

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Сошникова Юлия Михайловна

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

02.00.04 – физическая химия

02.00.09 – химия высоких энергий

Научные руководители:

академик РАН, доктор химических наук, профессор

Лунин В.В.,

кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник

Баум О.И.

МОСКВА – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. Литературный обзор.....	9
1.1 Структура и функции хряща	9
1.1.1 Коллаген.....	10
1.1.2 Протеогликаны	10
1.1.3 Надмолекулярная организация хряща	13
1.1.4 Хондроциты.....	13
1.1.5 Суставной и реберный хрящ.....	15
1.1.5 Дегенеративные заболевания хряща	16
1.2 Лазерная модификация хрящевой ткани.....	17
1.2.1 Изменение формы реберного хряща.....	17
1.2.2 Выбор параметров воздействия.....	20
1.2.3 Регенерация хрящевой ткани.....	25
1.2.4 Проблемы ранней диагностики деградации хряща и локализации лазерного воздействия	27
1.3 Методы исследования структуры хряща	28
1.3.1 Микроскопия.....	29
1.3.1.1 Световая микроскопия	29
1.3.1.2 Электронная микроскопия	31
1.3.1.3 Атомно-силовая микроскопия	32
1.3.2 Дифференциальная сканирующая калориметрия.....	34
1.4 Наночастицы магнетита.....	38
1.4.1 Наночастицы в медицине	38
1.4.2 Синтез и стабилизация	41
1.4.3 Краткий обзор методов характеристики.....	42
1.5 Выводы по результатам обзора литературы.....	43
Глава 2. Лазерное изменение формы реберного хряща	45
2.1 Экспериментальные методы.....	45
2.1.1 Лазерное облучение	45
2.1.2 ДСК.....	47
2.2 Оптимальные режимы воздействия.....	48
2.3 Стабильность новой формы	49

2.4	Влияние последовательности облучения на кривизну новой формы	50
2.5	Степень денатурации коллагена в облученном хряще	51
2.6	Выводы по результатам Главы 2.....	53
Глава 3. Импрегнация наночастиц магнетита в хрящевую ткань.....		55
3.1	Экспериментальные методы.....	55
3.1.1	Синтез наночастиц магнетита.....	55
3.1.2	ПЭМ и электронная дифракция.....	55
3.1.3	ДЛС.....	55
3.1.4	АУЦ	56
3.1.5	Импрегнация наночастиц в хрящ	56
3.1.6	Оптическая фотометрия	57
3.2	Характеризация наночастиц магнетита.....	57
3.3	Кинетика импрегнации наночастиц магнетита в хрящевую ткань	61
3.4	Выводы по результатам Главы 3.....	63
Глава 4. Структура хряща при лазерной модификации и импрегнации наночастицами магнетита		65
4.1	Экспериментальные методы.....	65
4.1.1	Отбор и приготовление образцов хряща сустава и ребер.....	65
4.1.2	Лазерная модификация суставного и реберного хряща.....	65
4.1.3	Импрегнация наночастиц магнетита.....	66
4.1.4	Гистология и гистохимия	66
4.1.5	ПЭМ.....	67
4.1.6	АСМ.....	67
4.1.7	Измерение пропускания ИК излучения.....	68
4.2	Общее описание структуры.....	68
4.3	Влияние лазерного облучения.....	73
4.3.1	Коллаген и протеогликаны	73
4.3.2	Хондроциты	80
4.4	Влияние импрегнации наночастиц магнетита.....	83
4.5	Взаимодействие с ИК излучением.....	87
4.6	Выводы по результатам Главы VI	88
ВЫВОДЫ.....		90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		91

ВВЕДЕНИЕ

Изучение физико-химических свойств хрящевой ткани при неразрушающем лазерном воздействии, таких как состояние коллагена, протеогликанов и хондроцитов хрящевой структуры, а также определение стабильности полезных лазерно-индуцированных изменений является важнейшей задачей развития методов лазерной терапии хряща. Термин неразрушающее воздействие означает, что при этом не происходит необратимых изменений клеток и матрикса хряща. Неравномерность лазерного нагрева инициирует локальное протекание неравновесных процессов, подлежащих выявлению и изучению. Неразрушающая лазерная модификация хрящевой ткани применяется в медицинских технологиях изменения формы хрящевой ткани [1] и активации клеточной регенерации хряща 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 впервые 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 для закрытия 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 возможности эффективного и безопасного лазерного изменения его формы. Возможность управления поглощением лазерного излучения и локализации лазерного воздействия позволит лучше 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 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 актуальную задачу. Одним из возможных решений может быть введение в хрящевую ткань добавок, поглощающих лазерное излучение, какими могут служить биосовместимые наночастицы. Аспекты влияния наночастиц на компоненты хряща до и после его лазерной модификации подлежат изучению.

Объектами исследования в данной работе являются 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 структуры реберного и суставного хряща на разных уровнях их структурной организации. В работе использовались такие методы исследования структуры, как оптическая, просвечивающая и атомно-силовая микроскопия (ОМ, ПЭМ, АСМ), гистохимия и гистология, пропускание ИК излучения, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Для характеристики биосовместимых 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 состояния 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 исследования состоит в том, что 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 субмикроскопические дефекты хрящевой структуры. Положения, выносимые на защиту, могут быть сформулированы следующим образом:

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 пропускания 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.

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» ИЛА-(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.

Основные результаты работы изложены в 6 научных статьях, опубликованных в рецензируемых ведущих российских и зарубежных журналах в 2011 – 2014 гг., таких как *Lasers in Surgery and Medicine*, *Journal of Nanoparticle Research*, *Proceedings of SPIE*.

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

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Структура и функции хряща

Хрящевая ткань – частный вид соединительной ткани, выполняющей опорную функцию [6,7]. В организме хрящевые ткани расположены в областях максимальных статических и динамических нагрузок: в суставах, между пластинами позвоночника, на стыках ребер с грудиной. Хрящи также являются структурными единицами, поддерживающими форму носа, гортани, ушной раковины. Упругие свойства хрящевой ткани обеспечивают возможность обратимой деформации без утраты функциональных свойств [8].

Хрящевая ткань как разновидность соединительной отвечает следующим признакам:

1. Относительное небольшое содержание клеток по сравнению с другими тканями организма, основной объем приходится на межклеточное пространство.
2. Структурной особенностью является наличие волокнистых (фибриллярных) структур – коллагеновых либо эластических волокон.
3. Межклеточное вещество отличается сложностью состава и организации.

Наиболее распространенными являются хрящи гиалинового типа (носовая перегородка, суставной и реберный хрящи, хрящи гортани и трахеи). Другие типы представлены фиброзным (межпозвоночный диск) и эластическим (ушная раковина) хрящом. В данной работе рассматривается хрящ, имеющий структуру гиалинового типа.

Гиалиновый хрящ (англ. *hyaline* – прозрачный, стекловидный) отличается гомогенностью основного вещества, в состав которого входит преимущественно коллаген II типа и протеогликаны – высокомолекулярные углеводно-белковые соединения [7-9]. Клетки хряща – хондроциты – обеспечивают синтез и поддержание компонентов матрикса. Снаружи хрящ покрыт тонким слоем фиброзной ткани – перихондрием, практически везде, кроме стыков хряща и кости, а также случаев, когда хрящ непосредственно расположен под слоем кожи, как для хряща носовой перегородки и ушной раковины. Содержание межтканевой жидкости составляет около 75 % веса хряща [10].

1.1.1. Коллаген

Структурной особенностью коллагенов всех типов является наличие правовинтовой спирали, составленной из трех полипептидных α -цепей (рис.1) [9,11]. Каждая из трех α -цепей представляет в свою очередь левовинтовую спираль с шагом в 18 аминокислотных остатков. 1/3 всех аминокислотных остатков полипептидной цепи коллагена составляет глицин. Таким образом, цепь состоит из структурных доменов вида $(\text{Gly-X-Y})_n$. X и Y представлены в основном остатками пролина, 4-гидроксипролина и оксипролина. В структуре коллагена II типа присутствуют также остатки глюкозила и галактозила, которые участвуют в образовании связей с протеогликанами хрящевого матрикса [12]. Содержание 4-гидроксипролина определяет формирование межмолекулярных водородных связей и поддерживает стабильность спирали [9]. Цепи формируют тройную спираль таким образом, что остатки глицина оказываются сосредоточенными в центре спирали, в то время как более объемные остатки других аминокислот занимают внешние позиции. Важными структурными элементами являются также неспиральные короткие пептиды мономеров, примыкающие к основной спирали (Рис.1) [9]. Они участвуют в формировании межмолекулярных связей с другими коллагеновыми молекулами и с компонентами окружающего матрикса. Коллагеновые фибриллы гиалинового хряща обладают гетерогенной структурой, где наряду с преобладающим коллагеном II типа присутствуют коллагены XI и IX типов, толщина фибрилл которых не превышает 15 – 50 нм [13,14].

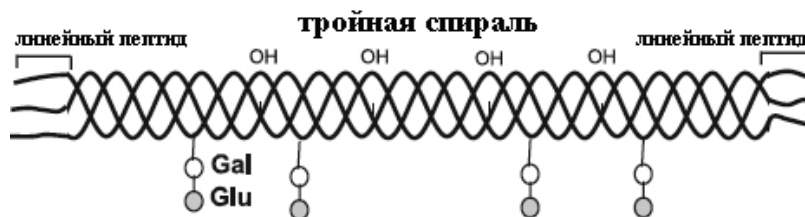


Рисунок 1. Структура тройной спирали молекулы коллагена.

Структура молекул коллагена II типа позволяет формировать надмолекулярные агрегаты, волокна, состоящие из множества фибрилл, диаметр которых может изменяться в пределах 25 – 400 нм. Наблюдаемая периодичность волокон и фибрилл составляет около 70 нм [15].

1.1.2. Протеогликаны

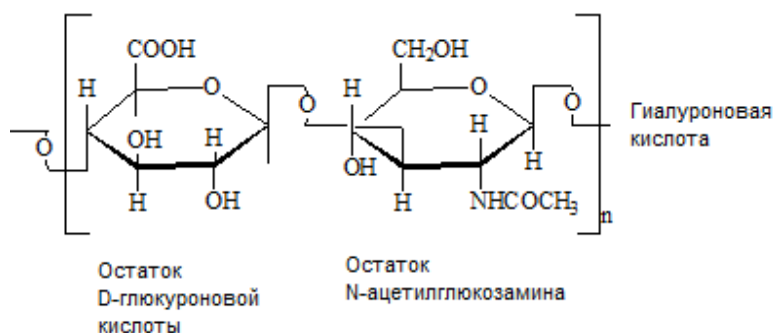
Протеогликаны представляют собой высокомолекулярные углеводно-белковые соединения. Они наряду с коллагеном составляют основную субстанцию межклеточного

матрикса хрящевой ткани (около 30% сухой массы) [10]. Полисахаридные группы протеогликанов получили название гликозаминогликаны.

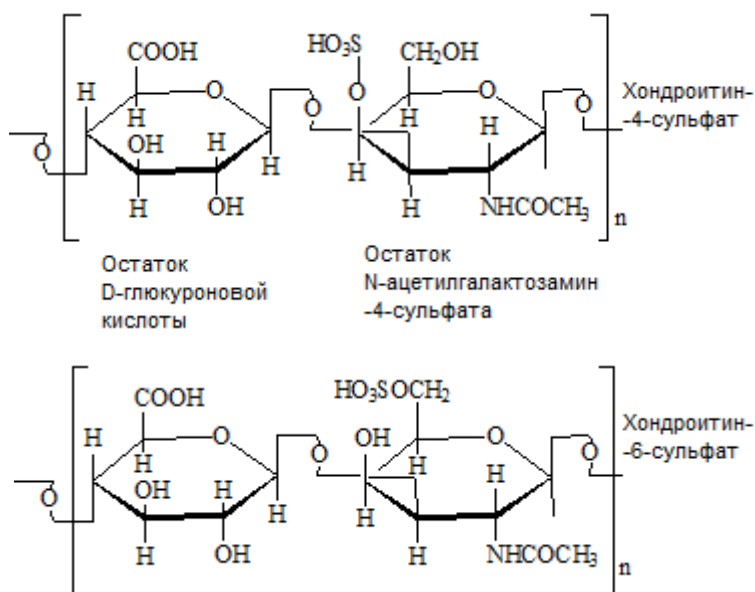
Гликозаминогликаны хрящевой ткани – это линейные неразветвленные полимеры, построенные из повторяющихся дисахаридных единиц. В организме гликозаминогликаны не встречаются в свободном виде, но всегда связаны с некоторым количеством белка [16].

В состав хрящевой ткани входят следующие основные гликозаминогликаны: гиалуроновая кислота, хондроитин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат и кератансульфат [8,16].

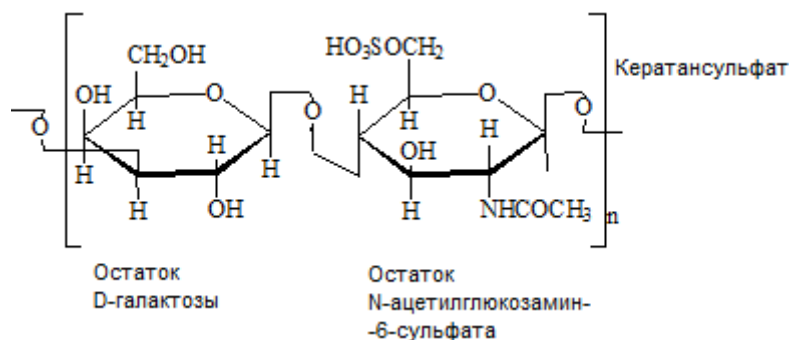
Гиалуроновая кислота имеет наибольшую молекулярную массу ($10^5 - 10^7$). Основной функцией гиалуроновой кислоты считают связывание воды [10]. Повторяющаяся дисахаридная единица гиалуроновой кислоты имеет следующее строение:



Хондроитин-4-сульфат и хондроитин-6-сульфат имеют схожее строение. Отличие между ними состоит в расположении сульфатной группы.



Дисахаридные единицы кератансульфата, в отличие от остальных гликозаминогликанов, не содержат остатков D-глюкуроновой кислоты:



В структуре ткани протеогликианы выполняют многочисленные функции. Так, фиксированные в пространстве отрицательно заряженные сульфатные и карбоксилатные группы притягивают положительные противоионы и создают локальный осмотический дисбаланс, который выравнивается за счет концентрирования в этих областях молекул воды [16]. Таким образом, протеогликианы участвуют в поддержании гидратации тканевого матрикса. Второй важной функцией является организация структуры матрикса за счет формирования устойчивых межмолекулярных связей с окружающими макромолекулами. При этом матрикс остается проницаемым для жидкости и ионов [16]. Наиболее хорошо изученными являются агреканы – макромолекулы, формирующие агрегаты за счет нековалентного связывания с молекулой гиалуроновой кислоты. Причем, к остову гиалуроновой кислоты (M_r 0,5 – 1.0 x 10⁶ Da) могут присоединяться около 100 агрекановых единиц ($M_r \sim 200$ x 10⁶ Da). В хрящевой ткани такие агрегаты выполняют функцию распределения механической нагрузки [16-18]. Среди малых протеогликанов в хрящевой ткани различают декорин и фибромодулин, участвующие в регуляции диаметра коллагеновых фибрилл и связывании их между собою в упругие волокна; синдекан и глипикан – трансмембранные протеогликианы, обеспечивающие организацию цитоскелета хондроцитов, процессы передачи клеточного сигнала, пролиферации, миграции клеток и их взаимодействия с внеклеточными белками матрикса; перлекан и бигликан, взаимодействующие с белками внеклеточного матрикса, факторами роста и клеточными рецепторами (Рис.2) [19].

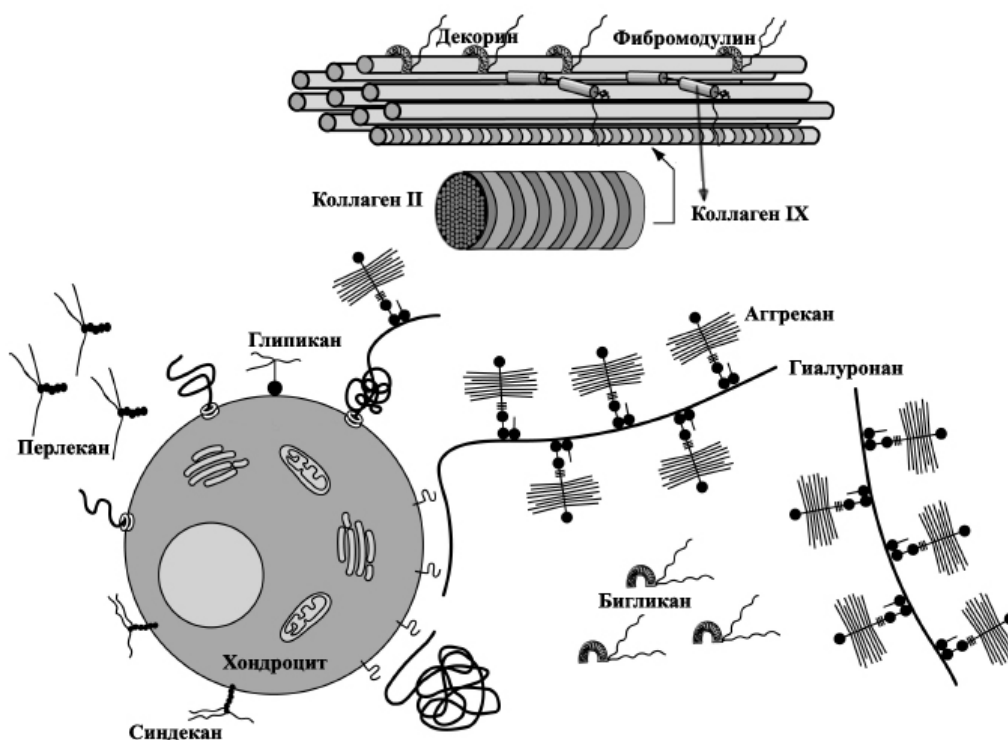


Рисунок 2. Протеогликаны хряща [19].

1.1.3. Надмолекулярная организация матрикса

Коллагеновые волокна хрящевой ткани образуют густую сеть, расположенную в плотном геле протеогликановых агрегатов, а также переплетаются вокруг хондроцитов, препятствуя их сжатию. Агрегаты протеогликанов густо переплетены между собой и образуют трехмерную сеть [11].

Особую роль в стабилизации трехмерной структуры играет внутритканевая вода. В работе [12] было установлено, что в тонких пленках хондроитинсульфата и коллагена процентное содержание воды, образующей водородную связь, выше, чем в чистой воде. Предложено объяснение, согласно которому вода образует «мостики», связывающие полипептидные цепи тройных спиралей коллагена, а также полярные группы соседних сахаридных колец в молекулах хондроитин-сульфата. Данная вода представляет собой так называемую «связанную» воду, не способную к свободной диффузии внутри хрящевого матрикса. Структура матрикса, включающая размер и количество клеток, диаметр и длину коллагеновых фибрилл, их направление относительно главной оси ткани, различается в зависимости от типа хрящевой ткани и выполняемой ею функции.

1.1.4. Хондроциты

Хондроциты представляют собой зрелые клетки хрящевой ткани и входят в более общую группу клеток фибробластов – наиболее распространенной клеточной формы соединительных тканей [20]. Хондроциты обеспечивают синтез основных компонентов

хрящевого матрикса: коллагена II типа, минорных коллагенов, гликозаминогликанов и гликопротеинов [10]. Размер хондроцитов и их расположение в различных слоях ткани зависит от типа хряща [6]. В хрящевой ткани можно встретить как отдельно расположенные клетки, так и группы из двух-трех и более клеток, расположенных в общей для них области перичеллюлярного (околочелюточного) матрикса – изогенные группы клеток. Хондроциты, как правило, имеют овальную вытянутую форму, по границам снабжены небольшими отростками. Клеточное ядро может быть различной величины, у зрелых хондроцитов оно нередко занимает большую часть объема клетки. Области околочелюточного матрикса, которые при исследовании на электронном микроскопе проявляются как более электронно-прозрачные, чем основной матрикс, вещество, содержащее минорные коллагены и протеогликаны, называют клеточной «лакуной». Однако это понятие условно. Определение «хондроцит» относится к клеткам со сниженной синтетической и пролиферативной активностью, которые составляют большинство клеток ткани. Молодые и активные клетки, отличающиеся на порядок более интенсивным делением и синтетической активностью, называют хондробластами [20]. Со временем хондробласт снижает свою активность и становится хондроцитом, однако четкой границы между двумя клеточными формами не существует. При определенных условиях хондроциты способны вновь увеличивать свою пролиферативную и синтетическую активность [20]. Популяции клеток в соединительной ткани распределяются неравномерно. Даже в интактной зрелой ткани присутствуют области, содержащие большой процент хондробластов. При наличии повреждений в очаге новообразования неоднородность сильно возрастает за счет смены клеточных форм. Хрящевая ткань не имеет кровеносных сосудов, поэтому питание клеток осуществляется посредством циркуляции жидкости, доставляющей питательные вещества с поверхностных слоев хряща (надхрящницы у реберного хряща, снабженной разветвленной капиллярной системой, или блестящей пластинки у суставного) через микропористую систему. Размер пор в здоровом хряще составляет 10 – 30 нм [1]. В тех случаях, когда этого недостаточно, возможно прорастание в хрящевую ткань инвагинаций соединительной ткани с капиллярами [20], что может влиять на упругие свойства хряща.

1.1.5. Суставной и реберный хрящи

Рассматриваемые в данной работе суставной и реберный хрящ относятся к хрящам гиалинового типа. Различные виды нагрузок, прикладываемые к суставному и реберному хрящу, обуславливают некоторые структурные различия. Так, суставной хрящ формирует опорную поверхность в области сочленения костей (Рис.3). Внутреннее пространство суставной капсулы выстлано синовиальной мембраной, которая выделяет синовиальную жидкость, снижающую трение. Внешняя поверхность суставного хряща (около 4 мкм) покрыта блестящей пластинкой из коллагена и гликопротеинов.

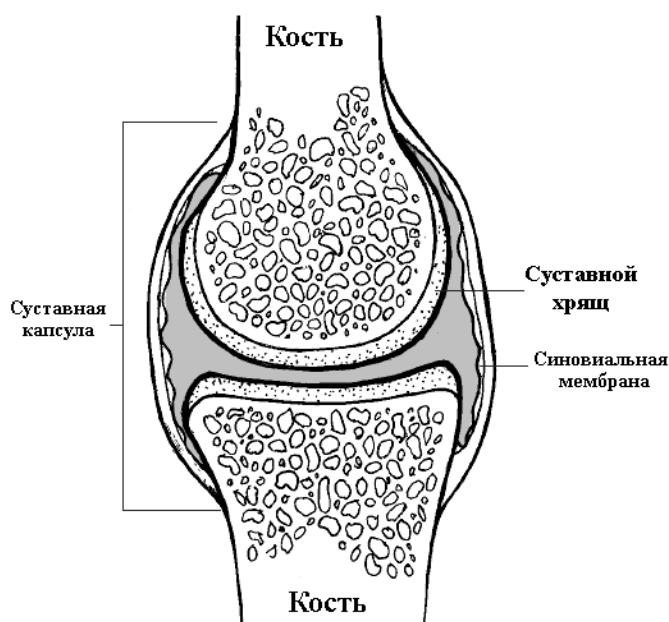


Рисунок 3. Схематическое изображение суставной капсулы.

В целом суставной хрящ имеет зональную структуру. Различают поверхностную, промежуточную и базальную зону (которую подразделяют на радиальную зону и зону кальцификации), постепенно переходящую в кость [10]. Поверхностная зона, прилежащая к блестящей пластинке, содержит большое количество активных клеток вытянутой формы, матрикс представлен коллагеновыми фибриллами, вытянутыми преимущественно параллельно поверхности хряща, и протеогликанами. В промежуточной зоне клетки имеют форму, близкую к сферической, расположены реже, а коллагеновые фибриллы в матриксе направлены более хаотично, чем в поверхностной зоне. В радиальной зоне увеличивается число клеток с изменениями структуры, коллагеновые фибриллы более мощные и расположены вдоль направления от кости к поверхностным слоям.

Реберный хрящ служит для сочленения ребер с грудиной (Рис.4). Протяженность и толщина хряща зависит от номера ребра. Объем кальцинированной зоны,

прилегающей к кости, небольшой по сравнению с общим объемом хряща. Внешняя поверхность реберного хряща выстлана надхрящницей – васкуляризированной оболочкой из соединительной ткани. Реберный хрящ, как и суставной, состоит из трех слоев гиалинового хряща. Отличия заключаются в наличии фиброзной соединительнотканной надхрящницы, глубоких инвагинаций рыхлой соединительной ткани с сосудами вглубь хряща, что необходимо для улучшения питания толстого хряща, а также значительно большего содержания хондроцитов и меньшего объема матрикса. В реберном хряще коллагеновые фибриллы более толстые и длинные, что необходимо для поддержания нагрузки на сжатие и растяжение [21].

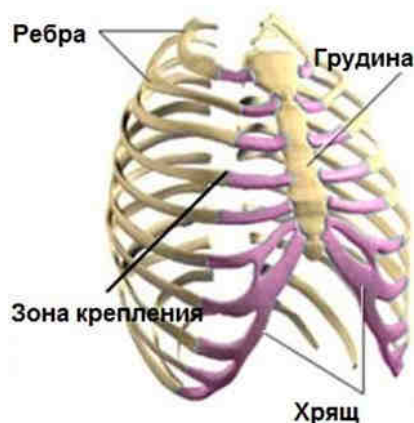


Рисунок 4. Схематическое изображение сочленения ребер с грудиной посредством реберных хрящей.

1.1.6. Дегенеративные заболевания хряща

Заболевания опорно-двигательного аппарата в настоящее время по распространенности находятся на четвертом месте после диабета, онкологических и сердечнососудистых заболеваний [22]. Наиболее типичными заболеваниями, связанными с деградацией хрящевой ткани, являются разнообразные дисфункции суставов, такие как артрит, артроз, остеохондроз. Остеоартрит (ОА) – наиболее распространенное заболевание суставов, характеризующееся дегенеративными изменениями в суставном хряще [23]. ОА трудно диагностируется, особенно на ранних стадиях заболевания. Для диагностики обычно используют артроскопию сустава – достаточно сложную, инвазивную процедуру визуального наблюдения дефектов суставной поверхности. Среди дефектов суставного хряща различают поверхностное истощение протеогликанов, разориентацию коллагеновых фибрилл и уменьшение содержания коллагена, которые невозможно различить ни рентгенографически, ни с помощью радиографии [16, 24].

Другие, не менее распространенные заболевания хрящей – остеохондроз и ревматоидный артрит связаны с нарушением метаболизма, приводящим к недостатку питания хрящевых клеток и отложению солей в тканях, и также могут быть обнаружены лишь на поздней стадии [25,26]. Риск развития данных заболеваний существенно возрастает при наличии хронических воспалительных процессов. Кроме того, проблема дегенерации хряща является насущной в спинальной хирургии [27] и отоларингологии при лечении стеноза гортани [28]. Поэтому разработка методов ранней диагностики повреждений хрящевой ткани является актуальной. Лечение данных заболеваний до недавнего времени представляло собой медикаментозную терапию, малоэффективную на поздних стадиях заболевания, либо хирургическую операцию, чреватую развитием осложнений. В настоящее время развиваются многочисленные подходы тканевой инженерии, такие как стимуляция активности костного мозга, аутогенная имплантация популяций хондроцитов, замена разрушенной хрящевой ткани имплантатом из подходящего материала [29]. При этом предпочтение отдается наименее инвазивным методам лечения. Методы лазерной регенерации и коррекции формы хрящевой ткани основаны на использовании неразрушающего лазерного воздействия, приводящего к активации естественной восстановительной активности ткани и релаксации механических напряжений [1,10].

Настоящая работа направлена на поиск решений актуальных задач лазерной реконструкции хрящевой ткани при ее дегенерации и в процессе коррекции ее формы для изготовления имплантатов в рамках применяющихся на данный момент медицинских лазерных технологий и подходов, поэтому объектами исследования являются суставной и реберный хрящ.

