васильевича и к.ф.-м.н. Баум Ольгу Игоревну за внимательное руководство диссертационной работой, за помощь в организации и проведении исследований. Автор благодарит проф. Соболя Эмиля Наумовича и к.ф.-м.н. Омельченко Александра Ивановича, а также весь коллектив лаборатории Биофотоники ИПЛИТ РАН за помощь в проведении экспериментов с биологической тканью и плодотворное обсуждение результатов работы. Искреннюю благодарность автор выражает проф. Шехтеру Анатолию Борисовичу за помощь в проведении гистологических, гистохимических и ПЭМ исследований. Автор благодарит коллектив лаборатории Катализа и Газовой Электрохимии Химического Факультета МГУ им. Ломоносова за проявленное к работе внимание и плодотворную дискуссию. Автор благодарит проф. Яминского Игоря Владимировича и к.ф.-м.н. Протопопову Анну Дмитриевну за помощь в проведении АСМ исследований. Автор выражает признательность д.б.н. Чеботаревой Наталье Александровне и к.ф.-м.н. Роман Светлане Георгиевне, а также проф. Стивену Хардингу за помощь в проведении исследований ДЛС и АУЦ. Автор благодарит Обрезкову Марину Васильевну за поддержку и ценные советы. Автор благодарит своих друзей и близких за понимание и поддержку.