1.2. Лазерная модификация хрящевой ткани

1.2.1. Изменение формы хряща

В 1993 году было опубликовано исследование, посвященное изменению формы искривленной носовой перегородки посредством приложения неразрушающего лазерного воздействия [3]. Вначале искривленному хрящу механически придавалась и фиксировалась желаемая форма, затем в местах деформации проводилось лазерное воздействие. В результате удавалось добиться стабильной новой формы хряща. Данное исследование положило начало разработке технологии септохондрокоррекции –

медицинской процедуре коррекции формы искривленной носовой перегородки [30]. По сравнению с традиционной хирургической операцией данная процедура является бескровной, нетравматичной, не требует длительного периода реабилитации, а также может быть произведена за существенно более короткое время в 10 – 15 мин. Впоследствии данная технология также была модифицирована для проведения коррекции деформаций эластического хряща ушной раковины с перспективой применения в косметологии [4,31]. В последнее время разрабатываются методы и подходы для лазерного изменения формы реберного хряща, который имеет свои структурные и механо-физические особенности [32,33]. Реберный хрящ является перспективным материалом для трансплантации, в том числе ауто трансплантации при восстановлении хряща носовой перегородки, трахеи и т.д. [5,34]. Данное применение становится возможным благодаря относительной прочности реберного хряща в сравнении с другими хрящами, однородности свойств и простоте извлечения у донора с минимальным разрезом тканей и большой объем донорского материала. В частности, при лечении стеноза гортани пластины реберного хряща толщиной 1 – 3 мм могут быть использованы для закрытия дефекта поврежденной трахеи. Однако остается открытым вопрос контроля остаточных механических напряжений, которые могут непредсказуемо менять форму имплантата после его изготовления.

Лазерное изменение формы хряща основано на снятии механических напряжений в матрице хрящевой ткани [1,10]. Механизм данного процесса является сложным и до конца не изученным. Проведенные исследования показывают, что при нагреве ткани до температуры $\approx 70^{\circ}\text{C}$ происходит несколько процессов: (1) локальный переход части связанной протеогликановыми молекулами воды в свободное состояние, (2) локальная деполимеризация протеогликановых агрегатов без наблюдаемой денатурации коллагена, (3) локальная минерализация хрящевого матрикса, вызванная, предположительно, нейтрализацией отрицательно заряженных групп протеогликанов и их фрагментов ионами натрия и кальция, (4) локальный разрыв межмолекулярных связей протеогликанов и коллагена, приводящий к снижению внутренних напряжений за счет изменения пространственной организации матрикса. Протекание процесса (1) было изучено методом Фурье ИК спектроскопии [35]. Спектральная линия первого обертона ($5\ 300\ \text{см}^{-1}$) связанной воды в хрящевой ткани отличается от линий свободной воды в хряще и контроля воды вне хрящевого образца. В работе варьировались время и

температура нагрева в процессе регистрации ИК спектров для определения содержания связанной воды. Было показано, что процесс десорбции воды в хряще, высушенном при температуре менее 65°C, является полностью обратимым и необратимым для более высоких температур. Хрящ, высушенный при 67°C в течение 24 ч, а затем помещенный в воду, сорбировал воду вплоть до 87% от исходной массы, что свидетельствует о необратимых потерях до 13% первоначального содержания воды. При анализе данных калориметрических измерений было рассчитано количество связанной воды в 4% от общего содержания воды в хряще [1]. Сделано предположение, что наблюдаемый переход при 70°C, теплота которого составила 1.5 ± 0.3 кДж/г, соответствует переходу связанной воды в свободное состояние.

Процессы (2) и (4) подтверждаются рядом проведенных исследований. Так, при анализе методами хроматографии и мультиуглового рассеяния (SEC/MALLS) жидкости, в среде которой проводилось лазерное облучение хряща в неразрушающем режиме, была зафиксирована возросшая в несколько раз концентрация молекул хондроитин сульфата по сравнению с необлученным контролем [36]. При возрастании температуры лазерного нагрева молекулярная масса экстрагируемого в жидкость хондроитин сульфата уменьшалась. Таким образом, в хрящевой ткани происходит лазерно-индуцированная деполимеризация протеогликанов и разрыв межмолекулярных связей, что ускоряет диффузию хондроитин сульфата, а следовательно, и перераспределение заряженных групп внутри хряща. При исследовании хряща, облученного в режиме коррекции формы, методом атомно-силовой микроскопии в зоне облучения выявляются более глубокие (100 – 400 нм) субмикрочаналы структуры по сравнению с интактной тканью, что также свидетельствует об увеличении свободного объема после лазерного воздействия [37]. В данной работе в облученной хрящевой ткани были обнаружены кристаллические структуры размером 100 – 800 нм. Дифракционный анализ показал, что кристаллы в основном представлены карбонатом натрия. В более поздних исследованиях *in vivo* было показано, что кристаллообразование под действием лазерного излучения является обратимым процессом. В хрящевой ткани животных спустя месяц после облучения были обнаружены кристаллы карбоната натрия размером не более нескольких нанометров, что свидетельствует об их постепенном растворении [1].

Так как упругость хряща имеет электростатическую природу, предпринимаются попытки провести релаксацию напряжений посредством приложения разности потенциалов [38]. В данной работе к изогнутым хрящевым образцам прикладывали алюминиевые электроды и варьировали напряжение от 0 до 5,5 В, а также время от 0 до 5 мин, отслеживая результат изменения формы. Наблюдаемое повышение температуры хряща составило 2°C, зарегистрированный ток в системе не превышал 0,1А. Такой небольшой перепад температуры авторы связывают с тем, что энергия расходуется на процессы массопереноса и химические превращения. Для напряжений более 1 В наблюдался стабильный эффект изменения формы. Авторы связывают механизм данного явления с электролизом тканевой воды, ускоряющим процесс перехода «связанной» воды в свободное состояние, а также с электрофоретическим переносом заряженных групп протеогликанов из сжатых областей ткани, где их концентрация выше, в растянутые. Недостатками данного метода являются сложность процедуры, требующей соответствие электродной установки конкретной геометрии образца, и большой процент гибели хондроцитов в области воздействия электродов [39].

Другими альтернативными методами изменения формы хрящевой ткани являются ферментативная обработка [40] и воздействие радиочастотами [41]. Данные методы в настоящее время не позволяют проводить эффективную релаксацию напряжений без гибели большого процента хондроцитов.

1.2.2. Выбор параметров воздействия

При выборе параметров лазерного воздействия для модификации структуры хрящевой ткани руководствуются следующими критериями: (1) они должны обеспечивать достижение стабильного полезного эффекта, в частности, стабильной конечной кривизны хряща для придания ему новой формы при (2) отсутствии сильных повреждений структуры, вызванных тепловым и механическим воздействием лазера, таких как гибель большого процента клеток и деструкция матрикса. Как правило, избежать локальных повреждений структуры не удастся, поэтому при выборе параметров воздействия стараются минимизировать возможные повреждения. Так, использование лазера позволяет осуществлять направленную доставку тепла в небольшой объем хрящевой ткани и локализовать воздействие, оставив соседние области ткани интактными. Этого, как правило, бывает достаточно для достижения необходимого полезного эффекта. При выборе длины волны лазерного излучения

ориентируются на спектр поглощения исследуемой ткани, так как толщина поглощающего слоя определяет область полезных изменений. Хрящевые ткани представляют собой мутные среды с показателем преломления большим, чем у воздуха, поэтому необходимо учитывать также вклад рассеяния и френелевского отражения на границе двух сред. Рассеивающими центрами могут являться клетки, клеточные ядра и органеллы, коллагеновые фибриллы, субфибриллы, газовые пузырьки и неорганические кристаллы [42]. При преобладании поглощения над рассеянием ослабление интенсивности лазерного пучка при прохождении через ткань можно оценить по экспоненциальному закону Бугера-Бера [42]:

$$I(z) = (1 - R) \cdot I_0 \exp(-\mu_t \cdot z),$$

где $I(z)$ – интенсивность света на глубине, соответствующе координате z , R – коэффициент френелевского отражения при нормальном падении пучка, I_0 – интенсивность падающего света, μ_t – коэффициент экстинкции, представляющий собой сумму коэффициентов поглощения и рассеяния.

Как правило, характер взаимодействия излучения со средой хрящевой ткани является нелинейным. Нагрев вещества, тепло- и массоперенос в процессе нагрева приводят к изменению поглощения и рассеяния [43,10]. Поэтому динамику поглощения и рассеяния с ростом температуры также необходимо учитывать. Поглощение излучения хрящевой тканью практически во всем спектре видимого и ИК излучения определяется поглощением воды. Спектр поглощения воды в диапазоне 500 нм – 10 мм приведен на Рис.5.

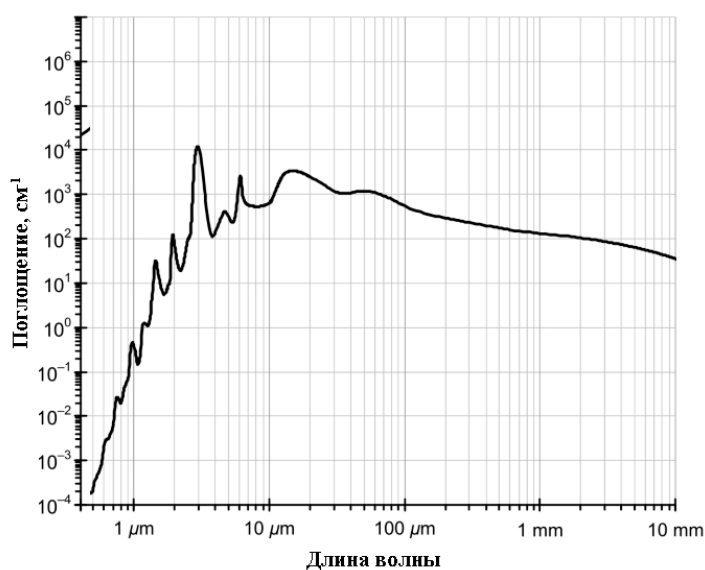


Рисунок 5. Спектр поглощения воды.

Можно видеть, что в диапазоне длин волн от 1 до 10 мкм поглощение изменяется на 8 порядков с максимумом в районе 3 мкм. Поглощение в данном диапазоне определяется колебательными переходами воды. Коллаген в основном поглощает излучение в УФ диапазоне: максимум поглощения ароматических остатков тирозина и фенилаланина лежит в диапазоне 250 – 300 нм [44]. Также наблюдается пик поглощения коллагена в среднем ИК диапазоне в районе 5 мкм, что связано с валентными колебаниями С=О группы. Полоса поглощения, соответствующая колебаниям пиранозных циклов протеогликанов лежит в области среднего ИК (8 – 10 мкм) и может проявляться при сильном обезвоживании хрящевой ткани [45]. Коэффициенты поглощения биологических тканей лежат в диапазоне 10^{-2} - 10^4 см⁻¹ [42]. Для хрящевой ткани гиалинового типа коэффициент поглощения в видимом диапазоне спектра при поглощении излучения с длиной волны 500 нм составляет $0,5 \pm 0,3$ см⁻¹, а коэффициент рассеяния 37 ± 3 см⁻¹ [46]. Таким образом, в данном диапазоне преобладает рассеяние излучения. С увеличением длины волны вклад рассеяния уменьшается.

Так, для длины волны 1,56 мкм коэффициент поглощения реберного хряща составляет $5,4 \pm 0,3$ см⁻¹, а приведенный коэффициент рассеяния¹ $7,7 \pm 0,6$ см⁻¹ [47]. При этом термическое воздействие лазерного излучения можно оценить с помощью эффективного коэффициента поглощения $\mu_{eff} = (3\mu_a(\mu_a + \mu'_s))^{1/2}$, где μ_a – коэффициент поглощения, μ'_s – приведенный коэффициент рассеяния [48]. Для реберного хряща и длины волны излучения 1,56 мкм μ_{eff} составляет 14 см⁻¹. Это означает, что лазерное излучение поглощается (ослабляется в e раз) в слое ткани толщиной около 2 мм. Данную длину волны целесообразно применять для изготовления имплантатов из реберного хряща толщиной 2 – 3 мм. В литературе рассмотрено применение различных длин волн для коррекции формы хрящевой ткани. Их сравнительная характеристика представлена в Табл.1. Можно видеть, что при использовании Er:YAG и CO₂-лазера излучение поглощается в приповерхностном слое ткани толщиной в несколько десятков мкм. Таким образом, прогрев большей толщины на данных длинах волн приведет к перегреву поверхности и деструкции ткани. Более равномерного нагрева хрящевой

¹ Приведенный коэффициент рассеяния рассчитывается по формуле $\mu'_s = \mu_s(1-g)$, где μ_s – коэффициент рассеяния, g – фактор анизотропии рассеяния.

ткани толщиной 1 – 3 мм можно добиться при использовании гольмиевого и эрбиевого волоконного лазера с длинами волн 2,10 и 1,56 мкм, соответственно.

Таблица 1. Типы лазеров, используемых для воздействия на хрящевую ткань.

Тип лазера	Длина волны	Глубина ослабления интенсивности излучения в e раз	Источник
CO ₂ -лазер	10,6 мкм	~10 мкм	[10,3]
Er:YAG	2,94 мкм	~ 70 мкм	[49]
Ho:YAG	2,10 мкм	1 мм	[50]
Er-волоконный	1,56 мкм	2 мм	[48]
Nd:YAG	1,44 мкм	0,8 мм	[10]
Nd:YAG	1,32 мкм	1,4 см	[10,51]
Диодный	0,98 мкм	5,6 см	[10]

На длине волны 1,44 мкм наблюдается максимум полосы поглощения воды (Рис.6). Поэтому коэффициент поглощения для данной длины волны составляет 32 см^{-1} , а излучение поглощается в слое, не превышающем 1 мм. Коэффициент поглощения для Nd:YAG лазера составляет около 2 см^{-1} , а соответствующая глубина поглощения излучения превышает 1 см [10]. На длине волны 0,98 мкм поглощение происходит в еще более глубоком слое в 5,6 см при коэффициенте поглощения около $0,5 \text{ см}^{-1}$ [10].

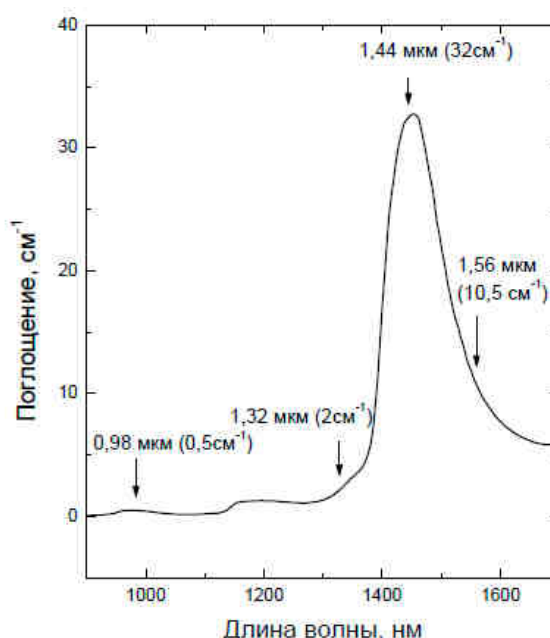


Рисунок 6. Спектр поглощения воды в ближней ИК области [10].

Вопрос о необходимости полного равномерного нагрева ткани по всей толщине на данный момент остается дискуссионным. Преимуществом такого воздействия

является наиболее полное снятие механических напряжений по всей толщине образца. Однако, как показывают исследования, равномерный нагрев приводит к гибели большинства клеток в зоне воздействия [32]. Таким образом, небольшая неравномерность нагрева при условии стабильности эффекта изменения формы может позволить сохранить жизнеспособность клеток и повысить безопасность процедуры.

При выборе параметров лазерного воздействия определяют также оптимальную плотность мощности и время экспозиции. Плотность мощности лазерного излучения соответствует мощности, отнесенной к площади поверхности воздействия. Интеграл от мгновенной мощности воздействия за определенный промежуток времени равен энергии, переданной системе за это время. Высокая плотность мощности может быть достигнута фокусировкой лазерного луча в небольшой площади поверхности, как, например, при доставке излучения через оптоволокно. При облучении ткани контактором с большой площадью поверхности мощность воздействия необходимо рассчитывать на площадь под контактором. Так как релаксация механических напряжений происходит за меньшие времена, чем денатурация ткани, теоретически было предсказано наличие «терапевтического окна» плотности энергии лазерного воздействия, позволяющего проводить модификацию ткани без существенного повреждения ее структуры [2]. На Рис.7 приведен вид «окна» в координатах флюенса энергии (интеграла по времени от плотности потока энергии) излучения и времени экспозиции.

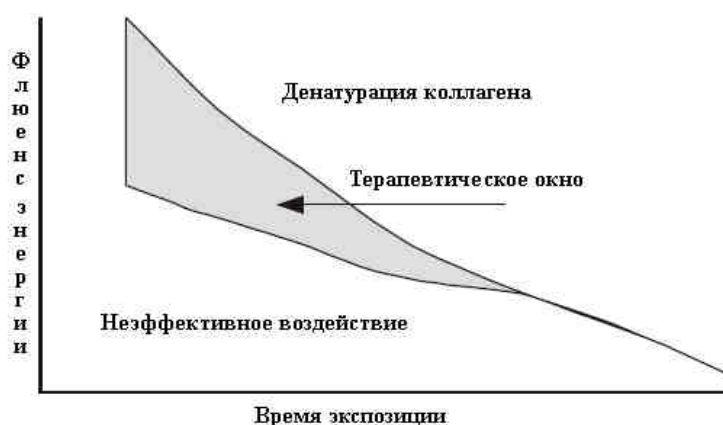


Рисунок 7. «Окно» допустимых режимов лазерного изменения формы [2].

При выборе больших энергий воздействия и малых времен, равно как и малых энергий при больших временах, изменение формы оказывается неэффективным. В то же

время, начиная с некоторого значения энергии воздействия, преобладающим процессом уже на малых временах становится денатурация коллагена и разрушение ткани. Таким образом, важной задачей при выборе параметров лазерного воздействия, таких как мощность излучения и время экспозиции, является соответствие их диапазону «терапевтического окна».

Для ряда длин волн, при использовании которых глубина поглощения излучения хрящевой тканью не превышает 1 – 2 мм, были экспериментально обнаружены параметры, при которых возможно проводить лазерную модификацию ткани без повреждения коллагеновой структуры [1]. Так, при использовании гольмиевого лазера с длиной волны 2,10 мкм время экспозиции в 4 сек позволило провести релаксацию напряжений в хряще носовой перегородки толщиной 1 мм без заметных повреждений хрящевого матрикса при значениях плотности энергии в 3 Дж/см² [50]. При более высоких значениях плотности энергии уже наблюдались термические повреждения структуры. Впоследствии данный лазер был использован в клинических испытаниях по изменению формы носовой перегородки [2]. При воздействии на хрящ носовой перегородки толщиной 1 – 2 мм эрбиевым волоконным лазером с длиной волны 1,56 мкм было показано, что форму хряща можно эффективно менять за время экспозиции 4 – 10 сек при мощности лазерного луча в пределах 3 – 4 Вт [10]. Для того, чтобы снизить риск перегрева ткани и сделать процесс нагрева более контролируемым, используют импульсно-периодические режимы лазерного нагрева. К тому же периодический режим «нагрев-охлаждение» предотвращает сильное обезвоживание области нагрева и за счет периодической циркуляции жидкости обеспечивает лучшее перераспределение заряженных частиц, ответственных за снятие механических напряжений [10]. В ходе анализа изложенных литературных данных в настоящей работе для изменения формы реберного хряща толщиной 2 – 3 мм был выбран эрбиевый волоконный лазер с длиной волны 1,56 мкм. Параметры лазерного воздействия подбирались на основе имеющихся в литературе параметров для изменения формы хряща носовой перегородки [10].

1.2.3. Регенерация хрящевой ткани

Термо-механический эффект неразрушающего лазерного воздействия позволяет не только осуществлять снятие механических напряжений и изменять форму хряща, но также дает возможность проводить активацию процессов регенерации ткани [2]. Неравномерный лазерный нагрев посредством импульсно-периодического воздействия

приводит к образованию микропор и каналов хрящевой структуры, способствующих циркуляции жидкости, содержащей питательные вещества и сигнальные молекулы, активирующие клеточный метаболизм. Известно, что колебательное воздействие на хондроциты с определенной частотой и амплитудой способно активировать клеточный метаболизм [52]. Импульсный лазерный нагрев модулирует колебательные термо-механические процессы в хрящевой ткани, воздействуя таким образом на хондроциты для активации их активности. Проблемы повреждения структуры представляют наибольшую актуальность для суставного хряща и хряща межпозвонкового диска. Повреждения данных типов хрящей приводят к развитию таких заболеваний, как артрит и болезни спины. Лазерная реконструкция межпозвонкового диска описана довольно подробно в ряде исследований [2,10,53,54]. Излучение подводится к поврежденному участку хрящевой ткани через кварцевое волокно, доставляемое с помощью тонкой иглы. При лазерном восстановлении межпозвонкового диска кролика было показано, что лазерное воздействие может инициировать рост хрящевой ткани гиалинового типа в поврежденных областях [2]. Признаки регенерации фиксировались через месяц после операции. Было установлено, что клетки восстановленной ткани соответствуют хондроцитам гиалинового хряща, в то время как матрикс представляет собой смешанный гиалиново-фиброзный тип. В дальнейшем данная процедура была успешно применена в клинических испытаниях на человеческом межпозвонковом диске при использовании лечебной установки на основе эрбиевого волоконного лазера с длиной волны 1,56 мкм [55]. Проведенные исследования показали, что возможный механизм лазерно-индуцированной регенерации хрящевой ткани включает следующие аспекты: (1) термо-механические осцилляции активируют клеточный метаболизм; (2) неравномерный лазерный нагрев способствует расширению субмикропор, обеспечивающих доставку питательных веществ; (3) повышение концентрации ионов Ca^{2+} в областях механического сжатия. Лазерная регенерация суставов была успешно продемонстрирована для суставов кроликов и минисвиной [10,53]. Воздействию подвергались дефекты глубиной 0,5 – 0,7 мм и размером 3 – 15 мм. Было показано, что через 6 недель после воздействия облученные дефекты полностью восстанавливаются и заполняются хрящевой тканью гиалинового и гиалиново-фиброзного типа.

1.2.4. Проблемы ранней диагностики деградации хряща и локализации лазерного воздействия.

Актуальными проблемами восстановительной медицины хряща являются возможность ранней диагностики деградации хряща, а также локализация лечебного воздействия в областях, содержащих дефекты, для снижения возможных негативных последствий воздействия на соседние здоровые области ткани. В настоящее время неинвазивная клиническая диагностика состояния суставов и спины проводится методами оптической когерентной и магнитно-резонансной томографии (ОКТ, МРТ). Предельное разрешение данных методов составляет сотни микрометров [56,57]. Как правило, диагностика позволяет обнаружить дефекты порядка нескольких миллиметров, свидетельствующих уже о серьезной стадии развития заболевания. Однако было показано, что развитие деградации хрящевой ткани начинается локально на молекулярном уровне с образования нано- и микродефектов, которым предшествует нарушение структуры протеогликанов и дефибриллизация коллагена хряща [24]. Развитие методов повышения чувствительности диагностики поможет обнаружить дефекты на ранней стадии их появления. Одним из возможных решений данной проблемы является введение добавок, поглощающих лазерное излучение (для ОКТ) или повышающих сигнал МРТ. Таковыми могут являться магнитные наночастицы при условии их селективного введения в дефекты хрящевой структуры, а также безопасности их использования для компонентов ткани и организма в целом. В последнее время применение наночастиц открывает новые возможности для медицинской диагностики и терапии там, где невозможно улучшение другими методами. Например, в ОКТ наночастицы с сильной люминесценцией и стабильностью к выгоранию могут заменить органические красители, используемые на практике [58]. МРТ позволяет проводить послойную диагностику большинства внутренних органов, включая мозг и опорно-двигательный аппарат. Поэтому повышение чувствительности данного метода представляет собой насущную задачу. Принцип действия получения сигнала МРТ основан на разнице двух характеристических времен T1 и T2, которые соответствуют времени спин-решеточной релаксации - возвращению ядерных спинов протонов к равновесному состоянию (магнитные моменты ядер выстраиваются вдоль направления внешнего постоянного магнитного поля) после возбуждения их импульсом

переменного магнитного поля и времени спин-спиновой релаксации протонов. Данные времена релаксации зависят от окружения протонов и от состояния тканей. Основной трудностью диагностики МРТ, существенно снижающей возможности ее применения, является малая разница времен релаксации для большинства случаев развития заболеваний на ранней стадии. Таким образом, введение контрастных агентов приобретает актуальность. Было продемонстрировано, что во многих случаях использование магнитных наночастиц более эффективно, чем стандартного магнитного вещества на основе гадолиния [59,60]. Наночастицы на основе железа обладают большим магнитным моментом в присутствии внешнего магнитного поля и обеспечивают снижение времени релаксации T₂. В зависимости от состава и размера рассматриваются различные медицинские применения магнитных наночастиц, такие как диагностика метастаз печени и лимфатической системы, воспалительных и дегенеративных заболеваний внутренних органов [60].

Попытки диагностики состояния хрящевой ткани с помощью введения магнитных наночастиц предпринимались в ряде исследований [61,62]. В настоящей работе рассматриваются аспекты селективного введения (импрегнации) магнитных наночастиц в дефекты хрящевой структуры на ранних стадиях их развития. Моделирование ранних стадий хрящевой деградации планируется проводить посредством лазерного облучения хряща в неразрушающем режиме. Поскольку лазерное воздействие приводит к образованию субмикропор размером 100 – 300 нм [37], что соответствует размеру дефектов на ранней стадии [24], оно может быть использовано для создания моделей хряща, соответствующих ранней стадии деградации. Локальность лазерного воздействия позволит отследить селективность импрегнации наночастиц в областях ткани, содержащих дефекты.

1.3. Методы исследования структуры хряща

В настоящей работе будут рассматриваться структурные изменения в хрящевой ткани при лазерном воздействии и импрегнации магнитных наночастиц. Данный раздел посвящен методам анализа, позволяющим исследовать структуру компонентов хряща: коллагена, протеогликанов и хондроцитов на различных уровнях их организации, а также имеющиеся к настоящему моменту литературным данным о структуре хряща после неразрушающего лазерного воздействия.

1.3.1. Микроскопия

1.3.1.1. Световая микроскопия

Основными методами изучения биологических микрообъектов являются световая и электронная микроскопия. Минимальный размер структуры, различимой в световой и электронный микроскоп определяется наименьшим разрешаемым расстоянием $d_0 = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$, где λ – длина волны света, n – показатель преломления среды между образцом и объективом, α – «апертурный угол» (половина угла, который захватывает объектив). У хороших микроскопов α близок к 90° , следовательно, предельное разрешение близко к дифракционному пределу $\lambda/2n$. Минимальная длина волны видимой части спектра составляет около 400 нм, а предельный различимый размер при $n=1$, соответственно, 200 нм. Это позволяет исследовать в световой микроскоп клетки, чьи размеры изменяются в широких пределах от 4 до 150 мкм, и более мелкие клеточные органеллы с достаточно хорошим разрешением. Использование ультрафиолетовой микроскопии с минимальной длиной волны 200 нм позволяет различать объекты размером до 100 нм [7]. В световой микроскопии, как правило, для анализа используют гистологические препараты в виде срезов ткани, но в ряде случаев анализируют их отпечаток или пленку. Подготовка препарата включает следующие стадии: (1) забор и фиксация материала, (2) обезвоживание и уплотнение, (3) изготовление срезов, (4) окрашивание или контрастирование [2]. В качестве фиксатора могут выступать спирт, формалин, раствор солей тяжелых металлов, глутаровый альдегид и т.д. Фиксация делает невозможным процессы разложения ткани и сохраняет ее структуры в неизменном состоянии за счет протекания ряда физико-химических процессов: высушивания, уплотнения, свертывания ферментов. Высушивание проводится посредством выдерживания материала в растворах спиртов возрастающей концентрации. Уплотнение материала производится путем пропитывания его парафином или органическими смолами. Далее производится микротомирование срезов и их окрашивание. Различают обычные срезы толщиной около 5 мкм и полутонкие срезы толщиной 1 мкм. Анализ полутонких срезов дает больше информации о состоянии цитоплазмы и клеточных органелл. Для исследования отдельных компонентов биологических тканей применяют различные типы окрашивания срезов: используют кислые, основные и нейтральные гистологические красители [63].

Краситель может избирательно взаимодействовать с отдельными тканевыми компонентами, либо с целым рядом компонент. Так, эозин представляет собой кислый краситель, окрашивающий цитоплазму клеток в розово-оранжевый цвет за счет взаимодействия с эозинофильными внутри- и внеклеточными белками. Его используют в комбинации с гематоксилином, окрашивающим в ярко-синий цвет компоненты, содержащие нуклеиновые кислоты: клеточное ядро, рибосомы и РНК-богатые участки цитоплазмы. Окраска гематоксилином и эозином является наиболее распространенным методом гистологического анализа состояния клеток и матрикса тканей. Срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, анализируют на наличие пикноза (сморщивание ядра, вызванное конденсацией хроматина), рексиса (распад клеточного ядра на части) и лизиса (растворение частиц распавшегося ядра в цитоплазме клетки) клеточных ядер, а по гомогенности окрашивания матрикса судят о его повреждениях [7].

Краситель толуидиновый синий обладает метахроматическими свойствами. Это означает, что некоторые компоненты ткани при взаимодействии с ним могут окрашиваться в цвета, отличные от цветового тона самого красителя. При окраске толуидиновым синим наблюдается метахромазия от красно-фиолетового до красного. Метахроматически могут окрашиваться вещества с большой молекулярной массой и содержащие свободные отрицательно заряженные группы. В частности, толуидиновый синий является индикатором на кислые гликозаминогликаны, окрашивая их в интенсивный фиолетовый цвет. В таком случае, говоря об интенсивности метахромазии, подразумевают интенсивность фиолетового окрашивания. Толуидиновый синий также взаимодействует с РНК клеточных ядер, окрашивая их в синий цвет [63]. По интенсивности метахромазии можно судить о содержании в хрящевом препарате кислых гликозаминогликанов. При исследовании соединительных тканей также распространенным методом является окрашивание по Ван Гизону. Окрашивание производится смесью кислого фуксина и пикриновой кислоты. Фуксин окрашивает коллагеновые волокна в яркий розовато-красный цвет. Структуры ткани, не содержащие коллагена, приобретают желтую окраску. Сравнительный анализ интенсивности и гомогенности окрашивания дает информацию о содержании коллагена и возможных повреждениях его структуры.

Разновидностью световой является флюоресцентная микроскопия. Данный метод основан на способности отдельных компонентов ткани излучать в видимом диапазоне спектра при возбуждении их короткими волнами ближнефиолетовой или синефиолетовой области. Длина световой волны флюоресценции всегда больше длины волны возбуждающего излучения [7,42]. Собственной флюоресценцией обладает любая клетка живого организма, но интенсивность ее, как правило, оказывается слабой. Собственной флюоресценцией обладают также серотонин и катехоламины (адреналин, норадреналин) [7]. Для усиления флюоресценции применяют обработку ткани флюорохромными красителями. Анализ жизнеспособности клеток удобно проводить при использовании флюорохрома акридинового оранжевого, при взаимодействии с которым ДНК клеток излучает зеленое свечение, а РНК – красное. Еще одним способом усиления контраста изображения в световой микроскопии является метод фазового контраста [42], в котором за счет особенностей устройства оптики создается возможность преобразовывать невоспринимаемые глазом фазовые изменения света, прошедшего через препарат, в изменения его амплитуды. Такое устройство объектива позволяет различать структуры по показателю их преломления.

Рельеф поверхности клеток и биомакромолекул, а также количественные характеристики ткани, такие как масса отдельных элементов, можно исследовать методом интерференционной или дифференциальной интерференционной микроскопии [7]. В данных методах свет, посылаемый на образец, разделяется на два потока: один проходит через образец и меняет фазу колебания, а другой минует образец, не претерпевая изменений. В объективе два световых потока соединяются и интерферируют. Благодаря такому устройству, участки образца различной толщины и плотности обладают различной степенью контрастности.

Использование конфокального микроскопа также позволяет существенно повысить контраст изображения за счет отрезания апертурой фонового света, рассеянного из глубины образца [42]. Такое устройство обеспечивает возможность наблюдения с большой четкостью биообъектов, показатель преломления которых близок к показателю преломления воздуха.

1.3.1.2. Электронная микроскопия

Методы сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии позволяют изучать объекты в широком диапазоне увеличений от макроуровня организации

матрикса до самых тонких клеточных мембран и ДНК структуры клеточных ядер. ПЭМ позволяет с большой прецизионностью исследовать клеточные органеллы и молекулы матрикса, а СЭМ - получать объемные изображения поверхности [7,64]. В данном методе большую сложность представляет пробоподготовка, так как образцы биологических тканей, как правило, очень слабо взаимодействуют с электронами. Используют ультратонкие срезы (до 50 нм), которые получают после многостадийной процедуры фиксации, высушивания тканей и заливки в твердые среды (смолы). Для повышения контраста изображения применяют различные типы окрашивания на основе тяжелых металлов. Наиболее распространенными контрастными агентами являются уранилацетат и цитрат свинца [64]. Криотомирование позволяет получать тонкие сколы ткани в тех случаях, когда химическая обработка и помещение в смолу не могут быть применены [65]. Тогда ткани быстро охлаждают до -196°C в жидком азоте. Это замедляет процессы клеточного метаболизма и перехода воды из жидкого в твердое состояние и позволяет изучать, например, активность ферментов и иммунохимические реакции [7]. Сверхвысоковольтная электронная микроскопия использует напряжения до 3 000 000 В для проведения трехмерной визуализации толстых объектов с высоким разрешением до 0,5 нм [7]. Тем не менее, методы электронной микроскопии малопригодны для исследования пространственных конформаций биомолекул вследствие сильного разрушающего воздействия на стадиях пробоподготовки и облучения электронным пучком большого напряжения.

1.3.1.3. Атомно-силовая микроскопия

В данном методе осуществляется микронзондирование поверхности образца. Между зондом, толщина сканирующей головки которого составляет всего несколько атомарных слоев, и поверхностью образца устанавливается баланс взаимодействия определенной природы, куда могут входить электростатические, магнитные, Ван дер Ваальсовы, дисперсионные и другие взаимодействия [66]. Принципиальная схема устройства атомно-силового микроскопа приведена на Рис.8. Система обратной связи поддерживает на постоянном уровне сигнал, соответствующий силе рабочего взаимодействия, изменяя Z-координату зонда. Поскольку в процессе сканирования сила взаимодействия изменяется в зависимости от структуры поверхности, усилия системы обратной связи на поддержание ее постоянства коррелируют со свойствами изучаемой поверхности. Различают три режима получения изображения: (1) контактный, когда

зонд касается поверхности образца; (2) полуконтактный, когда зонд совершает над образцом осциллирующие колебания, касаясь поверхности в нижней части своей траектории; (3) бесконтактный, когда зонд осциллирует над образцом без касания поверхности. В режиме (3) анализируется вариация Z, необходимая для поддержания постоянной амплитуды колебания зонда. Позиционирование образца относительно зонда осуществляется с помощью пьезоманипулятора. Зондирование образца осуществляется с помощью специальной упругой консоли – левера (кантилевера) с острым зондом на конце. Такие консоли изготавливаются фотолитографией и травлением из кремния. Чаще всего используют консоли из кремния, оксида или нитрида кремния [67].

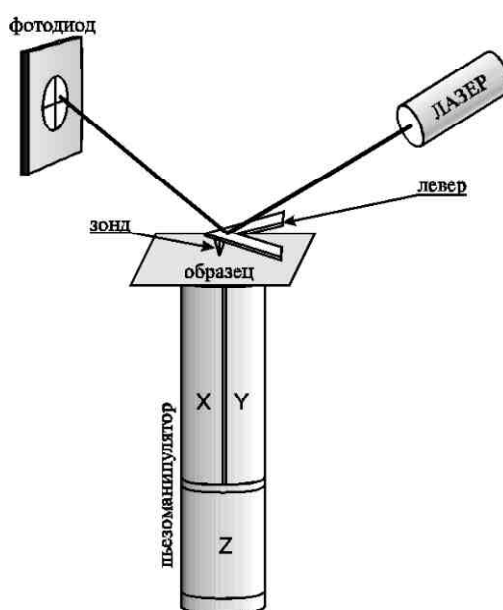


Рисунок 8. Принципиальная схема устройства экспериментальной ячейки АСМ [68].

АСМ представляет собой удобный метод анализа биообъектов, так как она не требует разрушающей пробоподготовки, как в случае с электронной микроскопией. К тому же анализ топографии поверхности позволяет проводить измерения шероховатости, зернистости, впадин и наклона, строить 3D модели поверхности [67]. В последнее время развиваются методики АСМ анализа упругих свойств различных биосистем, в том числе компонентов хрящевой ткани [69]. Визуализация коллагенового каркаса хрящевой ткани методом АСМ может быть осуществлена без дополнительной обработки [70], в то время как для получения изображений протеогликановых агрегатов необходимо проводить их ферментативное выделение [71]. В работе [24] было предложено проводить комплексный анализ АСМ для детектирования ранних стадий деградации хрящевой ткани. На основе измерений толщины и упругости коллагеновых

фибрилл в суставном хряще мышей была выявлена четкая зависимость между количеством деградирующих фибрилл и возрастом животного. Было установлено, что ранние изменения начинаются с деградации отдельных коллагеновых фибрилл и снижения содержания гликозаминогликанов. В более ранних работах, посвященных анализу протеогликановой подсистемы, было установлено, что такие заболевания как остеоартрит, ревматоидный артрит и др. могут быть вызваны утратившими гликозаминогликановыми молекулами способности к образованию устойчивых агрегатов [72,73]. Нарушение свойств протеогликанов приводит к большей уязвимости коллагеновой сети для механического поражения и ее деградации.

АСМ изображения хряща носовой перегородки, облученного CO₂-лазером в режиме изменения формы, позволили установить наличие субмикропор и каналов размером 100 – 400 нм, отличающихся от пор интактного хряща, размер которых варьировался в пределах 20 – 30 нм. [1] (Рис.9).

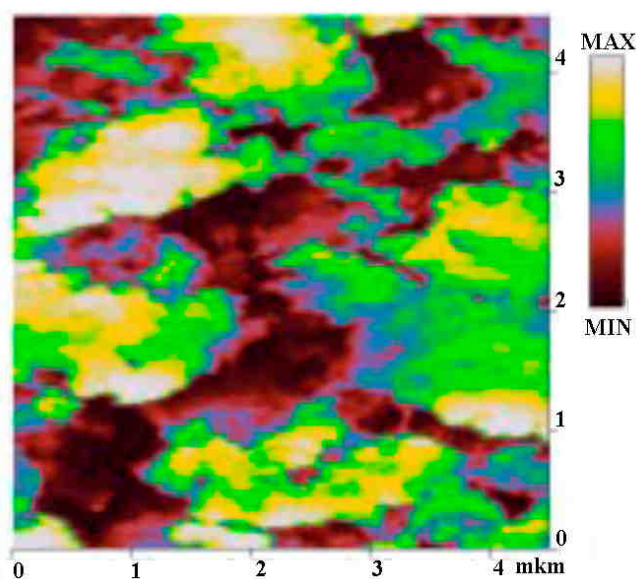


Рисунок 9. АСМ изображение пор в хряще носовой перегородки [1].

1.3.2. Дифференциальная сканирующая калориметрия.

Физико-химические изменения в хрящевой ткани после лазерного воздействия, в частности, степень денатурации коллагена, могут быть исследованы методом ДСК. Устройство ячейки ДСК позволяет определять тепловой поток, который вычисляется по разности температур в исследуемом образце и образце сравнения в один и тот же момент времени. На Рис.10 приведена принципиальная схема прибора ДСК [74]. В приборе с помощью термопар измеряется температура симметрично установленных тиглей с исследуемым образцом и образцом сравнения.

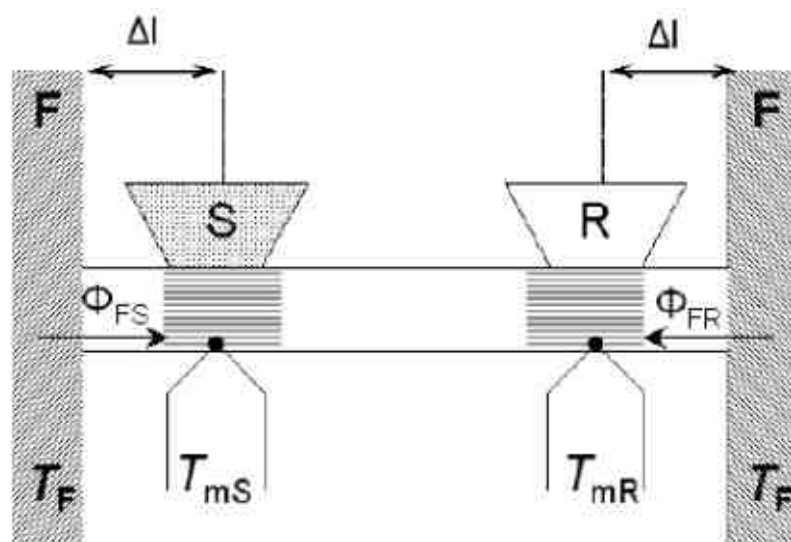


Рисунок 10. Принципиальная схема устройства дифференциального сканирующего калориметра. F (furnace) – нагреватель; T_F – температура нагревателя; Δl – расстояние между нагревателем и тиглем; S (sample) – исследуемый образец; R (reference) – образец сравнения; Φ_{FS} и Φ_{FR} – тепловые потоки от нагревателя к образцам; T_{mS} и T_{mR} – измеренные температуры образцов [74].

В теории ДСК существует несколько приближений. Нулевое приближение подразумевает отсутствие химических или фазовых превращений в исследуемом образце. Принимаются следующие утверждения:

1. Состояние системы является стационарным, т. е. тепловой поток не зависит от времени.
2. Теплообмен между ячейкой с образцом и ячейкой сравнения отсутствует.
3. Наличием нескольких границ раздела фаз (образец/тигель, тигель/сенсор, сенсор/теплопроводящая колонка) можно пренебречь.
4. Учитывается только теплоемкость образца и эталона.
5. Измеряемые температуры приписываются непосредственно образцу и эталону.

При этом считается, что все тепло передается от теплопроводящей колонки к образцу путем теплопроводности, исключая конвекцию и тепловое излучение. В рамках данного приближения справедлива следующая зависимость:

$$DSC \sim \Delta T_{SR} = -r\beta\Delta C_{p,SR},$$

где DSC – аналитический сигнал прибора; ΔT_{SR} – разность температур исследуемого образца и образца сравнения; r – тепловое сопротивление проводника; $r = \frac{\Delta x}{S\lambda}$, Δx –

длина теплопроводящего участка; β – скорость изменения температуры нагревателя; $C_{p,SR}$ – разность изобарных теплоемкостей исследуемого образца и образца сравнения. При переходе к системам с химическими реакциями или фазовыми переходами теоретическая модель изменяется. Данные системы изучаются в рамках первого приближения, в котором отсутствует условие стационарности теплового потока. Так как в исследуемом образце происходит процесс, сопровождающийся тепловым эффектом, в выражение для аналитического сигнала прибора вводится дополнительный тепловой поток Φ_r , положительный для эндотермических процессов и отрицательный для экзотермических. Таким образом, в данном приближении тепловой поток зависит не только от теплоемкости образца, но и от теплового эффекта:

$$DSC \sim \Delta T_{SR} = -r\Phi_r - r\beta\Delta C_{p,SR} - \tau_1 \frac{d\Delta T_{SR}}{dt},$$

где τ_1 - первая константа времени. Эта зависимость показывает, что сигнал не пропорционален потоку Φ_r . Появление третьего слагаемого обусловлено тем, что сигнал запаздывает по времени относительно процесса, происходящего в образце.

Теплоту процесса можно рассчитать, проинтегрировав тепловой поток по времени:

$$Q_r = \int_{t_1}^{t_2} \Phi_r dt = -\int_{t_1}^{t_2} \frac{\Delta T_{SR}}{r} dt - \int_{t_1}^{t_2} (\beta\Delta C_{p,SR}) dt - \int_{t_1}^{t_2} \left(\frac{\tau_1}{r} \cdot \frac{d\Delta T_{SR}}{dt}\right) dt.$$

Для упрощения данного выражения теплоемкости и тепловое сопротивление считаются не зависящими от температуры и, следовательно, от времени. Таким образом, третье слагаемое обращается в ноль. При проведении исследования ДСК кривая не имеет никаких аномалий, если в данном интервале температур не протекают химические или фазовые превращения. Если в системе происходят какие-либо процессы, сопровождающиеся поглощением или выделением тепла, то на кривой ДСК это отражается в виде пика.

ДСК широко применяется для исследования процессов, протекающих при нагревании различных типов соединительных тканей. При длительном нагревании до температуры 70°C в тканях происходит денатурация коллагена, т.е. разупорядочение коллагеновых фибрилл и разрушение тройных спиралей. [75]. Этот процесс может рассматриваться как фазовый переход первого рода (спираль – виток), изменение энтальпии которого составляет 65 ± 5 Дж/г. В хрящевой ткани коллагеновый каркас

стабилизирован взаимодействием с протеогликановой подсистемой, что позволяет проводить кратковременный локальный нагрев хряща до температур более 100°C без денатурации коллагена [76]. При проведении ДСК эксперимента для изучения структурных изменений хрящевой ткани после лазерного облучения данные исследуемого образца целесообразно сравнивать с результатами эксперимента с необлученным образцом. В случае полной или частичной денатурации коллагена в исследуемом образце эндотермический эффект на кривой ДСК будет проявляться в меньшей степени по сравнению с необлученным образцом. По разности площадей пиков для облученного и необлученного образцов можно оценить степень денатурации коллагена при данном режиме лазерного воздействия.

Тепловые эффекты при исследовании гиалиновых хрящей методом ДСК наблюдаются в диапазоне температур 60 - 80°C [76,77]. Так, в работе [76] исследовался хрящ носовой перегородки до и после лазерного облучения. На термограмме необлученных образцов наблюдались эндотермические процессы в диапазоне 65°C - 80°C, однако суммарный тепловой эффект (10 Дж/г) был заметно ниже, чем изменение энтальпии процесса денатурации коллагена. Авторы объясняют термическую устойчивость структуры вкладом протеогликановой сети в стабилизацию коллагеновых фибрилл. Лазерный нагрев образцов вплоть до 70°C не вызывал существенных изменений на термограммах. При нагреве выше 70°C в течение более чем 10 сек, происходили изменения в структуре, проявившиеся на термограмме в виде уменьшения величины эффекта или его отсутствия.

Фазовый переход на термограмме хряща трахеи наблюдался при температуре 61,8°C и сопровождался также небольшим изменением энтальпии (0,49 Дж/г) [77].

Сравнительный анализ данных ДСК для фиброзной соединительной ткани и гиалинового хряща [78] показал, что термическая устойчивость коллагена определяется структурой ткани и возможностью стабилизации коллагеновой сети. Так, для фиброзной соединительной ткани, содержащей до 80% свободного коллагена, наблюдались тепловые эффекты при 70°C (для ткани, содержащей 70% воды) с энтальпией перехода 46,0 Дж/г, и в диапазоне 110°C - 125°C (для ткани, содержащей 13,5% воды) с энтальпией перехода 43,8 Дж/г. На термограмме гиалинового хряща носовой перегородки наблюдался переход в диапазоне 70 - 90°C, изменение энтальпии которого составило 9 Дж/г. Авторы относят данный переход к процессу денатурации коллагена

IX, содержание которого в гиалиновом хряще составляет не более 10% всей массы коллагена. Коллаген II типа, стабилизированный сетью протеогликановых агрегатов, по мнению авторов, не может денатурировать при нагреве ниже 100°C. Такое поведение связано с большим числом межмолекулярных связей в протеогликаново-коллагеновой сети, понижающих число возможных конформаций, принимаемых коллагеном в процессе денатурации. Таким образом, согласно соотношению $T_{\phi.n} = \frac{\Delta H_{\phi.n}}{\Delta S_{\phi.n}}$, происходит понижение энтропии фазового перехода и повышение его температуры. Фиброзная соединительная ткань и хрящ подвергались лазерному воздействию в различных режимах. Было установлено, что при нагревании тканей выше 70°C в течение нескольких секунд отмечаются изменения на их термограммах. Наблюдаемые пики становятся размытыми, величина теплового эффекта уменьшается в несколько раз [78].

Вклад протеогликановой подсистемы в стабилизацию коллагена может быть установлен также путем исследования тепловых свойств хрящевых образцов, подвергнутых ферментативной обработке. В работе [79] образцы хряща носовой перегородки обрабатывали раствором α -химотрипсина, фермента, разрушающего протеогликановую подсистему. На термограммах интактных образцов наблюдались тепловые эффекты в диапазоне 60°C - 85°C величиной 5 – 20 Дж/г, в то время как для образцов, обработанных ферментом, изменение энтальпии в этом же диапазоне температур составляло 58 Дж/г. Обработке α -химотрипсином подвергались хрящевые образцы после лазерного облучения. Величина наблюдаемого теплового эффекта при этом в зависимости от режима лазерного воздействия существенно понижалась (0 – 47 Дж/г). При лазерном воздействии выше 85°C в течение нескольких секунд на термограммах соответствующих образцов не наблюдалось теплового эффекта.

1.4. Наночастицы магнетита

1.4.1. Наночастицы в медицине

В последнее время активно развиваются методы медицинского применения биофункциональных наночастиц для повышения эффективности диагностики и терапии [80,81]. Неоднородности структуры внутри- и межклеточного матрикса биологических тканей, клеточные компоненты и газовые пузырьки образуют центры аккумуляции наночастиц за счет взаимодействий различной природы: кулоновского, Ван дер Ваальсового, дисперсионного и др. В связи с этим адресная доставка наночастиц

представляет нетривиальную задачу. Для управления транспортом наночастиц их функционализируют иммунохимическими агентами, либо проводят оптическое манипулирование движением наночастиц в клетках и тканях [82], что серьезно усложняет методы терапии и ограничивает сферу их применения. Железосодержащие наночастицы вызывают повышенный интерес в связи с возможностью неинвазивного магнитного управления их доставкой. Магнетит Fe_3O_4 и маггемит $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ проявляют ферромагнитные свойства при комнатной температуре. Магнитные свойства магнетита более выражены, чем у маггемита, но магнетит менее химически стабилен в присутствии окислителей. Магнитные наночастицы на основе железа обладают низкой токсичностью в широком диапазоне концентраций [83] и разрешены к применению в ряде стран, в частности, управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов Министерства здравоохранения США наночастицы магнетита разрешены для применения в МРТ диагностике состояния печени [84]. Низкая токсичность железа и его оксидов объясняется тем, что железо участвует в процессах метаболизма. Так, железо присутствует в организме в виде белковых комплексов ферритина, трансферрина и гемосидерина. Общее содержание железа в организме составляет около 3500 мг, что сильно превышает используемые для диагностики количества в диапазоне от 5 до 200 мг [85]. Отдельные виды наночастиц на основе железа являются зарегистрированными торговыми марками и используются в медицине. Например, Ferumoxides (Endorem® в Европе, Feridex® в США и Японии) и Ferucar-botran (Resovist® в Европе и Японии) используются в гипертермии опухолей печени. В ряде исследований наночастицы магнетита тестируются как функциональные добавки, повышающие чувствительность диагностики состояния суставов [86]. Разрабатываются методы применения железосодержащих наночастиц в ультразвуковой диагностике [87], доставке лекарств [88], гипертермии раковых опухолей [89]. Основной причиной токсичности наночастиц оксидов железа является участие поверхности наночастиц, содержащей активный кислород, в процессах окисления биомолекул и превышение окисляющих кислородных единиц над количеством антиоксидантов [90]. Масштабное окисление компонентов клеток и матрикса может привести к развитию некротических изменений ткани в областях с наночастицами [91]. Модификация поверхности наночастиц органическими молекулами способствует повышению их биосовместимости и снижению токсичности. Хорошая биосовместимость небольших железных наночастиц объясняется также

способностью их переработки макрофагами, что было продемонстрировано для печени, селезенки и спинного мозга [85,92]. Различные наночастицы на основе оксидов железа демонстрируют период полувыведения из кровеносной системы организма в течение 24 - 36 ч [85]. Разложение их макрофагами происходит за время порядка 7 дней [93].

В литературе имеются данные по введению наночастиц различной природы в хрящевую ткань. Так, наночастицы из полипропилена, модифицированные биомолекулярным лигандом для лучшего связывания с коллагеном хрящевого матрикса, вводились в суставной хрящ мыши [94]. Авторы данной работы рассматривают этот метод в качестве хорошего способа повышения проницаемости хрящевой ткани для лекарственных веществ, а также обеспечения возможности селективного связывания лигандов с коллагеном II типа, что позволит проводить адресную доставку лекарства в хрящевую ткань. Наночастицы оксида тантала с нейтральными, катионными и анионными лигандами предложены в качестве контрастных агентов для повышения чувствительности метода рентгеновской компьютерной томографии суставов [95]. Актуальность применения магнитных наночастиц для повышения эффективности лазерной диагностики и терапии хрящевой ткани посредством их импрегнации в дефекты хрящевой структуры была рассмотрена в п. **1.2.4**. В рамках данной задачи наночастицы должны отвечать ряду требований: иметь стабильный малый размер, проявлять химическую и термическую стабильность наряду с малой токсичностью, а также обеспечивать необходимый фототермический эффект. Взаимодействие железосодержащих наночастиц с компонентами хрящевой ткани изучено недостаточно подробно. Возможность магнитоуправляемой импрегнации наночастиц в хрящевую ткань была продемонстрирована в ряде пилотных работ [96,97,98]. В частности, была установлена возможность наночастиц магнетита проникать и накапливаться в дефектах структуры хряща [96,98]. Были использованы коммерческие наночастицы магнетита, модифицированные декстраном. Однако наблюдаемая агломерация наночастиц представляет серьезную трудность, способную привести к попаданию в поврежденные области хряща слишком больших концентраций магнетита, приводящих к перегреву ткани при лазерном воздействии. Возможное действие магнетита на клетки и матрикс хряща при лазерном облучении также должно быть исследовано.

1.4.2. Синтез и стабилизация

Основной проблемой магнитных наночастиц является нестабильность их размерного распределения за счет образования агломератов. Поэтому разрабатываются различные методы стабилизации [99]. Три принципиальных подхода могут быть рассмотрены: (1) замедление диффузии наночастиц в среде с большой вязкостью, (2) получение гетерогенных частиц типа «ядро-оболочка», (3) модификация поверхности наночастиц различными агентами. Третий способ позволяет улучшить биосовместимость наночастиц за счет подбора подходящего стабилизатора. Химический синтез наночастиц Fe_3O_4 можно проводить двумя путями: окислением солей железа (II) или соосаждением солей железа (II) и железа (III). Некоторые авторы предлагают также проводить контролируемое восстановление солей железа (III) [100], однако последний способ требует применения органических растворителей, загрязняющих продукты. Реакция соосаждения в присутствии основания может быть представлена следующей схемой:



Вариации исходного молярного соотношения реагентов влияют на состав продуктов, размер наночастиц и их магнитные свойства [101]. С возрастанием ионной силы раствора размер образующихся частиц понижается. Параметры образующейся дисперсии зависят от многих факторов, таких как pH, начальная концентрация, скорость перемешивания [102]. Стабилизация наночастиц может проводиться различными агентами: низкомолекулярными органическими соединениями [103], биополимерами [104], в том числе полисахаридами [105]. Полисахаридные стабилизаторы за счет своих гидрофильных свойств демонстрируют хорошие результаты по биосовместимости, биоразлагаемости и низкой токсичности. Благодаря высокой молекулярной массе и разветвленности молекул, полисахариды обеспечивают достаточно устойчивый каркас, способный поддерживать стабильность наночастиц в широком диапазоне температур, pH и времен хранения. Полисахариды как стабилизаторы наночастиц для медицинских применений исследованы довольно подробно [106,107]. Альтернативными методами синтеза и контроля размера наночастиц являются микроэмульсионный синтез [108], термическая деструкция пентакарбонила железа $Fe(CO)_5$ [109], лазерная абляция в жидкости [110], а также синтез наночастиц магнетита некоторыми видами бактерий [111].

1.4.3. Краткий обзор методов характеристики

Для биомедицинских применений основное значение имеют такие параметры дисперсии, как размерное распределение наночастиц и его стабильность при хранении и изменении температуры. Контролировать данные параметры можно с помощью десятков различных методов, которые условно можно разделить на микроскопические и спектроскопические. Достаточно полно характеристика магнитных наночастиц проведена в работах [101,102,104,106,107,109,112,113]. Данные ПЭМ и СЭМ по размеру наночастиц могут не соответствовать их реальному размеру в дисперсии за счет агломерации, а также взаимодействия с молекулами стабилизатора. Седиментационные методы, а также методы, основанные на анализе рассеянного образцом излучения, позволяют оценить средний размер наночастиц в их дисперсии. Так, метод аналитического ультрацентрифугирования активно используется для анализа наноразмерных объектов, таких как белки и полисахариды, в их дисперсиях и растворах [114,115]. При наличии в системе нескольких компонент метод позволит определять несколько констант седиментации, характеризующих каждый компонент по отдельности. Метод основан на спектроскопическом определении константы седиментации по скорости осаждения молекул в ячейке ультрацентрифуги. Константа седиментации S связана с молекулярной массой исследуемого вещества M по уравнению Сведберга:

$$M = \frac{R \cdot T \cdot S}{D(1 - \nu\rho)},$$

где R – универсальная газовая постоянная, T – температура, D – коэффициент диффузии, ν – парциальный удельный объем молекулы, ρ – плотность растворителя. Для крупных частиц от 10 нм и более целесообразно использовать метод динамического лазерного светорассеяния. Он отличается от методов статического светорассеяния тем, что учитывает тепловое движение частиц. Метод основан на измерении броуновского движения частиц в системе и сопоставлении его с размером частиц [116]. Размерное распределение по гидродинамическому радиусу частиц строится на основе анализа корреляционных функций затухания интенсивности сигнала рассеянного системой частиц излучения со временем. Затухание корреляции интенсивности света, рассеянного частицами различного размера, происходит за времена в диапазоне от нано- до микро- и миллисекунд. Время затухания тем больше, чем больше размер частицы и меньше

скорость ее броуновского движения. Размер частицы связан со скоростью ее движения в системе через соотношение Стокса-Эйнштейна:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r},$$

где D – коэффициент диффузии, k_B – константа Больцмана, T – температура, η – вязкость среды, r – гидродинамический радиус частицы. Устройство ДЛС ячейки позволяет также проводить анализ распределения при различной температуре.

1.5. Выводы по результатам обзора литературы

Подводя итог анализу литературы, можно сделать следующие выводы:

1. В качестве основных объектов, представляющих интерес для структурных исследований при их лазерной неразрушающей модификации, а также разработке методов контроля за поглощением лазерного излучения, можно выделить реберный и суставной хрящ.

2. Для реберного хряща отсутствуют литературные данные по лазерному изменению его формы. В указанной работе по лазерной модификации реберного хряща проводилась стабилизация остаточных напряжений, степень которой оказалась недостаточна для предсказания конечной формы хряща, что отмечают сами авторы [30]. В связи с этим одну из задач настоящей работы можно обозначить как поиск условий безопасного и стабильного лазерного изменения формы реберного хряща.

3. Опубликовано множество работ, где для управления поглощением излучения для терапевтических и диагностических целей используют наночастицы. Применительно к хрящевой ткани данные по использованию наночастиц ограничены методиками повышения чувствительности МРТ исследований суставов, доставки лекарств, а также отдельными работами по проведению магнитоуправляемой импрегнации. В настоящей работе планируется провести импрегнацию наночастиц в интактную хрящевую ткань и хрящ ранней стадии деградации и выяснить зависимость распределения наночастиц от состояния ткани, а также исследовать микроструктуру хряща, содержащего наночастицы.

4. Одним из наиболее изученных, безопасных и широко используемых типов неорганических наночастиц для биомедицинских приложений являются наночастицы на основе оксидов железа. В настоящей работе планируется использовать наночастицы магнетита для изучения возможности управления поглощением лазерного воздействия на хрящевую ткань в методах лазерной регенерации и изменения формы хряща.

5. Основной трудностью при использовании магнитных наночастиц для импрегнации в ткань является их агрегация. Таким образом, в настоящей работе планируется синтез и стабилизация дисперсии наночастиц биосовместимым агентом, а также контроль стабильности размерного распределения методами микроскопии и рассеяния.

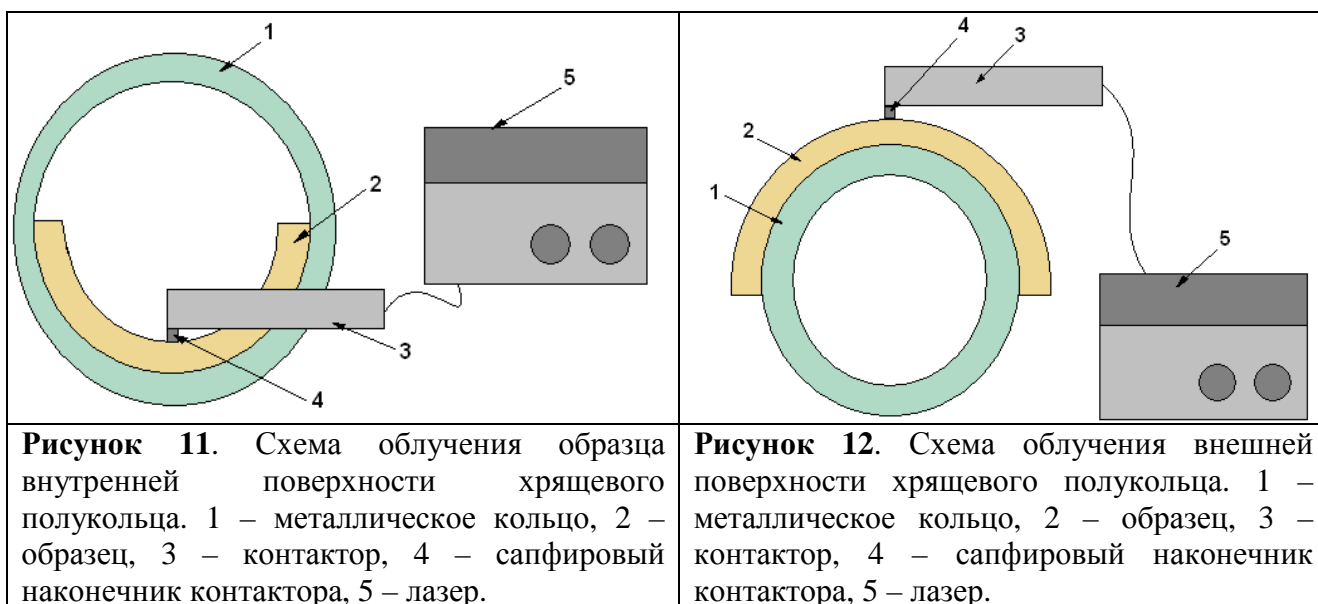
6. Влияние наночастиц магнетита на клетки и компоненты матрикса хрящевой ткани изучено недостаточно. Таким образом, одну из задач настоящей работы можно обозначить, как определение воздействия наночастиц магнетита на хондроциты, коллаген и протеогликаны хрящевой ткани.

ГЛАВА 2. Лазерное изменение формы реберного хряща

2.1. Экспериментальные методы

2.1.1. Лазерное облучение

Использовали свиной реберный хрящ, взятый от 4 – 7 ребра. Хрящ хранили при температуре - 4°C. Перед экспериментом хрящ размораживали помещением в физиологический раствор (0,9%-ный р-р NaCl) комнатной температуры. Хирургическим скальпелем отделяли верхний волокнистый слой надхрящницы и из хряща вырезали прямые пластины длиной $5,5 \pm 1,5$ см, шириной $1,0 \pm 0,5$ мм и толщиной $3,0 \pm 0,5$ мм. Пластины с помощью зажимов закрепляли на металлических кольцах (Рис.11-12) и проводили облучение растянутой и сжатой поверхности хряща, воздействуя инфракрасным лазерным излучением с длиной волны 1,56 мкм через сапфировый наконечник контактора эрбиевого волоконного лазера (Arcuo Medical, Inc., Los Altos, CA) в импульсно-периодическом режиме с продолжительностью импульса 500 мс, частотой повторения 1,4 Гц. Диаметры колец-держателей подбирались таким образом, чтобы кривизна средней линии хрящевого полукольца при облучении внутренней и внешней поверхности оставалась постоянной. Использовали 4 пары колец для облучения внутренней и внешней поверхности диаметром 13 и 10; 11,5 и 8,5; 10 и 7; 8,5 и 5,5 мм, соответственно, для разных серий образцов. Контроль температуры поверхности осуществлялся с помощью термопары, встроенной в наконечник лазерного контактора и расположенной на его периферии.



Диаметр лазерного пятна составлял 2,5 мм. Облучение проводили по схеме, приведенной на Рис.13. На поверхности хряща делали 3 ряда точек облучения.

Расстояние между рядами составляло 2 мм, между точками облучения 1 мм. Облучение начинали с середины хрящевое полукольца, заканчивали на торцах.

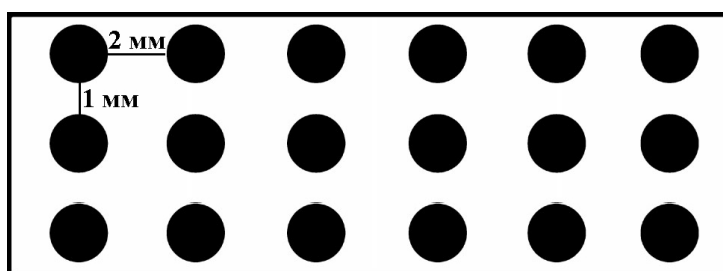


Рисунок 13. Схема облучения поверхности хрящевое полукольца. Темные пятна соответствуют точкам облучения.

Параметры лазерного воздействия подбирались, исходя из известного в литературе диапазона режимов для изменения формы хряща носовой перегородки [2]. Для предотвращения перегрева поверхности контактором действовали с небольшим давлением на поверхность для оттока жидкости вглубь ткани. После каждой точки облучения контактор быстро охлаждали до температуры 21°C, а поверхность облучаемого хряща смачивали физиологическим раствором во избежание потери жидкости. Облучение проводили в двух различных последовательностях: (1) сначала сжатой, затем растянутой поверхности хряща; (2) сначала растянутой, затем сжатой поверхности хряща. Поскольку толщина и структура реберного хряща отличается от хряща носовой перегородки, проводилось варьирование мощности и времени лазерного воздействия для определения оптимальных режимов. Для определения порогов мощности проводили серию из 5 экспериментов, в которых мощность варьировали от 1,5 до 2,2 Вт с шагом 0,1 - 0,2 Вт (Табл.2), сопровождая их последующей фиксацией достижения стабильной кривизны за 24 ч после воздействия.

Таблица 2. Значения мощности лазерного воздействия

Режим облучения
Импульсный, 500/700, 20 с, 1,5 Вт
Импульсный, 500/700, 20 с, 1,7 Вт
Импульсный, 500/700, 20 с, 1,8 Вт
Импульсный, 500/700, 15 с, 2,0 Вт
Импульсный, 500/700, 10 с, 2,2 Вт

Пороги времени лазерного воздействия определяли в серии из 5 экспериментов, уменьшая время воздействия на 3-5 с для установленных пороговых значений мощности (Табл.3).

Таблица 3. Время лазерного воздействия для заданных значений мощности.

Мощность облучения, Вт	Время облучения, с
1,8	20
	15
2,0	12
	10
2,2	6

Для каждого режима проводили 3 эксперимента. Для режимов, при которых наблюдался выраженный эффект изменения формы, проводили 6 экспериментов. Для определения влияния последовательности облучения проводили 6 экспериментов для каждого режима воздействия.

После облучения хрящевой образец помещали в физиологический раствор и фиксировали изменение его кривизны до достижения ее стабильного значения с помощью установки с камерой Canon. Измерения проводили каждую минуту первые 10 мин, затем каждые 10 мин в течение первого часа. Конечную кривизну измеряли через 24 ч после воздействия.

2.1.3. ДСК

С внешней и внутренней стороны хрящевой пластины, облученной в режиме 2,2 Вт 6 с, срезали слой хряща, содержащий облученную область, диаметром 2,0 мм и толщиной 0,5 мм. Таким же образом вырезали интактный образец из необлученного хряща. Для ДСК-анализа готовили 3 серии образцов: (1) интактный, (2) срез сжатой поверхности облучения, (3) срез растянутой поверхности облучения. Третью часть образцов всех серий помещали в раствор α -химотрипсина (Sigma), приготовленный из расчета 1 мг на 20 мг хрящевой ткани с добавлением пенициллина (5000 ед. на 1 л раствора) и выдерживали в течение 24 ч при 30°C. Затем образцы промывали физиологическим раствором. Перед помещением в ячейку ДСК образцы взвешивали при комнатной температуре. Затем образцы помещали в герметичные тигли и записывали для них кривые ДСК на термоанализаторе TA4000 (Mettler приставка DSC 20) при скорости нагрева 10°C/мин в интервале температур 25 - 100°C.

После окончания анализа вскрывали тигли и сушили образцы в сушильном шкафу при температуре 50°C до постоянной массы. Затем образцы вновь взвешивали и рассчитывали величину теплового эффекта на единицу сухой массы образца.

2.2. Оптимальные режимы воздействия

Основным компонентом, вносящим вклад в поглощение ИК-излучения с $\lambda = 1,56$ мкм, является вода. Эффективный коэффициент поглощения реберного хряща для данной длины волны $\mu_{eff} \approx 14 \text{ см}^{-1}$ [47]. Толщину лазерного прогрева можно оценить как

$$l = \frac{1}{\mu_{eff}} + \sqrt{a \cdot t}, \text{ где } a - \text{коэффициент температуропроводности, } t - \text{время воздействия.}$$

Для хрящевой ткани температуропроводность определяется водой, поэтому $a = 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2/\text{с}$. Толщина прогрева за время порядка нескольких секунд составляет $\sim 1,5$ мм. Поскольку толщина используемых образцов хряща составляет 3 мм, характер распространения тепла позволяет прогреть до нужной температуры половину толщины образца за время порядка нескольких секунд при одностороннем облучении. Двустороннее облучение на данной длине волны позволяет прогреть образец на всю толщину. Значения мощности лазерного воздействия, при которых был достигнут стабильный результат изменения формы, представлены в Табл.4 [117].

Таблица 4. Пороги мощности лазерного воздействия

Режим облучения	Эффект стабильного изменения формы
Импульсный, 500/700, 20 сек, 1,5 Вт	нет
Импульсный, 500/700, 20 сек, 1,7 Вт	да, слабый
Импульсный, 500/700, 20 сек, 1,8 Вт	да
Импульсный, 500/700, 15 сек, 2,0 Вт	да
Импульсный, 500/700, 10 сек, 2,2 Вт	да

При значениях мощности выше 1,7 Вт наблюдался выраженный эффект сохранения новой формы в течение как минимум 24 ч. При более высоких значениях мощности визуально наблюдались термические повреждения ткани, выразившиеся в потемнении облученных областей. Однако использование минимальной пороговой мощности требует больших времен воздействия. Результаты определения временных порогов представлены в Табл.5. Как видно из таблицы, радиус стабильной кривизны наименьший для режима 2,2 Вт 6 с. При этом визуально наблюдались минимальные изменения в области лазерного пятна.

Таблица 5. Пороги времени лазерного воздействия

Мощность, Вт	Время, с	Средний радиус кривизны, мм
1,8	20	52
	15	55
2,0	12	47
	10	79
2,2	6	39

Для данного режима воздействия исследовали влияние радиуса кривизны хрящевого полукольца в процессе лазерного воздействия на стабильную кривизну новой формы. Результаты представлены в Табл.6.

Таблица 6. Влияние кривизны образца в процессе облучения на стабильную кривизну новой формы (значения радиуса кривизны приведены для внутренней линии хрящевого полукольца).

Радиус кривизны во время облучения, мм	Радиус кривизны через 20 мин после облучения, мм
10	40
8,5	37
7	32
5,5	22

При более выраженном изгибании хряща в процессе воздействия наблюдается уменьшение кривизны стабильной новой формы хряща. Таким образом, контролируя кривизну в процессе нагрева, можно изготавливать полукольца реберного хряща заданной кривизны.

2.3. Стабильность новой формы

При помещении хрящевого полукольца в физиологический раствор после лазерного воздействия в течение некоторого времени наблюдается «распрямление» хряща до достижения стабильного значения кривизны. Этот процесс в основном связан с восстановлением в хряще количества жидкости, испарившейся за время эксперимента. Равновесие устанавливается за время порядка нескольких минут. На Рис.14 приведена динамика «распрямления» хрящевого полукольца при воздействии лазерного режима 2,2 Вт 6 с. Из показаний термопары следует, что максимальная температура поверхности при этом не превышала 32°C. Можно видеть, что по истечении 20 мин радиус кривизны более существенно не возрастает.

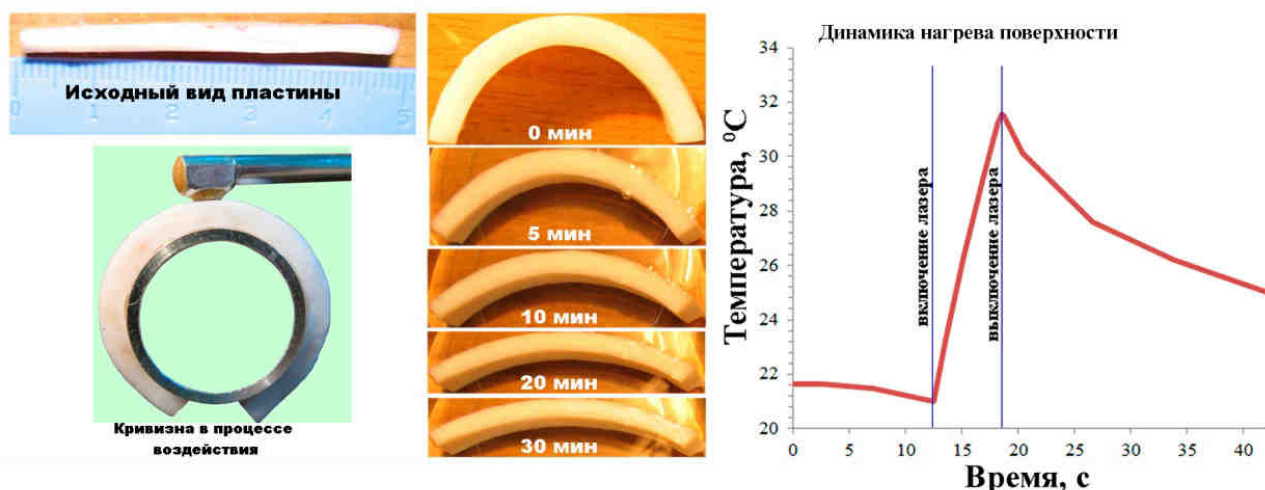


Рисунок 14. Динамика приобретения стабильной кривизны хрящевой пластиной в физиологическом р-ре за указанное время после лазерного воздействия. Справа представлен график роста температуры поверхности хряща при лазерном нагреве в режиме 2,2 Вт 6 сек, полученный с помощью термопары на периферии лазерного контактора. Максимальная температура нагрева поверхности не превышала 32°C.

Контрольное измерение, проведенное через 24 ч после лазерного воздействия, не выявило изменения стабильного радиуса кривизны. При хранении хрящевых образцов при температуре - 4°C в течение нескольких месяцев (измерения проводились до полугода) стабильная новая форма хряща сохраняется. Таким образом, эффект лазерного изменения формы является стабильным.

2.4. Влияние последовательности двустороннего облучения на кривизну новой формы

По результатам измерений стабильной кривизны для разных серий образцов было выявлено статистическое различие для всех используемых режимов при двустороннем облучении хрящевых полуколец в разной последовательности (Табл.7).

Таблица 7. Стабильная кривизна хрящевых полуколец в зависимости от последовательности воздействия: I воздействие сначала на сжатую, затем на растянутую поверхность хряща, II – обратная последовательность воздействия.

Режим	Последовательность	Радиус кривизны, мм
1,8 Вт 15 с	I	50±3
	II	59±3
2,0 Вт 12 с	I	44±3
	II	49±2
2,2 Вт 6 с	I	37±1
	II	40±2

Так, в случае воздействия сначала на внутреннюю сжатую поверхность хряща, а затем на внешнюю растянутую конечная стабильная кривизна оказывалась более выраженной, чем для обратной последовательности воздействия. Таким образом, обнаружен эффект нелинейного термомеханического поведения хрящевой ткани. Возможный механизм данного эффекта может быть связан с различной концентрацией отрицательных зарядов, перераспределение которых происходит при лазерном снятии механических напряжений, в сжатой и растянутой области хрящевого полукольца. Физико-химические аспекты данного механизма нуждаются в дальнейшем изучении. Таким образом, при двустороннем облучении хряща в форме полукольца наиболее эффективной для достижения меньшей кривизны оказывается последовательность облучения, соответствующая воздействию сначала на сжатую, затем на растянутую поверхность полукольца.

2.5. Степень денатурации коллагена в облученном хряще

Для определения степени денатурации коллагена использовали метод ДСК. Анализировали хрящи, облученные с двух сторон в режиме 2,2 Вт 6 с, так как данный режим демонстрирует наиболее выраженный эффект стабильной кривизны новой формы. Контрольный образец сравнивали с облученными образцами, подвергнутыми как сжатию, так и растяжению. Соответствующие термограммы приведены на Рис.15. Значения соответствующих тепловых эффектов приведены в Табл.8. Наблюдаемые эффекты лежат в диапазоне 60 - 80 °С. Их величина как для интактного, так и для облученных образцов существенно ниже величины эффекта денатурации коллагена в 65 ± 5 Дж/г [75].

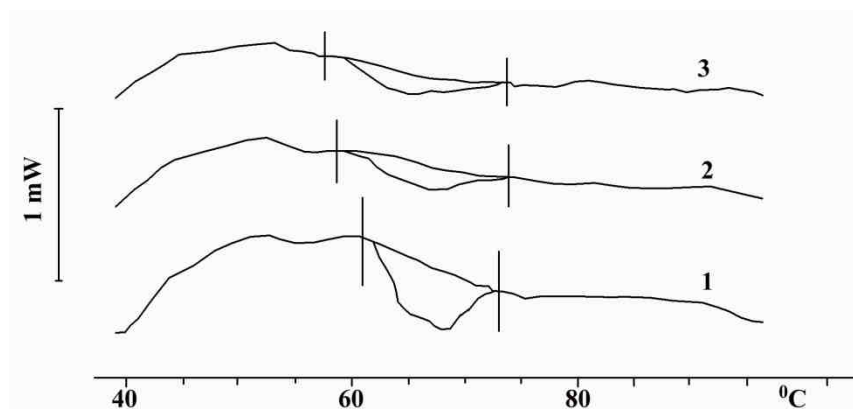


Рисунок 15. Кривые ДСК образцов хряща: 1 – сжатая поверхность полукольца, 2 – интактный контроль, 3 – растянутая поверхность полукольца.

Следовательно, в анализируемом диапазоне температур денатурации коллагена не происходит. Возможно, наблюдаемый небольшой эффект связан с тепловыми превращениями менее стабильных минорных коллагенов хряща, локальным плавлением протеогликанов, либо с процессом перехода связанной воды в свободное состояние [1].

Таблица 8. Результаты ДСК анализа хрящевых образцов.

Образец	Температура перехода, °С	Тепловой эффект, Дж/г
Интактный	66	3±1
Облученный (сжатая поверхность)	67	3±1
Облученный (растянутая поверхность)	65	3±1

Значения тепловых эффектов для облученного хряща и контроля оказываются в пределах погрешности определения. Для облученного хряща наличие эффекта, идентичного контрольному образцу, свидетельствует об отсутствии заметных термических повреждений его коллагеновой структуры в процессе лазерного воздействия.

Обработка хряща α -химотрипсином приводит к ферментативному расщеплению протеогликанов, стабилизирующих коллагеновый каркас хряща в процессе нагрева. Таким образом, тепловые превращения коллагена становятся более вероятными, а разница между контролем и облученным образцом более выраженной. Потеря сухой массы хряща после обработки составляет около 40%. Термограммы образцов, обработанных α -химотрипсином, приведены на Рис.16. Соответствующие температуры и тепловые эффекты приведены в Табл.9.

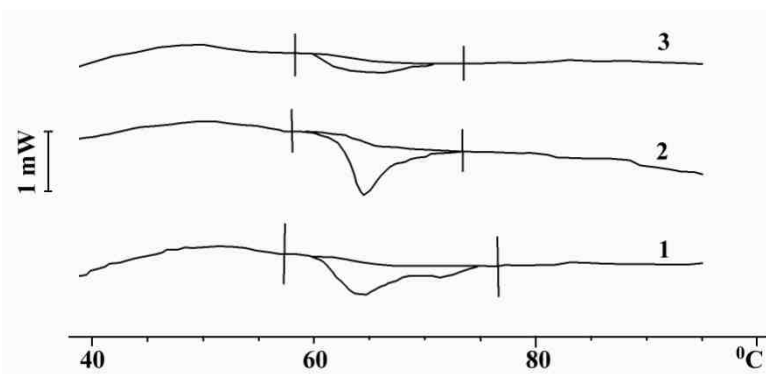


Рисунок 16. Кривые ДСК образцов хряща, обработанных α -химотрипсином: 1 – сжатая поверхность полукольца, 2 – интактный контроль, 3 – растянутая поверхность полукольца.

Таблица 9. Результаты ДСК анализа хрящевых образцов после обработки α -химотрипсином.

Образец	Температура перехода, °С	Тепловой эффект, Дж/г
Интактный	62	7±3
Облученный (сжатая поверхность)	63	7±3
Облученный (растянутая поверхность)	62	4±2

Значения тепловых эффектов увеличились незначительно и составляют много меньше величины эффекта денатурации коллагена. Небольшое снижение температур переходов по сравнению с необработанными ферментом образцами связано со снижением термической стабильности хрящевого матрикса. Тепловые эффекты для контроля и облученного хряща, взятого со сжатой поверхности полукольца, не различаются. Наблюдается небольшое снижение значения теплового эффекта для облученного хряща, взятого с растянутой поверхности хряща. Это может свидетельствовать о наличии в данной области незначительных термических повреждений при лазерном воздействии, которых не наблюдается при воздействии на сжатую поверхность.

В результате проведенного ДСК анализа заметной денатурации коллагена в хряще, облученном в режиме 2,2 Вт 6 с, не выявлено. Следовательно, данный режим может быть использован для неразрушающей лазерной модификации реберного хряща.

2.6. Выводы по результатам Главы 2

1. Определены параметры лазерного воздействия на реберный хрящ, приводящие к стабильному изменению его формы.
2. Степень деформации хряща в процессе лазерного воздействия влияет на конечную стабильную кривизну новой формы.
3. Обнаружен эффект нелинейного термомеханического поведения реберного хряща в процессе изменения его формы: облучение сперва сжатой, затем растянутой поверхности хрящевого полукольца приводит к более выраженному эффекту новой формы, чем обратная последовательность облучения.

4. Показано, что в процессе лазерного изменения формы не происходит заметной денатурации коллагена в хряще.

ГЛАВА 3. Импрегнация наночастиц магнетита в хрящевую ткань

3.1. Экспериментальные методы

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. 0; 0,1; 0,5 или 1,0 г крахмала растворяли при нагревании в 50 мл дистиллированной воды, затем р-р крахмала смешивали с 50 мл водного р-ра, содержащего 0,02 М хлорида железа II и 0,04 М хлорида железа III. Через смесь в течение 10 – 15 мин пропускали аргон. Затем при перемешивании к смеси по каплям добавляли 13,5%-ный р-р аммиака до появления устойчивой черной окраски. Конечный рН составлял 12. По окончании добавления аммиака смесь перемешивали в течение 15 мин и оставляли на 1 ч в инертной атмосфере. Затем осадок магнетита промывали дистиллированной водой и высушивали в инертной атмосфере при комнатной температуре. Для исследования свойств и импрегнации в хрящевую ткань готовили дисперсии наночастиц в дистиллированной воде различных концентраций: 10 мкг/мл, 2 мг/мл, 5 мг/мл.

3.1.2. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и электронная дифракция

Исследование структуры наночастиц магнетита проводили на электронном микроскопе JEOL JEM-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)

Готовили водную дисперсию наночастиц магнетита концентрацией 2 мг/мл, которую перед анализом разбавляли в 10, 50 и 100 раз. Анализ проводили на фотометре лазерного светорассеяния Zetasizer Nano ZS (Malvern, Great Britain), снабженном He-Ne лазером ($\lambda = 633$ нм, мощность 4 мВт). Суспензию наночастиц помещали в стеклянную кювету цилиндрической формы с плотно закрывающейся крышкой и предварительно прогревали в течение 5 минут при заданной температуре. Измерения проводили под фиксированном углом рассеяния 90° . Рассеянный свет принимался кросскорреляционной системой счёта фотонов, позволяющей измерять размеры частиц

от 0.5 нм до 5 мкм. Накопление корреляционной функции интенсивности рассеянного света производилось автоматически каждые 60 секунд при измерении при постоянной температуре. Корреляционные функции анализировали с помощью программы DynaLS (Alango, Израиль), позволяющей рассчитать значения гидродинамических радиусов (R_h) частиц, присутствующих в растворе, и индексов полидисперсности (PIs).

3.1.4. Аналитическое ультрацентрифугирование (АУЦ)

Данному анализу подвергали фракцию наночастиц размером менее 10 нм. Крупные частицы предварительно отделяли центрифугированием их дисперсии (2 мг/мл) в течение 15 мин при 5 000 об/мин. Седиментационные эксперименты проводились при 20°C с помощью аналитической ультрацентрифуги Spinco (Beckman), модель E, оборудованной абсорбционной оптикой, фотоэлектронным счетчиком, монохроматором и компьютерной системой. Использовали ротор An-F Ti с четырьмя отсеками и 12 миллиметровые двухсекторные ячейки. Скорость ротора составляла 24 000 об/мин. Седиментационные профили были получены измерением поглощения при 307 нм. Сканирование всех ячеек производили одновременно. Временной интервал между сканированиями составлял 2,5 мин. Коэффициенты седиментации рассчитывали из распределения дифференциальных седиментационных коэффициентов [$c(s)$ от s] при помощи программы SEDFIT. Средние седиментационные коэффициенты образцов определялись интегрированием распределений $c(s)$.

3.1.5. Импрегнация наночастиц в хрящ

Пластины суставного и реберного хряща толщиной 1,5 – 2,0 мм и диаметром 3,0 мм фиксировали на дне цилиндрических кювет, которые заполняли водной дисперсией наночастиц магнетита, стабилизированной 0,5% масс. крахмала, концентрации 2 мг/мл. Импрегнация наночастиц осуществлялась диффузией из водной дисперсии в течение 75 ч. Исследовали три типа образцов: (1) интактный; (2) модифицированный эрбиевым волоконным лазером ($\lambda=1,56$ мкм, LSC, Arcuo Medical Inc.) через волокно диаметром 600 мкм в режиме, при котором наблюдалось образование субмикропор в хряще [118]: мощность лазера 0,7 Вт, время воздействия 5 с при длительности импульса 500 мс, частоте повторения 1,4 Гц; (3) модифицированный лазером с приложением постоянного магнитного поля в 2000 Гаусс в процессе импрегнации наночастиц. Всего проводили 6 экспериментов для каждого типа образцов серии (1), (2) и (3) (3 для суставного и 3 для

реберного хряща). Через 20 мин хрящи извлекали из кювет и промывали в физиологическом р-ре в течение 5 мин.

3.1.6. Оптическая фотометрия

После импрегнации наночастиц образцы серии (1) – (3) из п.3.1.5 разрезали поперек, так чтобы для облученных образцов поверхность среза соответствовала центру пятна облучения и демонстрировала сечение профиля импрегнации. Толщина полученных срезов составляла 0,5 мм. Срезы помещали в ячейку для оптических исследований (Рис.17). Образцы, помещенные в прозрачный слайд, освещали белым светом, сгенерированным 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 измерялась в графическом редакторе.

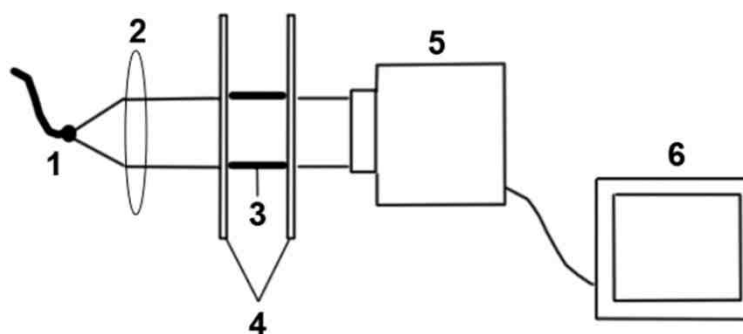


Рисунок 17. Экспериментальная схема определения оптической плотности хрящевых образцов. 1 – диодный источник света, 2 – линза, 3 – образец хряща, 4 – прозрачный слайд, 5 – камера, 6 – система обработки.

Коэффициенты диффузии наночастиц в хрящевую ткань рассчитывались на основе решения уравнения диффузии для полуограниченного тела [116].

3.2. Характеризация наночастиц магнетита

Анализ ПЭМ позволил оценить форму и размеры наночастиц, а также подтвердить их кристаллическое строение. На Рис.18 представлены электронные фотографии частиц магнетита, полученные для нестабилизированных (Рис.18а) и стабилизированных крахмалом наночастиц (Рис.18б). Справа от ПЭМ изображений приведены соответствующие электронные дифрактограммы и размерные распределения наночастиц.

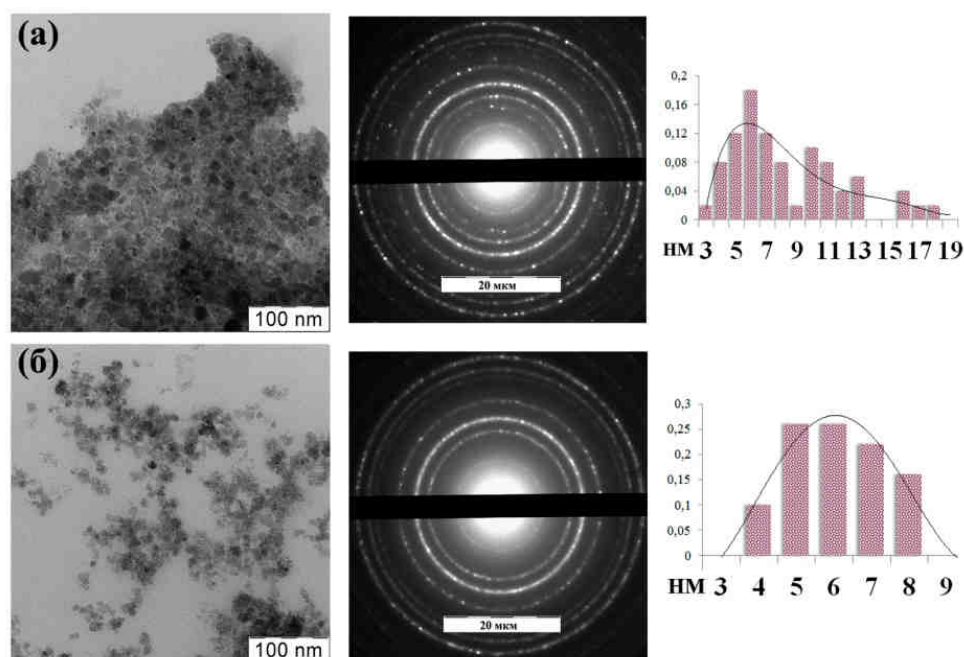


Рисунок 18. ПЭМ изображения (а) нестабилизированных и (б) стабилизированных крахмалом (0,5%) наночастиц Fe_3O_4 . Справа приведены электронные дифрактограммы соответствующих образцов и диаграммы распределения по диаметру.

Нестабиллизированные наночастицы имеют размер 6 – 20 нм с максимумом около 7 нм, однако образуют устойчивые агломераты размером более 100 нм. Степень агломерации стабилизированных наночастиц заметно меньше. Частицы имеют размер 3-10 нм. Максимум их распределения составляет 6 нм. Наблюдаемые агломераты частиц имеют размер до 100 нм. Межплоскостные расстояния, рассчитанные из электронных дифрактограмм, приведены в Табл.10.

Таблица 10. Данные электронной дифракции для нестабилизированных и стабилизированных крахмалом наночастиц Fe_3O_4 .

d, Å (нестаб. Fe_3O_4)	d, Å (стаб. крахмалом Fe_3O_4)	h	k	l
4,8330	4,7549	1	1	1
3,3807 (маггемит)		1	1	6
2,9454	2,8998	2	2	0
2,5108	2,4805	3	1	1
2,0755	2,0425	4	0	0
1,6987	1,6711	4	2	2
1,5960	1,5716	5	1	1
1,4664	1,4418	4	4	0

На электронной дифрактограмме нестабилизированных наночастиц присутствуют рефлексы маггемита Fe_2O_3 (рефлекс $d=3,3807$), в то время как для стабилизированных наночастиц наблюдаются только рефлексы магнетита. Таким образом, введение крахмала в процессе синтеза замедляет окисление магнетита.

ДЛС анализ водных дисперсий наночастиц Fe_3O_4 проводили для изучения их размерного распределения с учетом агломерации и возможных взаимодействий с молекулами крахмала [119]. На Рис.19 представлено распределение нестабилизированных частиц. Из полученного распределения видно, что их водная дисперсия представляет собой полидисперсную систему, значения гидродинамических радиусов частиц в которой лежат в диапазоне 150 - 850 нм со средним значением $\langle R_h \rangle = 330 \pm 10$ нм.

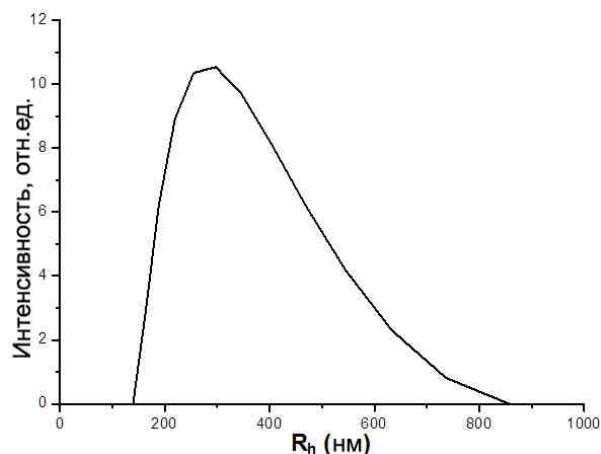


Рисунок 19. Распределение частиц Fe_3O_4 в нестабилизированной водной дисперсии.

Данные ДЛС дисперсий частиц Fe_3O_4 , стабилизированных крахмалом, приведены на Рис.20. Средние значения гидродинамических радиусов частиц в дисперсиях, содержащих 0,1, 0,5 и 1,0 % масс. крахмала, составили 85 ± 1 нм, 48 ± 1 нм и 33 ± 1 нм, соответственно.

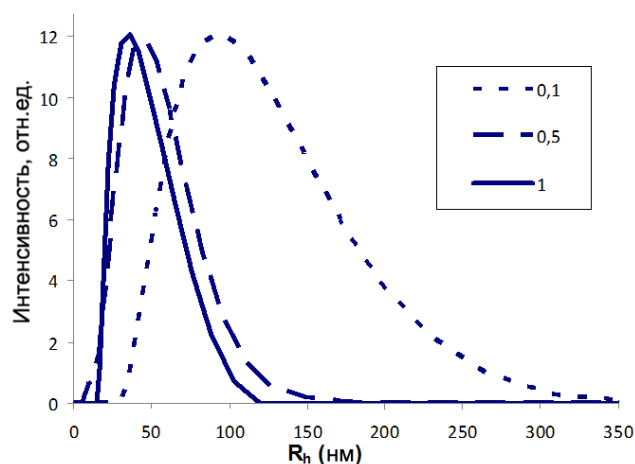


Рисунок 20. Распределение по гидродинамическому радиусу для водных дисперсий наночастиц магнетита при различных концентрациях крахмала. $T = 25^\circ\text{C}$.

Как следует из приведенных данных, стабилизация дисперсии крахмалом приводит к увеличению в общем распределении доли более мелких частиц размером до 100 нм, в то же время она не приводит к снижению полидисперсности системы, так как

«хвост» распределения тянется до значений радиусов частиц 1000 нм. Увеличение концентрации крахмала, добавленного предварительно в систему, приводит к уменьшению их среднего гидродинамического радиуса в конечной дисперсии и значительному сужению распределения.

Следует отметить, что метод ДЛС очень чувствителен к частицам большого размера, однако, для тех случаев, когда в смеси присутствуют как очень большие, так и частицы относительно небольшого размера, то у этого метода плохое разрешение по отношению к малым частицам [116]. Распределение будет сдвинуто в сторону больших частиц, хотя их доля по массе может быть меньше 0.1 % или даже 0.01 % [116]. Поэтому для характеристики относительно небольших наночастиц использовали метод АУЦ, который обладает большей разрешающей способностью, чем метод ДЛС. Предварительно водную смесь частиц центрифугировали, что позволило удалить наиболее тяжелую фракцию наночастиц. Далее с помощью метода скоростной седиментации было охарактеризовано распределение по размерам фракции малых наночастиц. На Рис.21 представлены дифференциальные распределения по коэффициентам седиментации $c(s)$ частиц Fe_3O_4 в крахмальной дисперсии. Значения средних коэффициентов седиментации в дисперсиях, содержащих 0.1; 0.5 и 1 % масс. крахмала равны соответственно 15, 12.4 и 10.0 S , а средние радиусы Стокса оценены равными, соответственно, 4.9, 4.8 и 3.7 нм. Хотя средние значения радиусов близки, однако видно, что при увеличении концентрации крахмала, добавленного предварительно в систему, распределение $c(s)$ становится более узким.

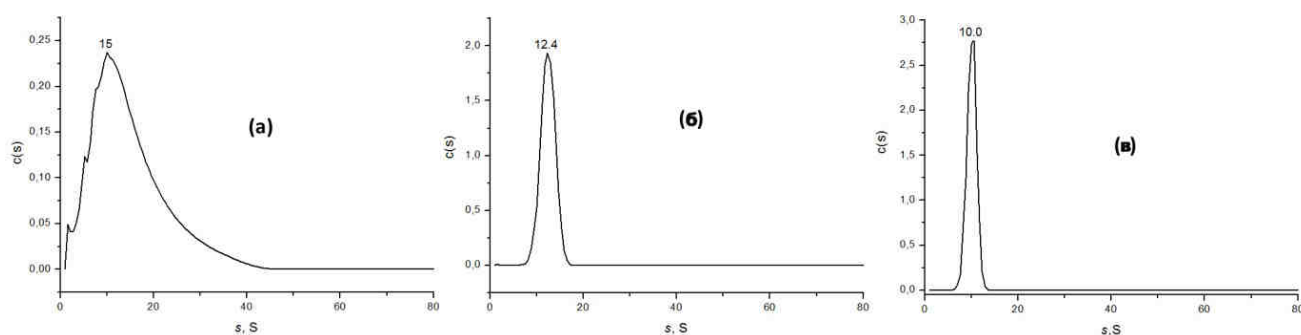


Рисунок 21. Дифференциальные распределения коэффициентов седиментации для водных дисперсий наночастиц магнетита, синтезированных в присутствии (а) 0,1, (б) 0,5 и (в) 1,0 % крахмала (20⁰С, скорость ротора 24 000 об/мин).

Стабильность крахмальных дисперсий наночастиц исследовалась методом ДЛС в диапазоне температур 20 - 70⁰С (Рис.22). Выбор данного температурного диапазона обусловлен средней температурой нагрева в условиях неразрушающего лазерного

воздействия [1,10]. Как видно из приведенных данных, средний гидродинамический радиус частиц в данных условиях изменяется незначительно.

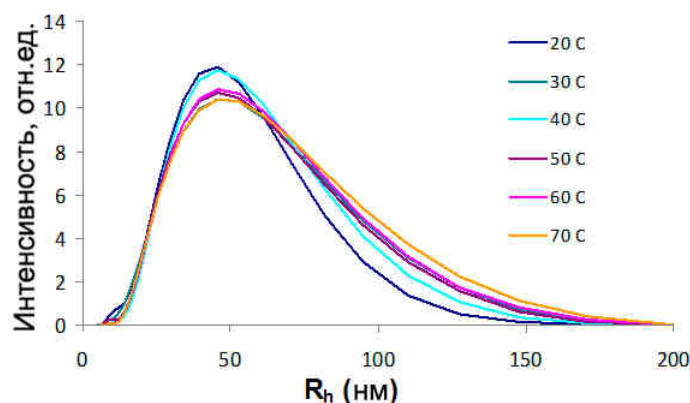


Рисунок 22. Динамика изменения размера частиц Fe_3O_4 в дисперсии, содержащей 0,5 % масс. крахмала, с ростом температуры.

Стабильность дисперсий при хранении была также исследована методом ДЛС (Рис.23). По прошествии 7 дней с момента синтеза и хранения дисперсии частиц без доступа воздуха при комнатной температуре средний гидродинамический радиус частиц изменился незначительно и составил 52 ± 1 нм по сравнению с 48 ± 1 нм для свежесинтезированных частиц.

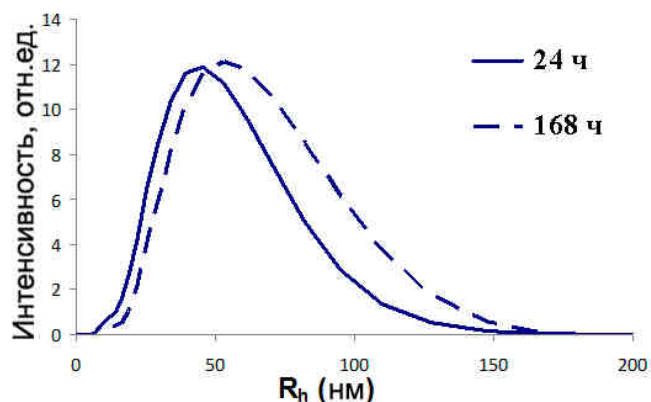


Рисунок 23. Динамика изменения размера частиц Fe_3O_4 в дисперсии, содержащей 0,5 % масс. крахмала, при хранении в течение указанного времени после синтеза.

3.3. Кинетика импрегнации наночастиц Fe_3O_4 в хрящевую ткань

Кинетику импрегнации исследовали, измеряя оптическую плотность срезов хряща вдоль профиля импрегнации наночастиц. Импрегнация наночастиц в хрящевую ткань отвечает решению уравнения диффузии для полуограниченного тела, которое может быть представлено следующим образом [120]:

$$\frac{C}{C_0} = \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right) \quad (1)$$

где C_0 и C граничная и текущая концентрации НЧ соответственно, x – координата прямой, соответствующей профилю импрегнации, D – коэффициент диффузии, t – время импрегнации. Данное решение можно представить в логарифмическом виде:

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = Kx^2 \quad (2)$$

где $K = -\frac{1}{4Dt}$ представляет собой коэффициент пропорциональности между логарифмическим отношением концентраций и квадратом координаты. Общую интенсивность света, поглощенную как наночастицами, так и материалом хряща можно записать так:

$$I_{\text{общ}} = I_0 - I = I_{\text{НЧ}} + I_{\text{ХР}} \quad (3)$$

где I_0 и I интенсивности падающего и прошедшего света, $I_{\text{НЧ}}$ и $I_{\text{ХР}}$ интенсивности, поглощенные наночастицами и хрящом. $I_{\text{НЧ}}$ может быть рассчитана из закона Бугера-Ламберта-Бера:

$$I_0 - I_{\text{НЧ}} = I_0 \exp(-c\chi l) \quad (4)$$

где c – концентрация поглощающих наночастиц, χ – молярный коэффициент экстинкции, l – толщина хрящевой пластины. Поскольку в данном эксперименте исследовались малые толщины хрящевых пластин l , чтобы можно было снизить влияние рассеяния, то $c\chi l \ll 1$, тогда выражение (4) может быть представлено в следующем виде:

$$I_0 - I_{\text{НЧ}} = I_0(1 - c\chi l) \quad (5)$$

$$I_{\text{НЧ}} = I_0 c\chi l \quad (6)$$

Подставляя (6) в выражение (3) получим:

$$I_0 - I = I_0 c\chi l + I_{\text{ХР}} \quad (7)$$

И после нормирования на I_0 :

$$\frac{I_0 - I}{I_0} - \frac{I_{\text{ХР}}}{I_0} = c\chi l \quad (8)$$

Таким образом, концентрация в каждой точке профиля импрегнации зависит от разности между общей интенсивностью поглощенного света и интенсивностью, поглощенной материалом хряща, нормированными на I_0 . Измеряя интенсивность

прошедшего света в каждой точке профиля импрегнации, а также для хряща, не содержащего поглощающих наночастицы, можно рассчитать отношение концентраций ($\frac{C}{C_0}$), связанное с координатой и коэффициентом диффузии выражением (2). В Табл.11 представлены полученные K и соответствующие им значения коэффициентов диффузии D .

Таблица 11. Значения K и D для трех различных типов импрегнации.

Образец	Коэффициент K , см ⁻⁴	Коэффициент диффузии D , см ² /с
Интактный	3,00±0,07	(3±1) 10 ⁻⁹
Облученный	3,84±0,08	(1,5±0,5)·10 ⁻⁸
Облученный, импрегнация проведена с приложением магнитного поля	5,09±0,11	(1,60±0,65)·10 ⁻⁷

Можно видеть, что предварительное лазерное облучение хряща позволяет увеличить скорость диффузии на порядок величины. Этот результат может быть объяснен, исходя из полученных ранее данных о том, что механизм неразрушающего лазерного воздействия на ткань подразумевает образование дополнительных пор и каналов хрящевой структуры [1], что ускоряет диффузию наночастиц. Приложение магнитного поля в процессе импрегнации, в свою очередь, также увеличивает скорость диффузии наночастиц на порядок величины. Следовательно, магнитное поле может быть использовано для управления процессом импрегнации наночастиц.

3.4. Выводы по результатам Главы 3

1. Получены водные полидисперсные системы наночастиц магнетита, стабилизированные крахмалом, со средним размером частиц 85±1 нм, 48±1 нм и 33±1 нм.
2. Синтез наночастиц в присутствии крахмала позволяет заметно уменьшить степень их агломерации и предотвратить окисление.
3. Средний размер и распределение наночастиц в дисперсии зависят от концентрации стабилизатора: повышение его концентрации в пределах 0,01 – 1 % масс. приводит к сужению распределения и сдвигу среднего размера частиц в меньшую сторону.

4. Дисперсии являются стабильными при хранении в течение как минимум в течение нескольких дней и при повышении температуры до 70°C.

5. Исследована кинетика импрегнации наночастиц магнетита в хрящевую ткань: коэффициент диффузии наночастиц в интактный хрящ составляет $(3 \pm 1) 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$.

6. Показано, что неразрушающее лазерное воздействие увеличивает скорость диффузии на порядок величины.

7. Приложение магнитного поля в процессе импрегнации наночастиц в облученный хрящ увеличивает скорость диффузии на 2 порядка величины. Таким образом, можно управлять процессом импрегнации с помощью магнитного поля.

ГЛАВА 4. Структура хряща при лазерной модификации и импрегнации наночастицами магнетита

4.1. Экспериментальные методы

4.1.1. Отбор и приготовление образцов хряща сустава и ребер

Для приготовления образцов суставного хряща брали правый и левый бедренный сустав свиньи. Суставную сумку вскрывали с помощью скальпеля и срезали верхний слой суставного хряща толщиной 1,5 мм. Пластины облучали в заданных точка через оптоволокно (см. п. 4.1.2), так чтобы расстояние между точками облучения составляло не менее 2,0 мм. Из облученной пластины с помощью цилиндрического резца вырезали образцы в виде цилиндров диаметром основания 2,0 мм и толщиной 1,5 мм, таким образом, что на одном из оснований оказывалась блестящая пластинка, а другое представляло собой ровный срез хряща, не покрытого блестящей пластинкой с точной облучения в центре. Дальнейшее воздействие (лазерное облучение, импрегнация наночастиц) проводилось на поверхность среза, не покрытого блестящей пластинкой.

Для приготовления образцов реберного хряща брали реберный хрящ свиньи от 5-го ребра. С помощью скальпеля нарезали пластины толщиной 2,0 мм. Пластины со стороны среза облучали лазером в заданных точках (см. п. 4.1.2), так что расстояние между точками составляло не менее 2,0 мм. Затем с помощью цилиндрического резца нарезали образцы в виде цилиндров диаметром основания 2,0 мм и толщиной 2,0 мм таким образом, что одно из оснований было покрыто надхрящницей, а другое представляло собой ровный срез хряща с точкой облучения в центре. Дальнейшее воздействие (лазерное облучение, импрегнация наночастиц) проводилось на поверхность среза, не покрытого надхрящницей.

Общее число образцов составило 48 и 36 для суставного и реберного хряща, соответственно.

4.1.2. Лазерная модификация суставного и реберного хряща

Лазерное облучение проводили эрбиевым волоконным лазером с длиной волны 1,56 мкм («ИРЭ –Полюс», модель ЛС-1.56, Россия) воздействуя на поверхность хрящевого образца через оптоволокно диаметром 600 мкм так, что волокно прилегало к поверхности хряща без давления на нее. Длительность импульса воздействия составляла 500 мс при частоте повторения 1,4 Гц. Лазерные параметры были выбраны в соответствии с имеющимися в литературе режимами для регенерации [118] и изменения

формы хряща [1], при которых наблюдалось образование субмикропор в матриксе хряща: мощность воздействия составляла 0,7 Вт, время экспозиции 5 с. Контроль температуры в процессе воздействия осуществляли с помощью ИК-радиометрии тепловизором Testo, установленном установленном под углом 30° по отношению к направлению лазерного луча.

4.1.3. Импрегнация наночастиц магнетита

Для импрегнации использовали водную дисперсию наночастиц магнетита концентрацией 0,01 мг/мл, синтезированных в присутствии 0,5% масс. крахмала в качестве стабилизатора. Образцы суставного и реберного хряща помещали в цилиндрические кюветы, так что границы образцов плотно прилегали к центру кювет, после чего кюветы заполняли дисперсией наночастиц. Время импрегнации составляло 20 мин. Во время импрегнации на кювету с образцом воздействовали постоянным магнитом с магнитным полем величиной 2000 Гаусс, приложенном в направлении главной оси цилиндрической кюветы. Образцы суставного и реберного хряща делили на 5 экспериментальных групп:

- (1) Интактные образцы, необлученные и неимпрегнированные наночастицами;
- (2) Облученные образцы, неимпрегнированные наночастицами;
- (3) Необлученные образцы, импрегнированные наночастицами;
- (4) Облученные образцы, импрегнированные наночастицами;
- (5) Образцы группы (4), подвергнутые после импрегнации повторному лазерному воздействию в том же режиме.

Таким образом, экспериментальные группы (1а – 5а) соответствуют образцам суставного хряща, а группы (1б – 5б) образцам реберного хряща. После подготовки образцов всех экспериментальных групп их делили на две части: первую часть образцов (24 суставных и 12 реберных) фиксировали в 10% формалине для подготовки их к гистологическому и гистохимическому анализу. Вторую часть образцов (24 суставных и 24 реберных) фиксировали в 2,5% р-ре глютарового альдегида для подготовки их к анализу ПЭМ.

4.1.4. Гистология и гистохимия

Для гистологического исследования образцы суставного и реберного хряща фиксировались в 10%-ном нейтральном формалине, заливались в парафин. Срезы 4-5 мкм готовились на микротоме и окрашивались гематоксилином и эозином,

пикрофуксином по Ван-Гизону на коллагеновые волокна и толуидиновым синим на кислые гликозаминогликаны. Полутонкие срезы готовили с помощью ультрамикротомы LKB модель 3 (Швеция). Полутонкие срезы залитых в глутаровый альдегид образцов окрашивались метиленовым синим - азурином II с докраской основным фуксином и фотографировались на световом микроскопе. Срезы просматривались на микроскопе Longway LCX-121S и фотографировались с помощью камеры DEM200 MiniSee (программа обработки Scope Photo).

4.1.5. ПЭМ

Для электронной микроскопии образцы в виде цилиндров размером 1,5 - 2 мм³ фиксировались в 2,5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (pH=7,2) и выдерживались при температуре 40⁰С не менее 24 ч. После этого ткань отмывали в двух сменах фосфатного буфера по 10-15 мин. Обезвоживание проводили в последовательной смене спиртов повышающейся концентрации: 40⁰ – 10 мин, 50⁰ – 10 мин, 70⁰ – 20-30 мин, 96⁰ – две смены по 15 мин, абсолютный спирт – две смены по 15 мин. После спирта продолжали обезвоживание в ацетоне (который служит растворителем для смолы) с целью дальнейшей пропитки ткани и заливки в смолу – аралдит: смесь абсолютный спирт – абсолютный ацетон (1:1) – 20 мин, абсолютный ацетон – 2 смены по 15 мин. Пропитку начинали в смеси ацетон-аралдит 1:1, выдерживая в этой смеси 2,5 - 3 часа, продолжали пропитку, переводя кусочки ткани в чистую смолу аралдит на 18-20 часов при комнатной температуре до полного испарения ацетона. После этого для окончательной заливки кусочки помещали на дно желатиновых капсул, заливали свежей порцией смолы и ставили в термостат на 60⁰С на 48-60 ч для полимеризации смолы. Далее желатиновую капсулу удаляли кипящей водой. Полученные блоки нарезают на ультрамикротоме. Срезы, толщиной 20-30 нм расправляют парами хлороформа на поверхности воды и выкладывают на формваровую подложку в центр медной бленды. Срезы окрашивают уранилацетатом.

Электронные микрофотографии получали на просвечивающем электронном микроскопе Jeol JEM-1011 при величине ускоряющего напряжения 80 кВ.

4.1.6. АСМ

Для атомно-силовой микроскопии готовили срезы хрящевой ткани толщиной 20 мкм на криотоме Leica 3050 S, которые расправляли на предметных стеклах. Срезы анализировали на атомно-силовом микроскопе Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa

Barbara, USA). 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.

4.1.7. Измерение пропускания ИК излучения

Анализ проводили на установке, снабженной детектором прошедшего ИК излучения, тепловизором Testo, расположенным под углом 30° к направлению лазерного луча, и системой позиционирования образца. Воздействие на образцы хряща толщиной 1 мм осуществляли эрбиевым волоконным лазером с длиной волны 1,56 мкм («ИРЭ – Полюс», модель ЛС-1.56, Россия) 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. Данному анализу подвергали (1) и (4) серию образцов:

- (1) Интактные образцы, необлученные и неимпрегнированные наночастицами;
- (4) Облученные образцы, импрегнированные наночастицами.

4.2. Общее описание структуры

В эксперименте, рассматриваемом в настоящей главе, лазерное воздействие осуществляли через волокно диаметром 600 мкм, что позволяет локализовать область лазерно-индуцированных структурных изменений в небольшом объеме ткани, а также выделять центр пятна облучения с достаточно большой точностью. Гистологический анализ структуры матрикса позволяет выделять и исследовать секции ткани толщиной несколько мкм, непосредственно прилегающих к центру пятна облучения. При этом с хорошим разрешением могут быть исследованы области ткани в несколько десятков микрометров.

Контрольные образцы суставного хряща в левом и правом суставах, изученные в парафиновых срезах при окрасках гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону и толуидиновым синим, а также в полутонких срезах показали, что общая структура хрящевой ткани соответствует нормальному гиалиновому хрящу. Поверхностная блестящая пластинка, поверхностный, промежуточный и глубокий слои имеют обычные для суставного хряща соотношение хондроцитов разных форм и структуру матрикса, состоящего из коллагеновых структур и протеогликанов. Полутонкие срезы, в отличие от парафиновых, дают возможность изучения цитоплазмы

хондроцитов, а также хондронной структуры, проявляющейся в менее интенсивном окрашивании территориального матрикса по сравнению с межтерриториальным (Рис.24). Клетки имеют ядра округлой, либо удлинённой формы, светлую цитоплазму и четкую лауну (зону территориального матрикса).

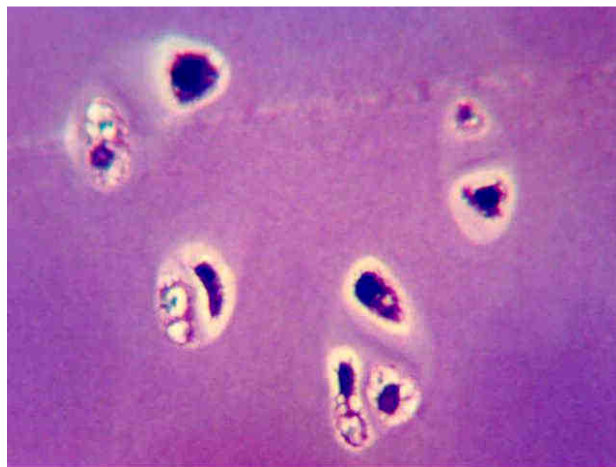


Рисунок 24. Полутонкий гистологический срез ткани суставного хряща, окраска азур II, увеличение $\times 400$. Хондроциты глубокого слоя с четкими ядрами, цитоплазмой и лакунами, без признаков деструкции ядер.

В глубоком слое образцов хряща вблизи поверхности разреза выявляется небольшое количество дистрофически измененных хондроцитов, что объясняется механическим воздействием разрезания ткани (Рис.25). Количество таких измененных клеток колеблется от 5 до 8%. Различия между правым и левым суставом выявлены не были. Контрольные образцы реберного хряща, как и в суставном хряще, состоят из трех слоев гиалинового хряща. Отличия заключаются в 1) наличии фиброзной соединительно-тканной надхрящницы (Рис.25(Б-2), Рис.26), 2) глубоких инвагинаций рыхлой соединительной ткани с сосудами вглубь хряща, что необходимо для улучшения питания толстого хряща, 3) значительно большего содержания хондроцитов и меньшего объема матрикса, 4) более четко различимы границы околоклеточного и межклеточного матрикса (Рис.25(Б-2)). Дистрофически измененные клетки видны только вблизи среза и они единичны (до 5%).

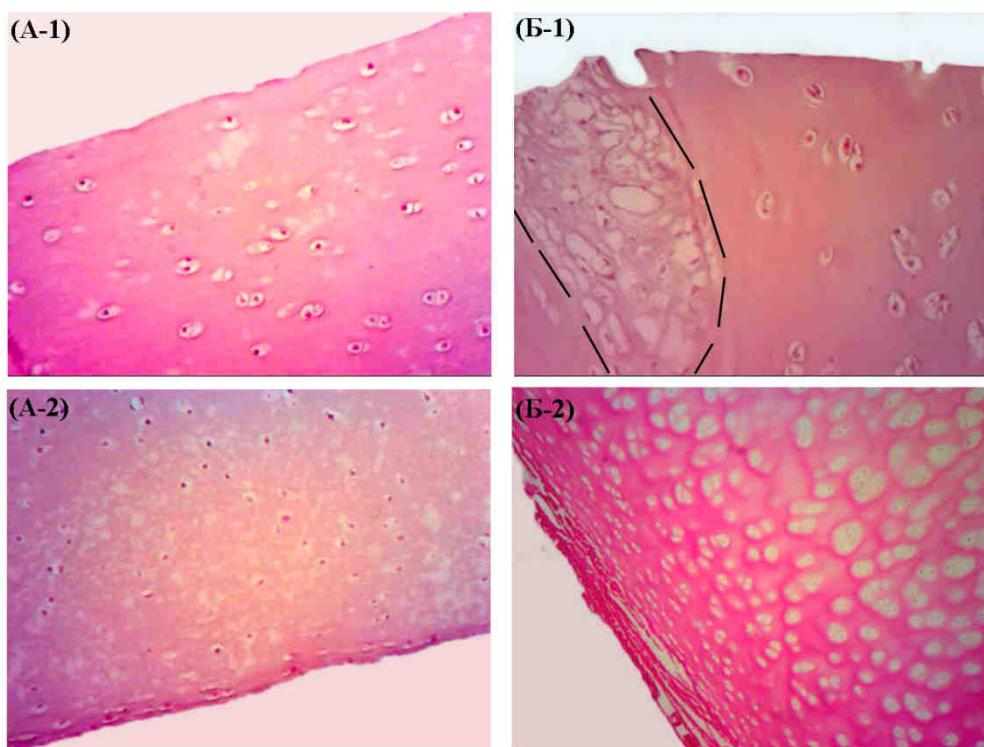


Рисунок 25. Гистологические срезы интактной ткани, окраска гематоксилином и эозином: (А-1), увеличение $\times 200$ – суставной хрящ, глубокий слой, граница соответствует поверхности среза. Относительно многочисленные хондроциты, в том числе двуядерные, дистрофические изменения минимальны. (А-2), увеличение $\times 100$ – суставной хрящ, поверхностный и средний слой, граница соответствует блестящей пластинке. Неравномерность окрашивания матрикса свидетельствует о его более рыхлой структуре, чем в глубоком слое, (Б-1), увеличение $\times 200$ – реберный хрящ, глубокий слой, граница соответствует поверхности среза. Хондроциты с четкими лакунами, дистрофические изменения единичны. Участок инвагинации соединительной ткани выделен черной пунктирной линией. (Б-2), увеличение $\times 100$, окраска пикрофуксином – реберный хрящ, поверхностный и средний слой, граница соответствует надхрящнице. Средний слой представлен хондроцитами большего размера, среди которых выявляются небольшие изогенные группы (клоны), состоящие из двух и реже из трех клеток. Видны четкие границы между территориальным (околоклеточным) и межтерриториальным матриксом.

Таким образом, процедура разрезания и механического воздействия на образцы в процессе их подготовки не приводит к существенному повреждению клеток и матрикса.

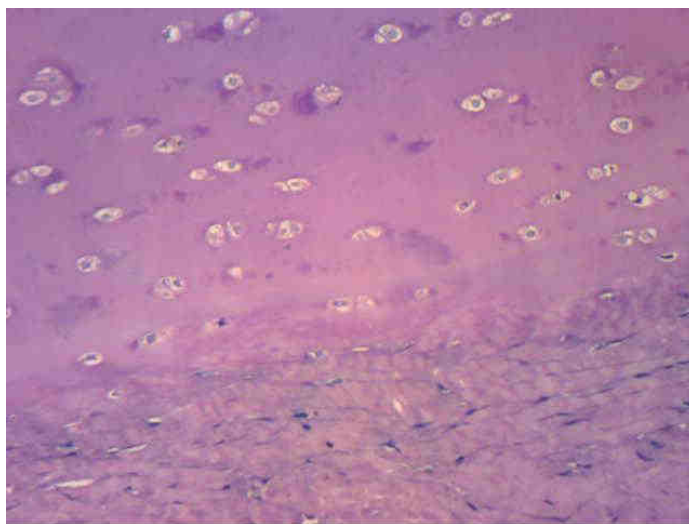


Рисунок 26. Полутонкий гистологический срез ткани реберного хряща, окраска азур II, увеличение x200. Граница поверхностного слоя хряща с надхрящницей: вверху хондроциты хряща, внизу коллагеновые пучки и фибробласты надхрящницы.

При анализе срезов интактного суставного хряща с помощью ПЭМ обнаруживаются хондроциты с плотным, часто эксцентрично лежащим ядром и цитоплазмой, имеющей цитоплазматические выросты, гранулярный эндоплазматический ретикулум (ГЭР), липидные включения (Л) (Рис.27(А-1)). Территориальный и межтерриториальный матрикс состоит из сети разнонаправленных коллагеновых фибрилл диаметром от 15 до 35 нм с типичной поперечной исчерченностью (ок. 64 нм), а также мелкогранулярного и тонковолокнистого вещества протеогликанов. Редко встречаются коллагеновые фибриллы диаметром до 100 нм (Рис.27(А-2)).

Как и в суставном хряще, при электронно-микроскопическом исследовании интактного реберного хряща обнаруживаются хондроциты и межклеточный матрикс. Некоторым отличием от суставного хряща является то, что вокруг клетки относительно четко видно резко разрыхленный матрикс, по-видимому, являющийся лакуной хондроцитов (Рис.27(Б-1)). Этот территориальный матрикс содержит в основном протеогликаны в виде мелкозернистого и тонкофибрилярного (войлокообразного) вещества, а также редкие тонкие коллагеновые фибриллы с типичной периодичностью. Большая часть клеток имеет не округлую, как в суставном хряще, а несколько вытянутую форму (Рис.27(Б-1)). В территориальном и межтерриториальном матриксе плотность коллагеновых фибрилл выше, чем в суставном хряще. Наблюдаются участки с продольным и поперечным разрезом коллагеновых фибрилл диаметром 128 ± 30 нм с четкой поперечной исчерченностью, средний наблюдаемый период составляет 61 ± 8 нм.

Реже обнаруживаются пучки фибрилл общим диаметром около 150 нм и диаметром отдельных фибрилл около 30 нм (Рис.27(Б-2)).

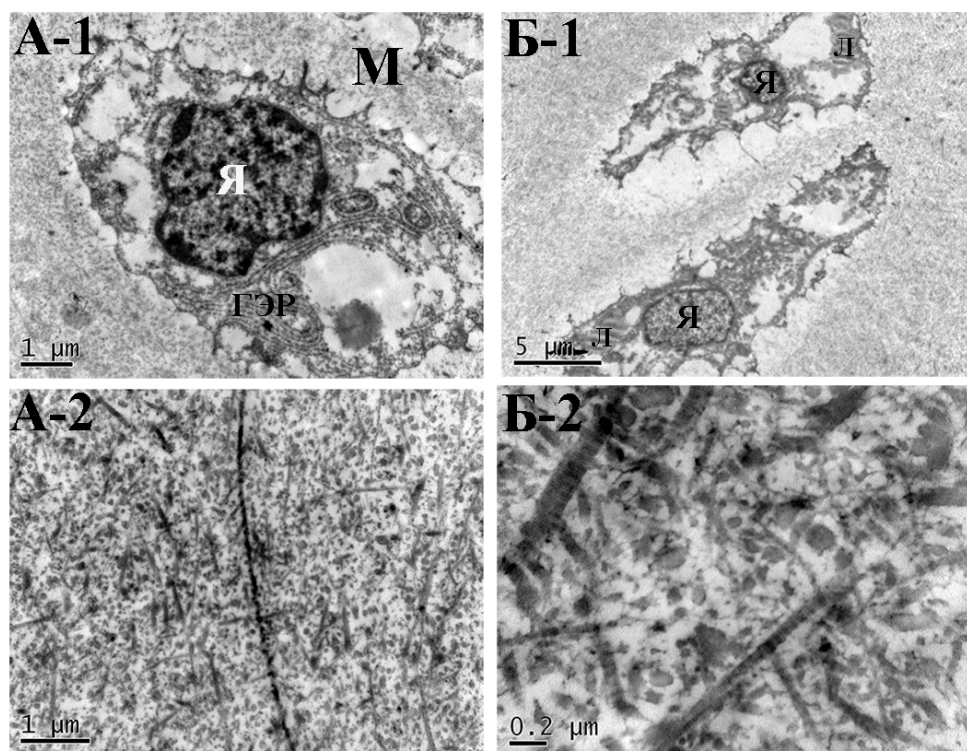


Рисунок 27. Электронные микрофотографии срезов интактной ткани, окраска уранилацетат: (А-1) – суставной хрящ, хондроцит с округлым ядром (Я), цитоплазмой, которая содержит гранулярный эндоплазматический ретикулум (ГЭР). Вокруг клетки территориальный матрикс (М), состоящий из тонко-волокнистого материала. (А-2) – суставной хрящ, межтерриториальный матрикс, состоящий из тонких фибрилл диаметром 15 – 50 нм и зернистого материала из протеогликанов. Видны отдельные крупные фибриллы диаметром до 100 нм. (Б-1) – реберный хрящ, две клетки с хорошо очерченными ядрами (Я), видны липидные включения (Л). Вокруг клеток неширокая лакуна. Лакуны окружены территориальным матриксом. (Б-2) – реберный хрящ, межтерриториальный матрикс, в котором видны продольно и поперечно срезанные коллагеновые фибриллы размером 128 ± 30 нм. Видны пучки сравнительно тонких фибрилл. Между фибриллами тонко-фибриллярный и гранулярный материал (протеогликаны).

Структура территориального матрикса суставного и реберного хряща исследовалась при большом увеличении (Рис.28). Как для суставного, так и для реберного хряща околочлеточная зона представлена более рыхлым мелкозернистым веществом, содержащим тонкофибриллярные включения. Предположительно, данные структуры представляют собой минорные коллагены и сеть, образованную молекулами протеогликанов.

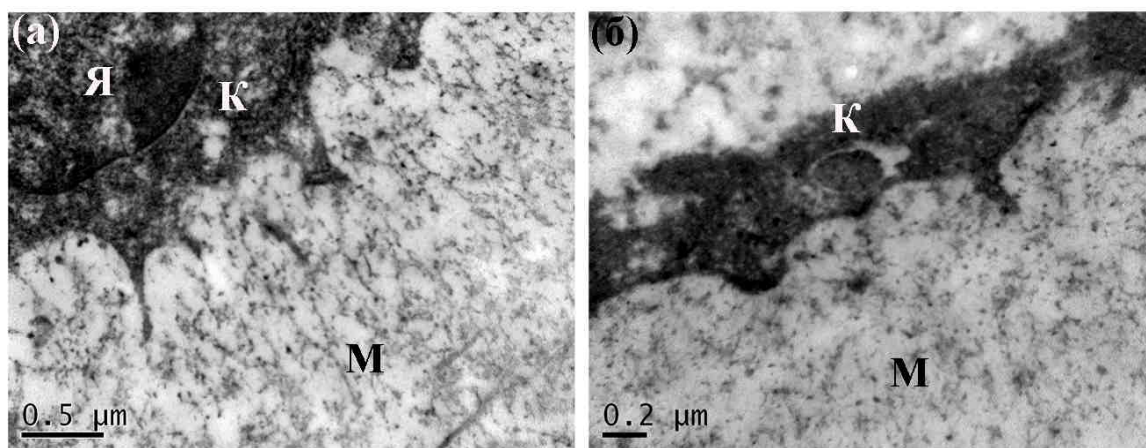


Рисунок 28. Электронные микрофотографии территориального матрикса в интактном хряще, окраска уранилацетат: **(а)** – суставной хрящ, граница клетки (К) и матрикса (М). Видно ядро (Я) с четкой границей, в матриксе тонкие коллагеновые фибриллы размером от 9 до 30 нм. Поперечно срезанные фибриллы (средний диаметр 17 ± 6 нм) и более четко видна очень мелкая зернистость (протеогликаны). **(б)** – реберный хрящ, резко-разрыхленный зернисто-волоконистый матрикс (М) непосредственно вблизи границы клетки (К)

Граница области лазерного воздействия для всех экспериментальных групп выявлялась анализом срезов на световом микроскопе и сопоставлением данных экспериментальных групп (2) – (5) с контрольной интактной группой (1). Область структурных изменений определялась на основе четырех критериев: (а) снижение интенсивности эозинофилии матрикса, (б) снижение метахромазии при окрашивании толуидиновым синим, (в) снижение фуксинофилии при окрашивании пикрофуксином, (г) наличие клеточных изменений, не типичных для интактного контроля: дистрофические изменения клеточных ядер, деструкция цитоплазмы, бесклеточные области. Было установлено, что граница области структурных изменений, вызванных лазерным воздействием, не имеет четких очертаний и является диффузной. Изменения клеток и матрикса, вызванные лазерным воздействием, были максимальны у поверхности воздействия и наблюдались в меньшей степени вплоть до среднего слоя хрящевой ткани.

4.3. Влияние лазерного облучения

4.3.1. Коллаген и протеогликаны

Как было показано с помощью метода ДСК для реберного хряща в Главе 2 настоящей работы, а также описано для суставного хряща в работах [2,53,118], существуют такие параметры лазерной модификации, при которых заметной деструкции коллагена хряща не происходит. В данной работе методом ДСК исследовались участки реберного хряща, содержащие пятно лазерного облучения, объем

которых составлял около 6 мм³. Такой объем содержит как область непосредственного теплового лазерного воздействия, так и области ткани, в которых лазерное воздействие ограничивалось небольшим нагревом и механическими процессами теплового расширения. Таким образом, заметные структурные изменения коллагена при анализе большого объема ткани не выявляются.

Результаты гистологического анализа также свидетельствуют о том, что матрикс хряща под влиянием всех факторов изменяется минимально. Данные ДСК, описанные в Главе 2, подтверждаются результатами анализа срезов облученной ткани, окрашенной пикрофуксином (Рис.29).

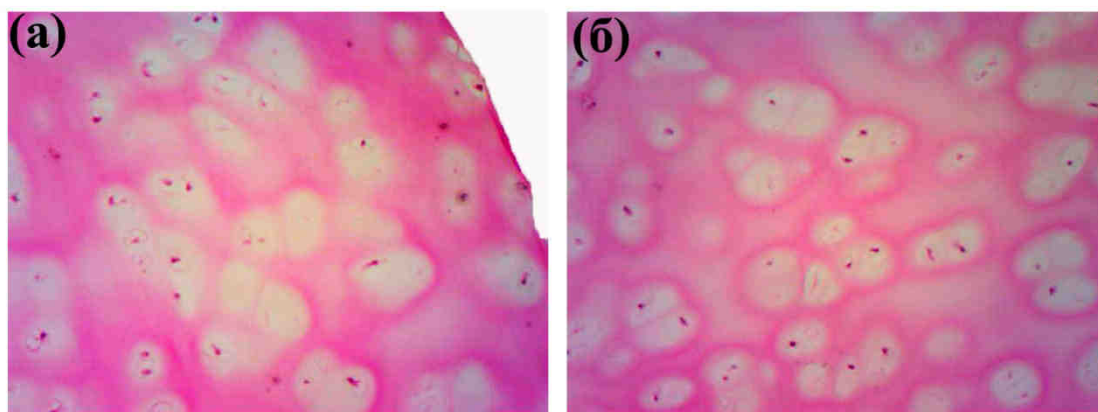


Рисунок 29. Гистологические срезы реберного хряща, окраска пикрофуксином по Ван Гизону, увеличение x200: (а) интактный, (б) облученный (центр пятна облучения). Снижения интенсивности окрашивания в облученном хряще не наблюдается. Выраженная хондронная структура: видны различия интенсивности окрашивания территориального и межтерриториального матрикса.

При окраске срезов реберного хряща по Ван Гизону четко видна хондронная структура: вокруг клеток территориальный матрикс окрашивается более интенсивно, чем межтерриториальный (Рис.29). Для образцов суставного хряща хондронная структура проявляется менее интенсивно. Различий в интенсивности окрашивания для облученного хряща по сравнению с интактным контролем также не наблюдается, что свидетельствует об отсутствии заметных изменений в структуре коллагена (Рис.30).

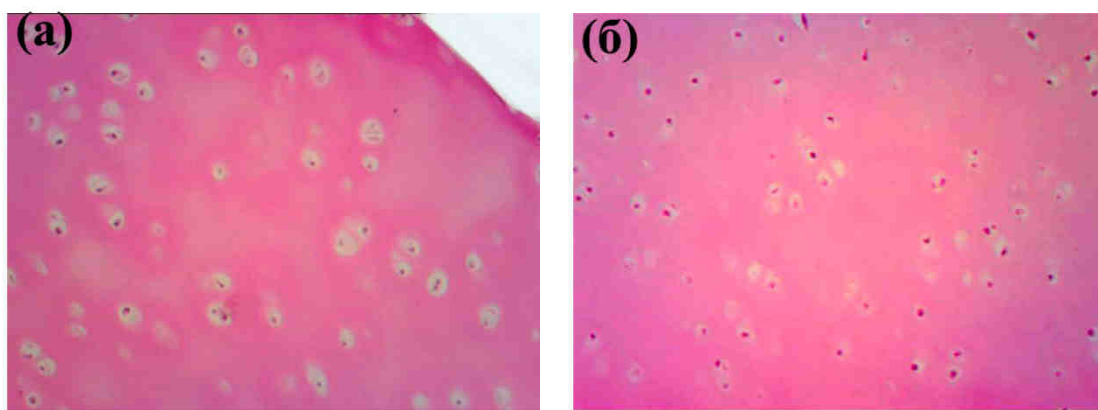


Рисунок 30. Гистологические срезы суставного хряща, окраска пикрофуксином по Ван Гизону, увеличение $\times 200$: (а) интактный, (б) облученный (центр пятна облучения). Снижения интенсивности окрашивания в облученном хряще не наблюдается. Структура хондроцитов выражена слабо.

Для всех экспериментальных групп, в которых хрящ подвергали лазерному облучению, наблюдается снижение метахромазии при окраске толуидиновым синим, выявляемое только в зоне клеточных изменений. Это свидетельствует о некотором уменьшении содержания кислых гликозаминогликанов в облученном хряще и, следовательно, изменение структуры протеогликанов. Таким образом, как для суставного (Рис.31), так и для реберного (Рис.32) хряща протеогликановая подсистема является менее стабильной при лазерном воздействии.

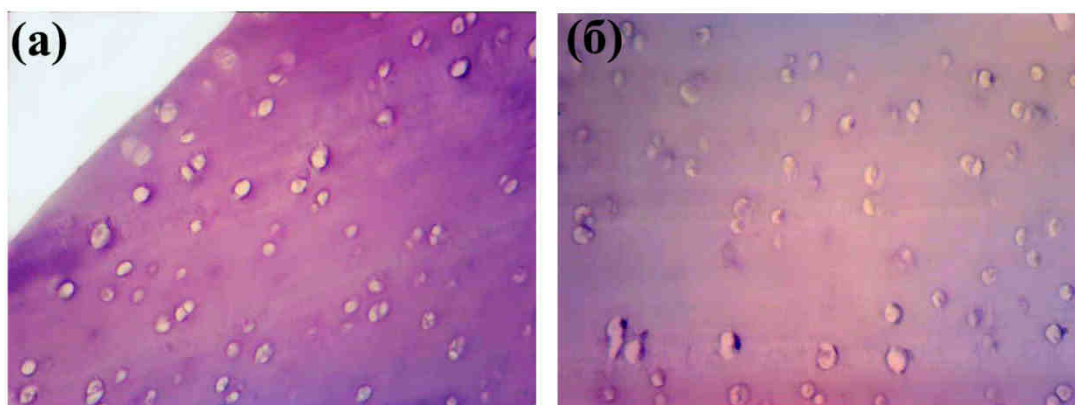


Рисунок 31. Гистологические срезы суставного хряща, окраска толуидиновым синим, увеличение $\times 200$. (а) – интактный хрящ, (б) – облученный хрящ (центр пятна облучения). Заметное снижение метахромазии в облученном образце.

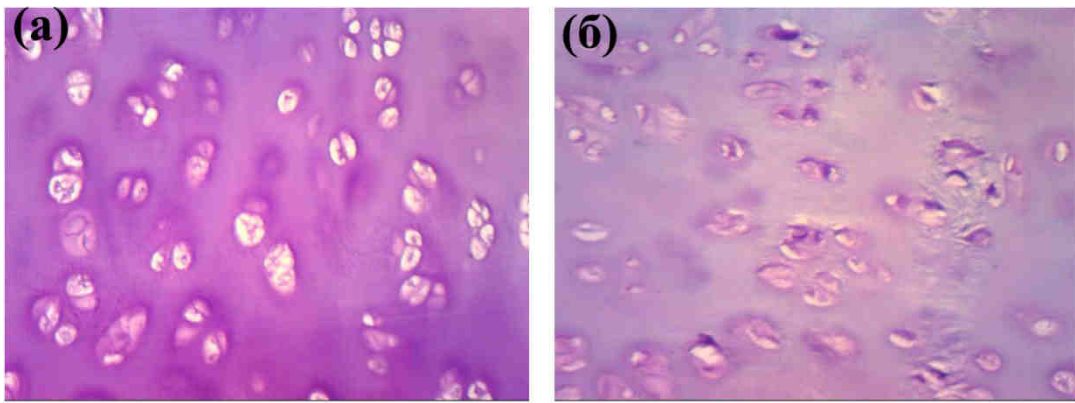


Рисунок 32. Гистологические срезы реберного хряща, окраска толуидиновым синим, увеличение $\times 200$. (а) – intactный хрящ, (б) – облученный хрящ (центр пятна облучения). Снижение метахромазии в облученном образце.

Структуру облученного хряща анализировали методом атомно-силовой микроскопии, так как данный метод позволяет получить информацию о тонкой структуре коллагеновых фибрилл, а также об изменениях пространственной текстуры ткани. Так, при анализе intactных срезов реберного хряща в межтерриториальном матриксе наблюдаются фибриллы с четкой очерченностью границ и средней периодичностью 62 ± 7 нм (Рис.33).

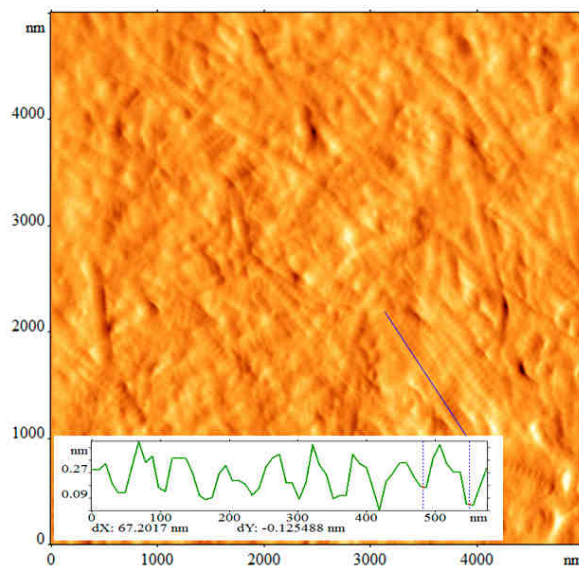


Рисунок 33. АСМ изображение поверхности intactного реберного хряща (градиентное преобразование профиля высоты). На вставке снизу график периодичности коллагеновой фибриллы, отмеченной на изображении синей линией.

Анализ облученного хряща выявляет изменение тонкой структуры коллагенового каркаса, степень которого зависит от расстояния от поверхности облучения. Так, области хряща, непосредственно прилегающие к поверхности (до 150 мкм) характеризуются отсутствием четкой очерченности фибрилл, границы фибрилл в их

пучках становятся диффузными (Рис.34а). Периодичность структуры также выявляется слабо.

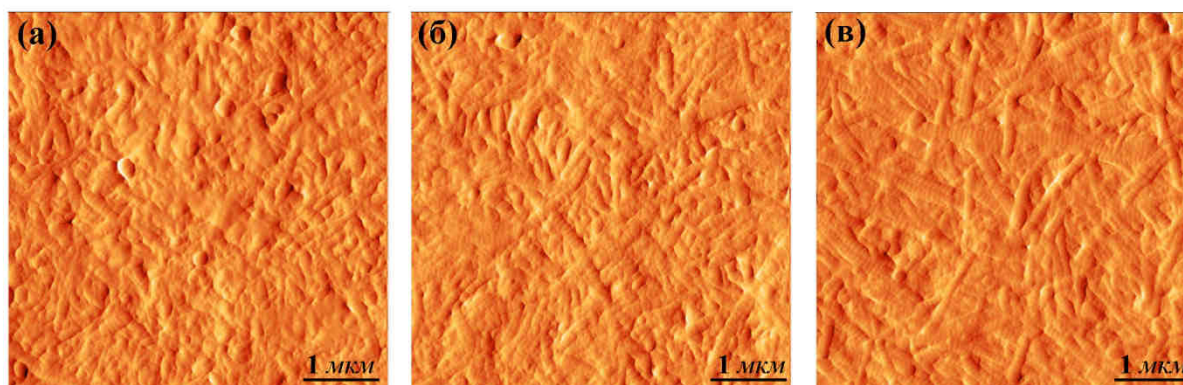


Рисунок 34. АСМ изображения межтерриториального матрикса реберного хряща (сигнал амплитуды) : (а) – 150 мкм от облученной поверхности, границы фибрилл диффузные, периодичность не просматривается, (б) – 350 мкм от облученной поверхности, степень изменений тонкой структуры фибрилл заметно ниже, (в) – 500 мкм от облученной поверхности, структура не отличается от интактной.

Степень наблюдаемых изменений тонкой структуры быстро снижается при послойном анализе по направлению от поверхности облучения (Рис.34б). На глубине уже около 0,5 мм от поверхности эти изменения не наблюдаются, и структура коллагена мало отличается от интактной (Рис.34в).

АСМ анализ образцов, взятых из участков реберного хряща, которые в процессе лазерного воздействия подвергались механическому искривлению (сжатию и растяжению), выявляет особенности структурной организации матрикса, связанные с наличием областей плотной (для сжатой структуры) и достаточно разреженной (для растянутой) упаковки коллагеновых фибрилл (Рис.35). В образцах, подвергавшихся растяжению в процессе лазерного воздействия, шаг периодичности коллагеновых фибрилл несколько выше среднего и составляет 67 ± 5 нм, что свидетельствует о стабильности изменений микроструктуры хряща после лазерного воздействия и снятия растягивающей нагрузки (Рис.35б). То же самое можно сказать о долговременной стабильности наблюдаемых сжатых областей матрикса с плотной упаковкой коллагеновых фибрилл (Рис.35а).

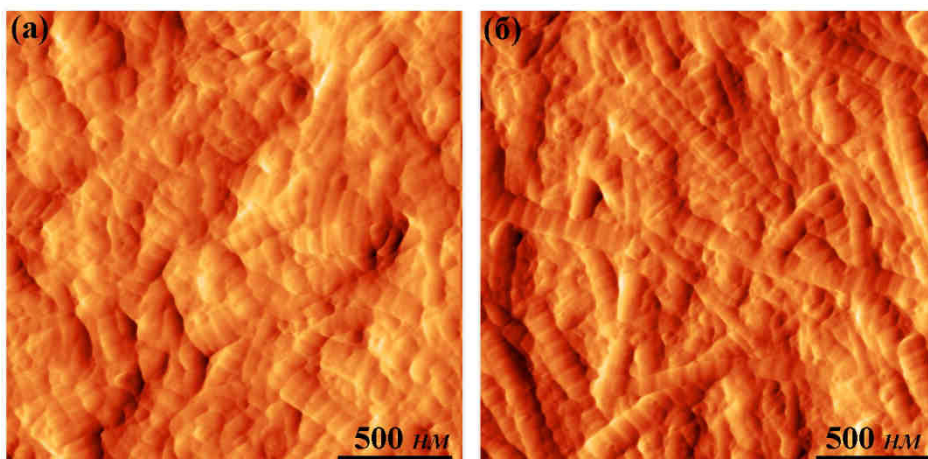


Рисунок 35. АСМ изображения (сигнал амплитуды) реберного хряща, облученного в режиме коррекции формы: (а) – образец, подвергавшийся сжатию в процессе лазерного воздействия, плотная упаковка коллагеновых фибрилл, (б) – образец, подвергавшийся растяжению в процессе лазерного воздействия, разреженная упаковка, много протяженных фибрилл с увеличенным средним периодом 67 ± 5 нм.

Текстура интактного и облученного хряща, полученная при анализе высотных профилей АСМ, оказывается различной. Для облученного хряща наблюдается значительный перепад высот, в 3 – 4 раза превышающий значения для интактного хряща (Рис.36). Средняя (R_a) и среднеквадратичная (R_{ms}) шероховатость поверхности межклеточного матрикса реберного хряща на микроуровне (при анализе участков 5×5 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. Это свидетельствует о некотором разрыхлении первоначальной структуры матрикса хряща после лазерного воздействия, увеличении свободного объема или образовании лазерно-индуцированных субмикропор. Полученные данные согласуются с результатами, полученными ранее для хряща носовой перегородки, когда после лазерного воздействия наблюдалось образование субмикропор размером 100 – 200 нм [37].

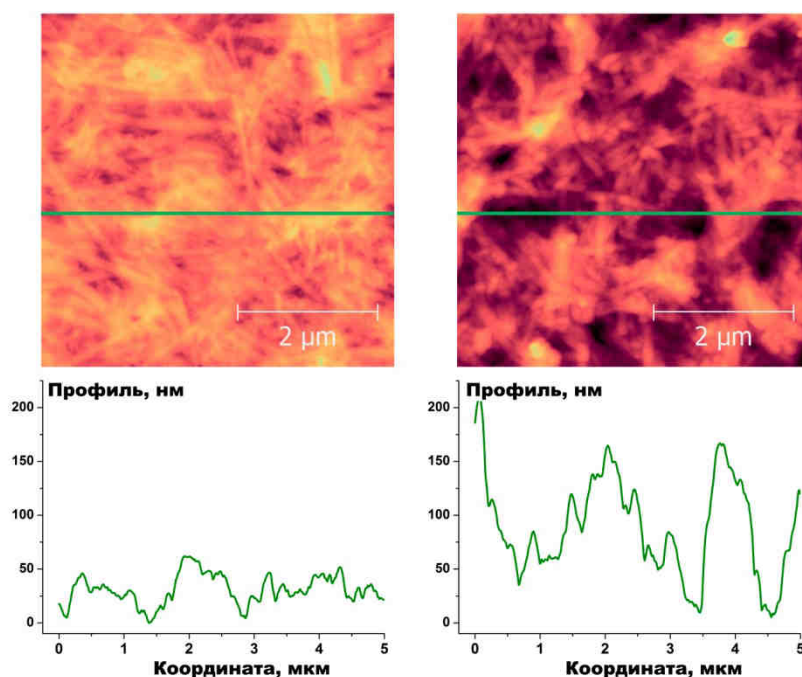


Рисунок 36. АСМ изображения (сигнал высоты) поверхности intactного (слева) и облученного (справа) реберного хряща. Графические профили соответствуют координатам линии на изображении.

При использовании ПЭМ во всех облученных экспериментальных группах суставного хряща в области, прилегающей к поверхности лазерного воздействия, выявляется увеличение лакунообразных пустот территориального матрикса вокруг клеток. Некоторые из этих пустот полностью электроннопрозрачные, другие содержат очень рыхло расположенный зернистый компонент (протеогликаны), и еще реже отдельные тонкие коллагеновые фибриллы (Рис.37а). Для реберного хряща это явление также наблюдается: множество клеток в зоне лазерного воздействия окружены широкой лакуной электронно-прозрачного вещества, в которых наблюдаются сферические образования, похожие на пузырьки воздуха (Рис.37б). Данное наблюдение свидетельствует о меньшей стабильности вещества территориального матрикса по сравнению с межтерриториальным при лазерном воздействии. Образование электронно-прозрачных областей может быть вызвано частичным разрушением структуры протеогликанов и минорных коллагенов, что подтверждается данными гистологии по окраске толуидиновым синим.

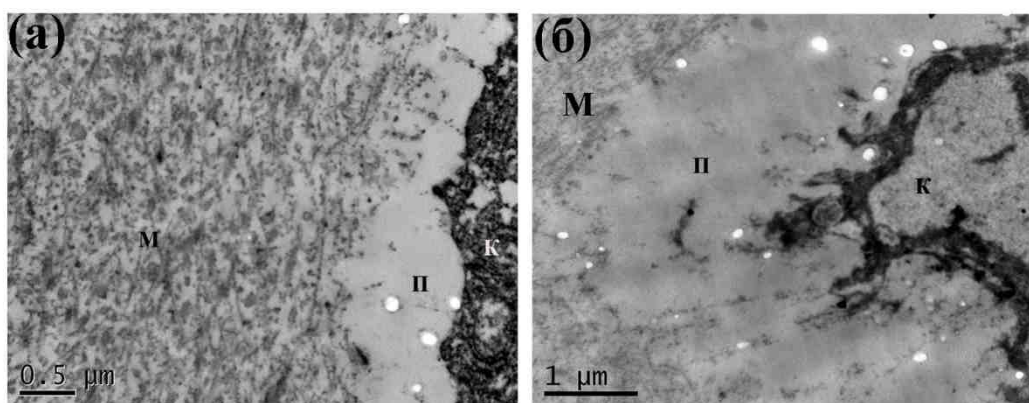


Рисунок 37. Электронные микрофотографии территориального матрикса в облученном хряще, окраска уранилацетат: (а) – суставной хрящ, электронно-прозрачная промежуточная область (П) между клеткой (К) и матриксом (М). (б) – реберный хрящ, широкая электронно-прозрачная область (П), заполненная мелкозернистым веществом на границе клетки (К) и матрикса (М). На обоих изображениях в области электронной прозрачности матрикса присутствуют сферические элементы, напоминающие газовые пузыри.

Таким образом, лазерное воздействие в режиме неразрушающей модификации локально изменяет микроструктуру хрящевого матрикса: наблюдается снижение содержания кислых гликозаминогликанов, нарушение тонкой структуры коллагеновых фибрилл, происходит расширение субмикропор и частичное разрушение мелкофибриллярного вещества территориального матрикса.

4.3.2. Хондроциты

В экспериментальных группах суставного хряща, в которых образцы подвергались лазерному облучению, выявлены качественно одинаковые изменения. Они проявлялись в наличии дистрофически измененных хондроцитов с явлениями лизиса, пикноза (сморщивания) и рексиса (разрушения) ядра и деструкции цитоплазмы (на полутонких срезах). Пикнотически измененные клетки часто располагались на самой периферии клеточной лакуны, в отличие от сохранившихся хондроцитов, где клетка находится в центре лакуны. Обнаружены также множественные пустые лакуны, «тени» лакун, заполненных светлым материалом, и отдельные небольшие бесклеточные поля (Рис.38). Все эти изменения клеток располагались вблизи облученной поверхности, постепенно уменьшаясь по направлению к внешней поверхности образца. Четкой границы между измененной и сохраненной тканью не выявлялось. Зона поражения с максимальным радиусом в проекции центра пятна облучения, содержала около 50% клеток с дистрофическими изменениями.

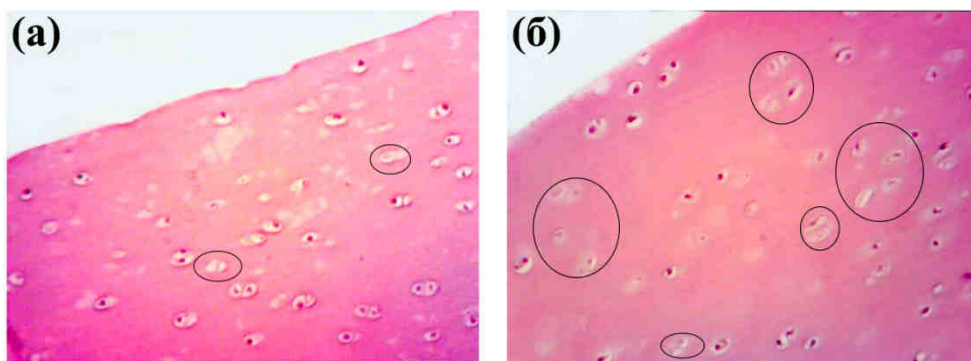


Рисунок 38. Гистологические срезы ткани суставного хряща, окраска гематоксилин и эозин, увеличение $\times 200$, области дистрофических клеточных изменений выделены эллипсами: (а) – intactный хрящ. (б) – облученный хрящ, в центре изображения наблюдается бесклеточная область, содержащая «тени» клеток.

Анализ полутонких срезов суставного хряща позволяет сказать, что поверхностный и средний слои облученного хряща не изменены по сравнению с intactным хрящом. В глубоком слое вблизи поверхности облучения в части хондроцитов имеются признаки пикноза и рексиса клеточных ядер, а также бесклеточные пустые лакуны (Рис.39).

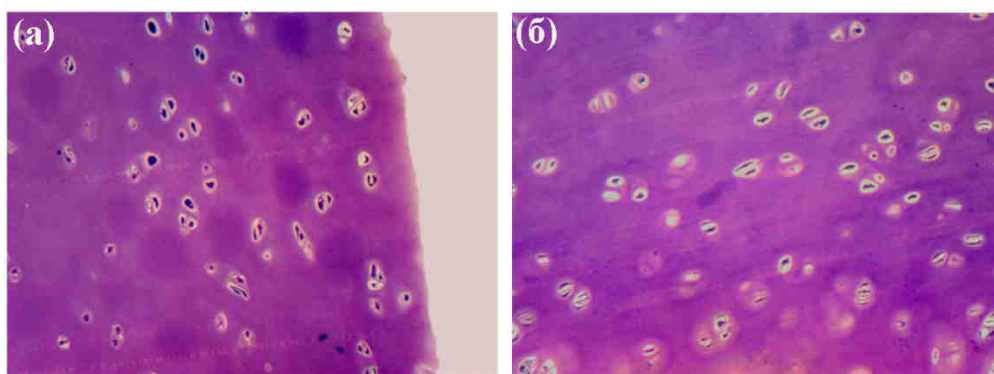


Рисунок 39. Полутонкий гистологический срез суставного хряща, окраска азур II, увеличение $\times 200$. (а) – intactный хрящ, ядра хондроцитов окрашены в темный цвет, цитоплазма светлая, отсутствует деструкция ядер. (б) – облученный хрящ, видны клетки с признаками пикноза и рексиса ядер, а также пустые лакуны.

В облученных образцах реберного хряща, как и в суставных хрящах, наблюдается значительное увеличение числа клеток с разными проявлениями дистрофии. В целом в зоне поражения около 50% клеток имеют дистрофические изменения различной степени (Рис.40). Такая зона обнаружена вблизи поверхности облучения (около 150 мкм), но изменения наблюдаются также и на некотором удалении от нее, постепенно уменьшаясь.

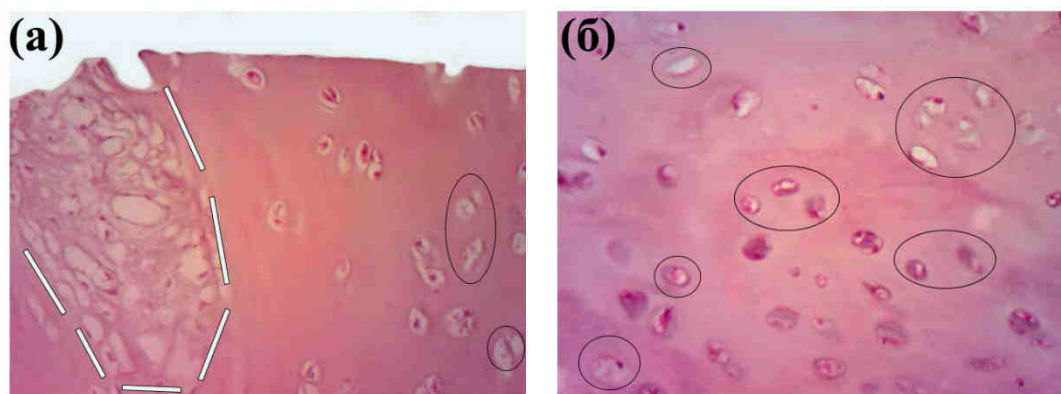


Рисунок 40. Гистологические срезы ткани реберного хряща, окраска гематоксилин и эозин, увеличение x200, области дистрофических клеточных изменений выделены эллипсами: (а) – intactный хрящ, белой пунктирной линией выделена инвагинация соединительной ткани. (б) – облученный хрящ, видны клетки с деструкцией ядер, бесклеточные лакуны.

На полутонких срезах облученного реберного хряща надхрящница, поверхностный и средний слой ткани не изменены. В глубоком слое вблизи поверхности облучения наблюдается увеличенное количество клеток с пикнозом и рексисом ядра, а также пустые лакуны (Рис.41).

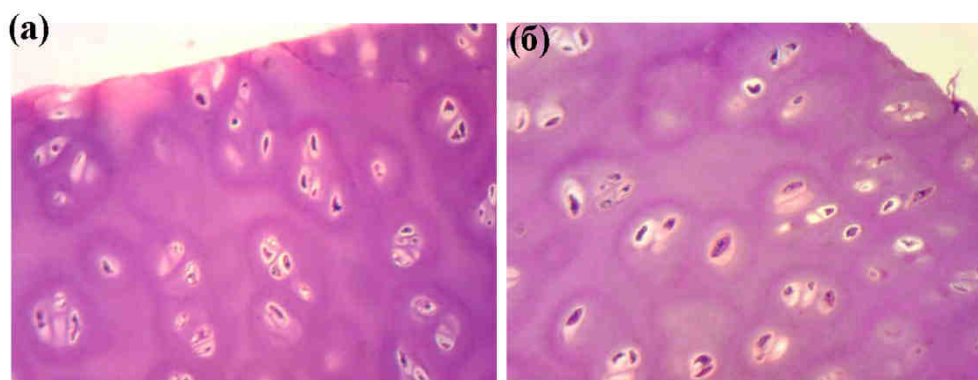


Рисунок 41. Полутонкий гистологический срез реберного хряща, окраска азур II, увеличение x200. (а) – intactный хрящ, четко видна хондронная структура, хондроциты в целом не изменены, видны единичные пустые лакуны. (б) – облученный хрящ, видны клетки с признаками рексиса и лизиса ядра и пустые лакуны, заполненные матриксом.

При использовании ПЭМ выявляется, что во всех образцах суставного хряща, которые подвергались лазерному воздействию, увеличивается содержание дистрофически измененных хондроцитов: от появления крупных пустот в клетках до деструкции цитоплазмы (Рис.42А). При этом наибольшие изменения обнаруживаются при повторном облучении, в части клеток хряща полностью разрушается и цитоплазма, и ядро. Характерно также увеличение лакунообразных пустот вокруг клеток. Некоторые из этих пустот полностью электроннопрозрачные, другие содержат очень рыхло расположенный зернистый компонент (протеогликаны), и еще реже отдельные тонкие коллагеновые фибриллы. В реберном хряще, как и в группе суставного хряща, во всех

образцах с лазерным облучением, по сравнению с контролем, увеличилось количество клеток с дистрофическими изменениями, количество которых преобладает в группе с повторным облучением. Изменения проявлялись в образовании пустот в цитоплазме клеток и лакунообразной зоны разрыхления вокруг клеток, деструкции внутриклеточных органелл, вплоть до деструкции клеточной оболочки и сморщивания периферически расположенного ядра (Рис.42Б).

Таким образом, лазерное воздействие в режиме неразрушающей модификации приводит к появлению клеточных изменений в зоне, прилегающей к поверхности облучения, заключающихся в различной степени деструкции клеточных ядер, а также появлении бесклеточных областей и «теней» клеточных лакун, заполненных матриксом.

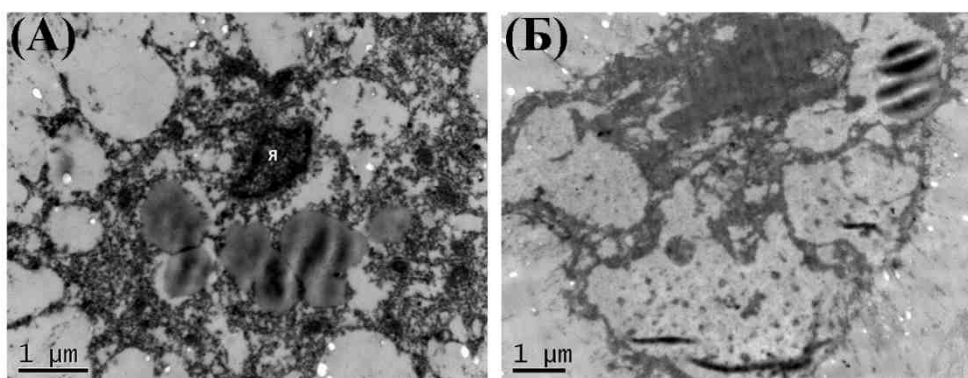


Рисунок 42. Электронные микрофотографии хондроцитов с дистрофическими изменениями в облученном хряще, окраска уранилацетат: (А) – суставной хрящ, хондроцит с пикнотическим ядром (Я) и частичной деструкцией цитоплазмы. (Б) – реберный хрящ, хондроцит с резко расширенными внутриклеточными пространствами, заполненными мелкозернистым содержимым и остатками органелл. Вокруг клетки почти электронно-прозрачная субстанция

4.4. Влияние импрегнации наночастиц магнетита

В опытных группах суставного и реберного хряща, для которых проводилась импрегнация наночастиц магнетита, при проведении гистологического анализа качественных изменений структуры матрикса не обнаружено: окрашивание пикрофуксином не выявляет признаков деструкции коллагена, снижение интенсивности окрашивания толуидиновым синим для облученных образцов, импрегнированных наночастицами, идентично наблюдаемому для облученных образцов, не содержащих наночастиц. Таким образом, на уровне макроорганизации хрящевого матрикса наночастицы в используемой концентрации не вносят дополнительных изменений [121].

Процент клеточных изменений для облученных образцов, импрегнированных наночастицами, также не отличается от данных для облученного хряща без наночастиц: в зоне лазерного воздействия наблюдается около 50% клеток с дистрофическими

изменениями (Рис.43(А-1,Б-1)). В экспериментальной группе образцов, подвергавшихся повторному лазерному воздействию после импрегнации наночастиц, при анализе приповерхностной зоны как суставного, так и реберного хряща, это значение возрастает с 50 до 70-80% клеток с дистрофическими изменениями (Рис.43(А-2,Б-2)).

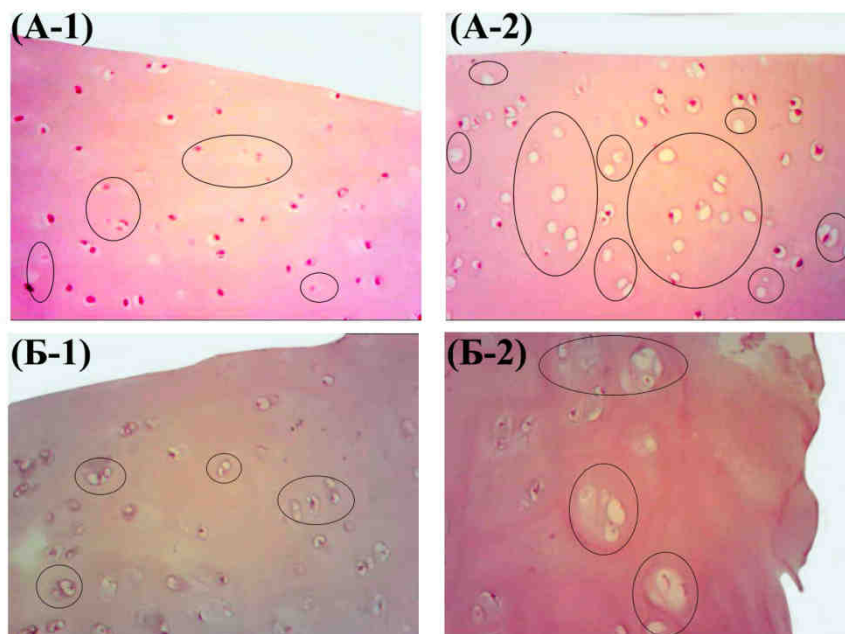


Рисунок 43. Гистологические срезы хрящевой ткани, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x200, области дистрофических изменений клеток помечены эллипсами: **(А-1)** – облученный суставной хрящ, импрегнированный наночастицами. Умеренное количество дистрофически измененных хондроцитов вблизи поверхности облучения, мало пустых лакун. **(А-2)** – облученный суставной хрящ, импрегнированный наночастицами и облученный повторно. Большое количество дистрофически измененных клеток, в основном с рексисом и лизисом ядра, много пустых лакун. **(Б-1)** – облученный реберный хрящ, импрегнированный наночастицами. Вблизи облученной поверхности пустые лакуны и хондроциты с пикнозом и рексисом ядра. **(Б-2)** – облученный реберный хрящ, импрегнированный наночастицами и повторно облученный. Много пустых лакун, клетки с пикнотическими ядрами и большие бесклеточные области.

ПЭМ анализ неокрашенной структуры хрящевой ткани, импрегнированной наночастицами, позволяет исследовать их размер и распределение в интактной и облученной хрящевой ткани. Концентрация наночастиц, импрегнированных в интактную структуру, сравнительно небольшая. Размер наблюдаемых частиц варьируется в диапазоне 5 – 15 нм (Рис.44Б). В облученном хряще наблюдается высокая концентрация наночастиц и их агломератов (Рис.44А). Размер наблюдаемых частиц лежит в диапазоне 5 – 100 нм. Отдельные агломераты частиц достигают размера 150 – 200 нм. Следовательно можно заключить, что лазерное облучение приводит к расширению субмикropористой системы хрящевой ткани, что способствует увеличению ее проницаемости для наночастиц. Подобные изменения микроструктуры, связанные со

снижением содержания протеогликанов и нарушением тонкой организации коллагеновых фибрилл, соответствуют ранним стадиям деградации хрящевой ткани [20]. Таким образом, размер и концентрация импрегнированных наночастиц дают информацию о состоянии микроструктуры хряща и могут служить индикатором степени деградации ткани.

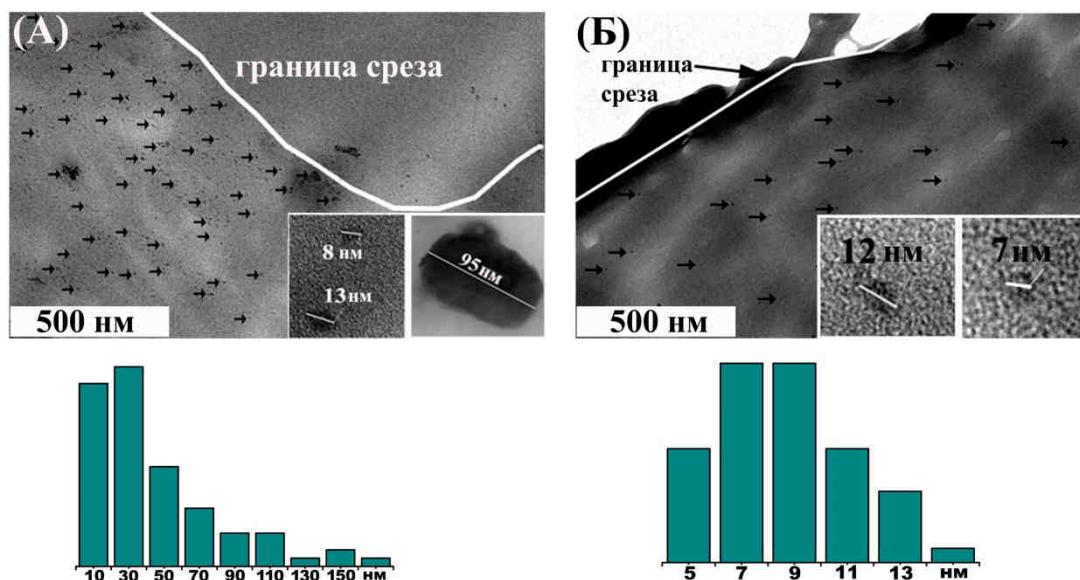


Рисунок 44. Электронные микрофотографии неокрашенных срезов реберного хряща, наночастицы отмечены черными стрелками, на вставках приведены фотографии отдельных наночастиц, внизу соответствующие распределения по размеру: (А) – облученный хрящ, размер частиц 5 – 100 нм, отдельные агломераты частиц до 200 нм (распределение по 250 частицам). (Б) – интактный хрящ, размер частиц 5 – 15 нм, небольшая концентрация частиц (распределение по 100 частицам).

Анализ окрашенных уранилацетатом срезов хрящевой ткани сустава и ребер, выявляет следующие особенности: повышенная концентрация наночастиц, импрегнированных в облученный хрящ, наблюдается в областях территориального матрикса (Рис.45), хотя частицы наблюдаются также в межклеточном матриксе.

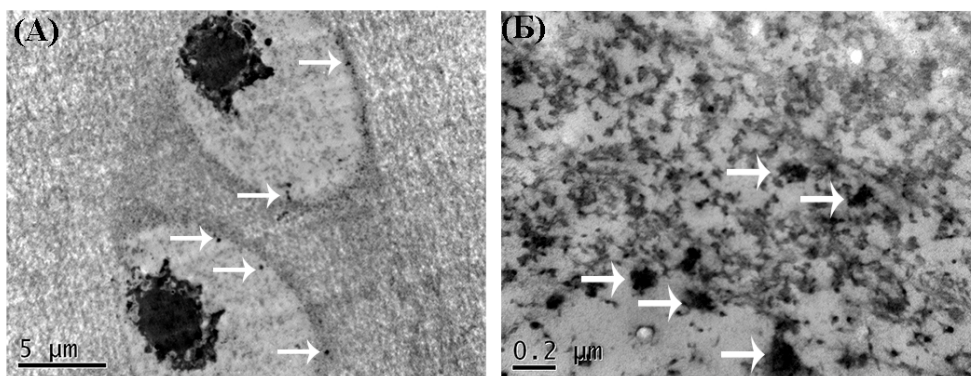


Рисунок 45. Электронные микрофотографии облученного суставного хряща, импрегнированного наночастицами, окраска уранилацетат: (А) - Две клетки с пикнотическими ядрами и обширными лакунами. Клетки занимают периферийное положение в лакуне. В нижней клетке уплотнение и разрушение цитоплазмы. Наибольшее количество агломератов частиц размером 150 – 230 нм расположено на границе лакуны и матрикса (отмечены стрелками). Территориальный матрикс более электронно-плотный, чем окружающее пространство. (Б) - территориальный матрикс, состоящий из коллагеновых фибрилл и протеогликанов, содержит агломераты частиц размером до 200 нм (отмечены стрелками).

Так, в суставном хряще сферические наночастицы размером 10 – 30 нм и их агломераты размером 150 – 230 нм, содержащие до 15 – 20 частиц наблюдаются на границе пространства клетки и территориального матрикса. Территориальный матрикс суставного хряща с наночастицами оказывается более электронно-плотным, чем окружающее пространство, а также более электронно-плотным, чем наблюдалось для образцов облученного хряща без наночастиц, как, например, на Рис.37а.

Размер наблюдаемых частиц и их агломератов в облученном реберном хряще варьируется в пределах 5 – 150 нм. Частицы преимущественно наблюдаются в территориальном матриксе (Рис.46). Таким образом, наночастицы, импрегнированные в облученный хрящ, преимущественно концентрируются в областях, подвергшихся максимальным изменениям в ходе лазерного воздействия – на границе клеток и территориального матрикса. Данное наблюдение также свидетельствует в пользу того, что в территориальном матриксе при лазерном воздействии происходит частичная деструкция вещества протеогликанов и минорных коллагенов и увеличивается свободный объем (субмикропоры), куда могут проникнуть наночастицы и сформировать агломераты. Максимальный размер агломератов (до 250 нм) лежит в пределах, соответствующих среднему размеру молекулы протеогликана [16,17,19,71].

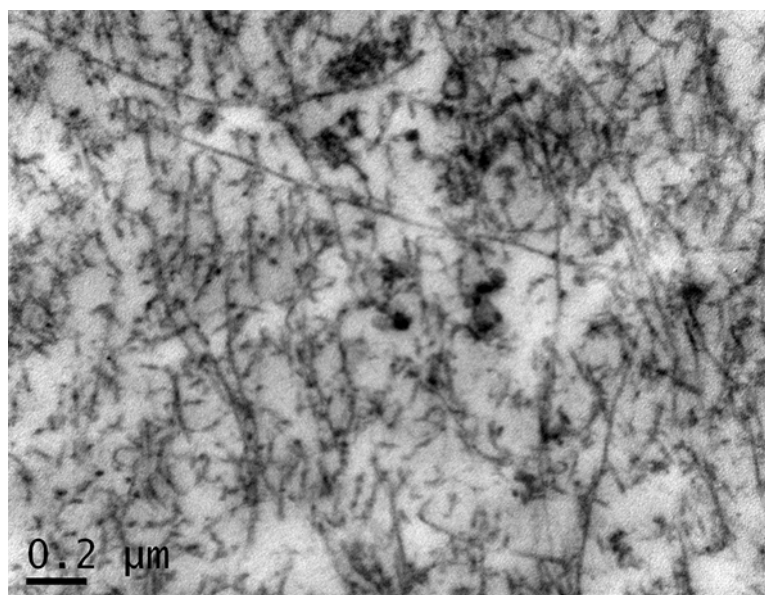


Рисунок 46. Электронная микрофотография облученного реберного хряща, импрегнированного наночастицами магнетита, окраска уранилацетат. Частицы и их агломераты размером до 200 нм в территориальном матриксе.

Таким образом, импрегнация наночастиц в исследуемой концентрации не приводит к дополнительным изменениям структуры хондроцитов и матрикса хрящевой ткани. Основным фактором, влияющим на степень структурных изменений, судя по всему, является термо-механический эффект лазерного воздействия. Локализация и агломерация наночастиц в территориальном матриксе облученного хряща свидетельствует о наличии в данной области свободного объема, который мог образоваться в результате термической деструкции протеогликанов и минорных коллагенов при лазерном воздействии.

4.4. Взаимодействие с ИК излучением

Коэффициент поглощения наночастиц магнетита в области ближнего ИК в несколько раз превышает поглощение хрящевой ткани в данной области спектра. Таким образом, импрегнация наночастиц может служить инструментом для управления поглощением лазерного излучения и локализации термомеханического воздействия, вызывающего полезный эффект, в областях ткани, содержащих дефекты структуры. На Рис.47 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.

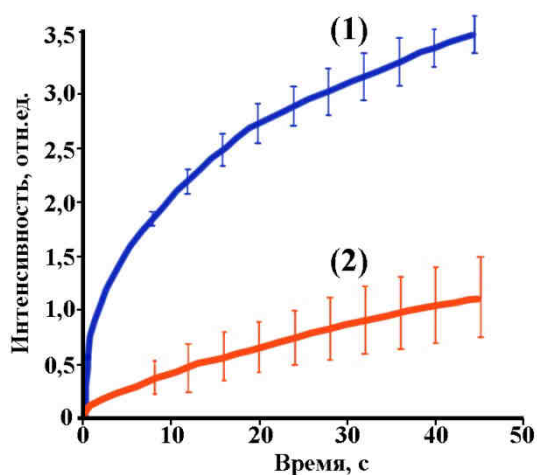


Рисунок 47. Динамика прошедшего ИК лазерного излучения с $\lambda = 1,56$ мкм через образцы реберного хряща толщиной 1 мм. (1) – хрящ без наночастиц, (2) – хрящ, импрегнированный наночастицами Fe_3O_4 .

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.48).

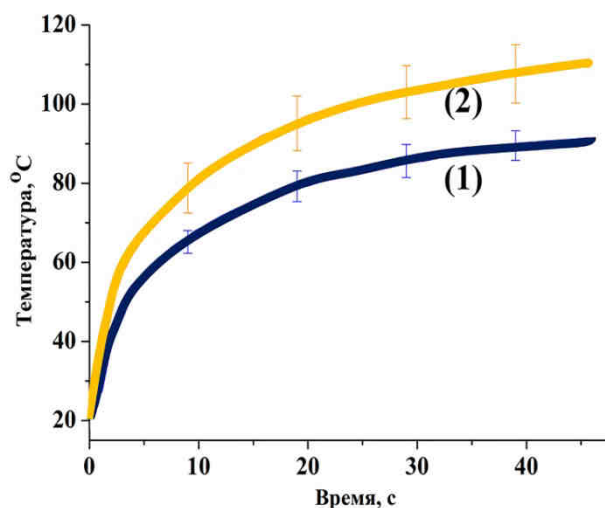


Рисунок 48. Динамика максимальной температуры поверхности реберного хряща при воздействии лазерного излучения с $\lambda = 1,56$ мкм. (1) – хрящ без наночастиц, (2) – хрящ, импрегнированный наночастицами Fe_3O_4 .

Таким образом, температура, необходимая для достижения полезного эффекта, при введении наночастиц магнетита может быть достигнута при использовании

меньшей мощности лазерного воздействия. Поскольку, как было продемонстрировано, наночастицы преимущественно входят в участки ткани, содержащие повреждения различной степени, введение наночастиц является перспективным для осуществления селективного лазерного воздействия на поврежденную ткань при снижении возможного негативного действия на соседние неповрежденные области хряща.

4.4. Выводы по результатам Главы 4

1. В выбранном режиме модификации изменения структуры, вызванные лазерным воздействием, происходят локально в области, прилегающей к облученной поверхности, не затрагивая средний и более удаленные слои хрящевой ткани. Область структурных изменений является диффузной и не имеет четких границ.

2. Клеточные изменения заключаются в увеличении числа клеток с пикнозом, рексисом и лизисом ядер, а также наличии бесклеточных областей.

3. Изменения структуры матрикса заключаются в снижении содержания кислых гликозаминогликанов и нарушении структуры коллагена на уровне его микроорганизации (границ фибрилл и их периодичности). Общее содержание коллагена в облученном хряще не изменяется.

4. Основные лазерно-индуцированные изменения структуры матрикса для исследуемых лазерных параметров происходят в территориальном матриксе и проявляются в увеличении его электронной прозрачности, образовании сферических пустот, напоминающих газовые пузырьки, а также концентрировании на границе клеток и территориального матрикса импрегнированных наночастиц.

5. Импрегнация наночастиц магнетита в исследуемой концентрации не вызывает дополнительных изменений клеток и матрикса хряща. Основной причиной структурных изменений является термо-механический эффект лазерного воздействия.

6. Размер и концентрация импрегнированных наночастиц зависят от состояния микроструктуры хрящевой ткани и наличия дефектов: наночастицы преимущественно входят в дефекты хряща. Таким образом, наночастицы могут быть использованы для диагностики состояния микроструктуры хряща на ранних стадиях его деградации.

7. Наночастицы магнетита позволяют управлять поглощением ИК-излучения хрящевой тканью, повышая интенсивность поглощения и скорость нагрева, что может быть использовано для селективного воздействия на поврежденные области хряща при снижении общей мощности лазерного воздействия.

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°C и окислению водные дисперсии наночастиц магнетита с распределением 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 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. Leclere F.M., Petropoulos I., Mordon S. Laser-assisted cartilage reshaping (LACR) for treating ear protrusions: A clinical study in 24 patients. // *Aesthetic Plast. Surg.* 2010. V.34. №2. P.141–146.
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. Павлова В.Н., Копьева Т.Т., Слуцкий Л.И., Павлов Г.Г. Хрящ. М.: Медицина, 1988. С.318.
7. Афанасьев Ю. И., Юрина Н. А., Котовский Е. Ф.. Гистология. 5-е изд., перераб. и доп., М.: Медицина, 2002; 744 с.
8. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., Биологическая химия. М: Медицина. 2008. С. 661 - 670.
9. Gelse K., Pöschl E., Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003; V.55, P.1531– 1546.
10. Баграташвили В.Н., Соболев Э.Н., Шехтер А.Б. Лазерная инженерия хрящей. М.: ФИЗМАТЛИТ. 2006. 488 с.
11. Rich A., Crick F. H. C. The Molecular Structure of Collagen. // *J. Mol. Biol.* 1961, V.3, P.483-506.
12. Mayne R., Cartilage collagens—what is their function, and are they involved in articular disease? // *Arthritis Rheum.* 1989. V.32. №3. P.241– 246.

13. Mendler M., Eich-Bender S.G., Vaughan L., Winterhalter K.H., Bruckner P., Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX and XI. // *J. Cell Biol.* 1989. V.108. P.191–197.
14. K. Kühn, The collagen family-variations in the molecular and supermolecular structure. // *Rheumatology.* 1986. V.10. P.29–69.
15. Hulmes D.J., Miller A., Molecular packing in collagen. // *Nature.* 1981. V.293. P. 234–239.
16. Hardingham T.E., Fosang A.J. Proteoglycans: many forms and many functions. // *FASEB J.* 1992. V.6. P.861-870.
17. Hardingham T.E., Muir H. The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. // *Biochim. Biophys. Acta* 1972. V.279. P.401-405.
18. Watanabe H., Yamada Y., Kimata K. Roles of Aggrecan, a Large Chondroitin Sulfate Proteoglycan, in Cartilage Structure and Function. // *J. Biochem.* 1998. V.124. P.687-693.
19. Knudson Ch.B., Knudson W. Cartilage proteoglycans. // *Cell & Developmental Biology.* 2001. V.12. P.69–78.
20. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань. М.: Медицина, 1981. С.312.
21. Stacey M., Duttac D., Caod W., Asmara A., Elsayed-Alid H., Kelly Jr. R., Beskok A. Atomic force microscopy characterization of collagen ‘nanostraws’ in human costal cartilage. // *Micron.* 2013. V.44. P.483–487.
22. Wolf A.D., Pflieger B. Burden of Major Musculoskeletal Conditions. Policy and Practice. Special Theme-Bone and Joint Decade 2000-2010. // *Bulletin of the World Health Organization.* 2003. V.81. №9. P.646-656.
23. Heinegard D., Saxne T., The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2011. V.7. №1. P.50 - 56.
24. 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.
25. Ytrehus B., Carlson C.S., Ekman S. 2007. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. // *Vet. Pathol.* V.44. №4. 429–448.

26. Silman A.J., Pearson J.E., Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. // *Arthritis Res.* 2002. V.4. P.265 – 272.
27. Pye S.R., Reid D.M., Smith R., Adams J.E., Nelson K., Silman A.J. Radiographic features of lumbar disc degeneration and self-reported back pain. // *J. Rheumatol.* 2004. V.31. №4. P.753 – 758.
28. Nouraei S.A.R., Ma E., Patel A., Howard D.J., Sandhu G.S. Estimating the population incidence of adult postintubation laryngotracheal stenosis. // *Clin. Otolaryngol.* 2007. V.32. P.411 - 412.
29. Luyten F.P., Vanlauwe J. Tissue engineering approaches for osteoarthritis. // *Bone.* 2012. V.51. P.289 –296.
30. Ovchinnikov Y., Sobol E., Svistushkin V., Shekhter A., Bagratashvili V., Sviridov A. Laser septochondrocorrection. // *Arch. Facial Plast. Surg.* 2002. V.4. №3. P.180-185.
31. Ragab A. Carbon dioxide laser-assisted cartilage reshaping otoplasty: a new technique for prominent ears. // *Laryngoscope.* 2010.V.120. №7. P.1312-1318.
32. Foulad A., Ghasri P., Garg R., Wong B. Stabilization of costal cartilage graft warping using infrared laser irradiation in a porcine model. // *Arch. Facial. Plast. Surg.* 2010. V.12. P.405–411.
33. Sviridov A.P., Zakharkina O.L., Ignatieva N.Y., Vorobieva N.N., Bagratashvili N.V., Plyakin V.A., Kulik I.O., Sarukhanyan O.O., Minaev V.P., Lunin V.V. Ex vivo laser thermoplasty of whole costal cartilages. // *Lasers Surg. Med.* 2014. V.46. № 4. P.302-309
34. Moon B.J., Lee H.J., Jang Y.J. Outcomes following rhinoplasty using autologous costal cartilage. // *Arch. Facial Plast. Surg.* 2012. V.14. №3. P.175-180.
35. Bagratashvili V.N., Sobol E.N., Sviridov A.P., Omelchenko A.I., Popov V.K. Thermal and diffusion processes in laser-induced stress relaxation and reshaping of cartilage. // *J. Biomech.* 1997. V.30. P.813–817.
36. 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.

37. Sobol E., Omelchenko A., Mertig M., Pompe W. Scanning Force Microscopy of the Fine Structure of Cartilage Irradiated with a CO₂ Laser. // *Lasers Med. Sci.* 2000. V.15, №1. P.15-23.
38. Ho K.H., Diaz Valdes S.H., Protsenko D.E., Aguilar G., Wong B.J.F. Electromechanical reshaping of septal cartilage. // *Laryngoscope.* 2003. V.113, №11. P.1916-1921.
39. Badran K., Manuel C., Waki C., Protsenko D., Wong B.J.F. Ex Vivo Electromechanical Reshaping of Costal Cartilage in the New Zealand White Rabbit Model. // *Laryngoscope.* 2013. V.123. №5. P.1143–1148.
40. Thomas L. Reversible collapse of rabbit ears after intravenous papain, and prevention of recovery by cortisone. // *J. Exp. Med.* 1956. V.104. №2. P.245-252.
41. Keefe M.W., Rasouli A., Telenkov S.A., Karamzadeh A.M., Milner T.E., Crumley R.L., Wong B.J.F. Radiofrequency cartilage reshaping: efficacy, biophysical measurements, and tissue viability. // *Arch. Facial. Plast. Surg.* 2003. V.5. №1. P.46-52.
42. Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. Изд. Саратовского ун-та. Саратов. 1998. 477 с.
43. Баграташвили В.Н., Баграташвили Н.В., Гапонцев В.П., Махмутова Г.Ш., Минаев В.П., Омельченко А.И., Самарцев И.Э., Свиридов А.П., Соболев Э.Н., Цыпина С.И. Изменение оптических свойств гиалинового хряща при нагреве лазерным излучением ближнего ИК диапазона. // *Квантовая Электроника.* 2001. Т.31. №6. С.534-538.
44. Domb A.J., Kost J., Wiseman D. Handbook of Biodegradable Polymers. CRC Press. 1998. P. 321 – 326.
45. Аверкиев С.В., Игнатъева Н.Ю., Соболев Э.Н., Лунин В.В., Баграташвили В.Н. Диагностика состояния соединительных тканей при ИК-лазерном воздействии с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния. // *Вестн. Моск. Ун-та. сер. 2. Химия.* 2005. Т. 46. № 1. С. 24 – 28.
46. Bagratashvili N.V., Sviridov A.P., Sobol E.N., Kitai M.S. Optical properties of nasal septum cartilage. // *Proc. SPIE.* 1998. V.3254. Laser-Tissue Interaction IX. P.398. doi:10.1117/12.308189.

47. Южаков А.В., Свиридов А.П., Щербаков Е.М., Баум О.И., Соболев Э.Н. Оптические свойства реберного хряща и их изменения в процессе неразрушающего воздействия лазерного излучения с длиной волны 1.56 мкм. // Квантовая Электроника. 2014. Т.44. № 1. С.65-68.
48. Welch A.J., Martin J.C. van Gemert. Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue. Eds. Springer Science & Business Media. 2011. P.8.
49. Züger B.J., Frenz M., Mainil-Varlet P., Schaffner T., Clémence J.-F., Weber H.P. Cartilage Damage Induced by Er:YAG Laser and Mechanical Instruments. // Laser Physics. 2003. V.13, №1. P.58–64.
50. Sviridov A.P., Sobol E.N., Jones N., Lowe J. Effect of holmium laser radiation on stress, temperature and structure in cartilage. // Lasers in Med. Sci. 1998. V.13. P.73–78.
51. Wong B.J.F., Milner T.E., Harrington A.; Ro J.; Dao X., Sobol E.N., Nelson J.S. Feedback-Controlled Laser-Mediated Cartilage Reshaping. // Arch. Facial Plast. Surg. 1999. V.1. P. 282-287.
52. Heath C. The effect of physical forces on cartilage tissue engineering. // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 2000. V.17. P.533–551.
53. Sobol E., Shekhter A., Baskov A., Baskov V., Baum O., Borchshenko I., Golubev V., Guller A., Kolyshchev I., Omeltchenko A., Sviridov A., Zakharkina O. Regeneration of spine disc and joint cartilages under temporal and space modulated laser radiation. // Proc. of SPIE. 2009. V.7179. P. 71790B-1 - 71790B-7.
54. Choi J.Y., Tanenbaum B.S., Milner T.E., Dao X.V., Nelson J.S., Sobol E.N., Wong B.J. Thermal, mechanical, optical, and morphologic changes in bovine nucleus pulposus induced by Nd:YAG ($\lambda = 1.32$ microm) laser irradiation. // Lasers Surg. Med. 2001. V.28. №3. P.248-254.
55. Sobol E., Shekhter A., Baskov A., Zakharkina O. Laser regeneration of intervertebral discs. // Book of International Cartilage repair Society. 2006. P-4-39.
56. Klarlund M., Ostergaard M., Jensen K.E., Madsen J.L., Skjoldt H. Magnetic resonance imaging, radiography, and scintigraphy of the finger joints: one year follow up of patients with early arthritis. The TIRA Group. // Ann. Rheum. Dis. 2000. V.59. P.521–528.

57. Shyu J.J., Chan C.H., Hsiung M.W., Yang P.N., Chen H.W. Diagnosis of articular cartilage damage by polarization sensitive optical coherence tomography and the extracted optical properties. // Prog. Electromagn. Res. PIER. 2009. V.91. P.365–376.
58. Murthy Sh.K. Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. // Int. J. Nanomedicine. 2007. V.2. №2. P.129–141.
59. Simon G.H., Vopelius-Feldt J., Wendland M.F. Fu Y., Piontek G., Schlegel J., Chen M-H., Daldrup-Link H.E. MRI of Arthritis: Comparison of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide vs. Gd-DTPA. // J. Magn. Reson. Im. 2006. V.23. P.720–727.
60. Corot C., Robert P., Idée J.-M., Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2006. V.58. P.1471–1504.
61. Sun C., Lee J.S.H., Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. // Adv. Drug Deliver. Rev. 2008. V.60. P.1252–1265.
62. Dai F., Du M., Liu Y., Liu G., Liu Q., Zhang X.. Folic acid-conjugated glucose and dextran coated iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents for diagnosis and treatment response of rheumatoid arthritis. // J. Mater. Chem. B. 2008. V.2. P.2240-2247.
63. Луппа Х. Основы гистохимии. Изд. «Мир». Москва. 1980. 344 с.
64. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А.. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. Изд. Наука. Санкт-Петербург. 1994. 399 с.
65. Миронов А.А. Электронная микроскопия клеток и тканей: замораживание - скалывание – травление. Изд. Наука. Ленингр. отд-ние. 1990. 140 с.
66. Яминский И.В. Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров. М.: Научный мир. 1997. 87 с.
67. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. Н.Новгород.: ИФМ РАН. 2004. С. 62 – 87.
68. Галлямов М.О., Яминский И.В. Сканирующая зондовая микроскопия нуклеиновых кислот. Изд. Центр Перспективных Технологий. 1998. С.3.
69. Lin H., Grodzinsky A.J., Ortiz C. Nanomechanics of the Cartilage Extracellular Matrix. // Annu. Rev. Mater. Res. 2011. V.41. P.133–68.

70. Rigozzi S., Stemmer A., Müller R., Snedeker J.G. Mechanical response of individual collagen fibrils in loaded tendon as measured by atomic force microscopy. // *J. Struct. Biol.* 2011. V.176. P.9–15.
71. Ng L., Grodzinsky A.J., Patwari P., Sandy J., Plaas A., Ortiz C. Individual cartilage aggrecan macromolecules and their constituent glycosaminoglycans visualized via atomic force microscopy. // *J. Struct. Biol.* 2003. V.143. P.242–257.
72. Knudson C.B., Knudson W. Cartilage Proteoglycans. // *Cell & Develop. Biol.* 2001. V.12. P.69–78.
73. Theocharis D.A., Tsiganos C.P. Age-related changes of proteoglycan subunits from sheep nasal cartilage. // *Int. J. Biochem.* 1985. V.17. № 4. P.479-484.
74. Höhne G.W.H., Hemminger W.F., Flammersheim H.J. Differential Scanning Calorimetry: An Introduction for Practitioners. // Berlin: Springer-Verlag GmbH. 2003. 222 p.
75. Yurchenco P.D., Birk D.E., Mecham R.P. Extracellular matrix assembly and structure. Academic Press San Diego CA. 1990. P 351–388.
76. Ignatieva N.Yu., Lunin V.V., Averkiev S.V., Maiorova A.F., Bagratashvili V.N., Sobol E.N. DSC investigation of connective tissues treated by IR-laser radiation. // *Thermochimica Acta.* 2004. V.422. P.43–48.
77. Szanto Z., Kovacs G., Nagya V., Roth E., Molnar T.F., Horvath P. Differential scanning calorimetric examination of the tracheal cartilage after primary reconstruction with differential suturing techniques. // *Thermochimica Acta.* 2006. V.445. P.190–194.
78. Ignatyeva N.Yu., Sobol E.N., Lunin V.V., Averkiev S.V., Bagratashvili V.N., Sviridov A.P., Korobov M.V. Modification of collagen-containing tissues by IR laser radiation. // *Laser Physics.* 2003. V. 13. №. 1. P. 52–57.
79. Ignatyeva N.Yu, Averkiev S.V., Sobol E.N., Lunin V.V. Denaturation of Collagen II in a Cartilaginous Tissue during Its Thermal and Laser Heating. // *Russian Journal of Physical Chemistry.* 2005. V. 79, №. 8. P. 1333–1340.
80. Murthy Sh.K.. Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. // *Int. J. Nanomedicine.* 2007. V.2. №2. P.129–141.

81. Zhang L., Gu F.X., Chan J.M., Wang A.Z., Langer R.S., Farokhzad O.C. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2008. V.83. P.761 - 769.
82. McGloin D., Optical tweezers: 20 years on. // *Phil. Trans. R. Soc. A*. 2006. V.364. P.3521 - 3537.
83. Ankamwar B., Lai T.C., Huang J.H. Liu R.S., Hsiao M., Chen C.H., Hwu Y.K. Biocompatibility of Fe₃O₄ nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells. // *Nanotechnology*. 2010. V.21. P.075102.
84. CenterWatch. Retrieved 2012-06-20. Newly Approved Drug Therapies (105) GastroMARK, Advanced Magnetics. 2012. <https://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/drug/105/gastromark>.
85. Corot C., Robert P., Idée J-M, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. // *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2006. V.58. P.1471–1504.
86. Markides H. Kehoe O., Morris R.H., El Haj A.J., Whole body tracking of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-labelled cells – a rheumatoidarthritis mouse model. // *Stem Cell Research & Therapy*. 2013. V.4. P.126.
87. Oh J., Feldman M.D., Kim J., Condit C., Emelianov S., Milner T., Detection of magnetic nanoparticles in tissue using magnetomotive ultrasound. // *Nanotechnology*. 2006. V.17. P.4183 - 4190.
88. Pankhurst Q. A., Connolly J., Jones S. K., Dobson J., Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003. V.36. P. R167 - 197.
89. Krishnan K.M., Biomedical nanomagnetism: A Spin through possibilities in Imaging, diagnostics and therapy. // *IEEE Transactions on Magnetics*. 2010. V.46. № 7. P.2523 - 2557.
90. Markides H., Rotherham M., El Haj A.J., Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine. // *J. Nanomater.* 2012. ID 614094.
91. Mahmoudi M., Simchi A., Imani M., Shokrgozar M.A., Milani A.S., Häfeli U.O., Stroeve P., A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. // *Colloids and Surfaces B*. 2010. V.75. №1. P.300–309.

92. Rothenfluh D.A., Bermudez H., O'Neil C.P., Hubell J.A., Biofunctional polymer nanoparticles for intra-articular targeting and retention in cartilage. // *Nat Materials*. 2008. V.7. P.248-254.
93. Freedman J.D., Lusic H., Snyder B.D., Grinstaff M.W., Tantalum oxide nanoparticles for the imaging of articular cartilage using X-ray computed tomography: visualization of ex vivo/in vivo murine tibia and ex vivo human index finger cartilage. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. V.53. №32. P.8406-8410.
94. Bourrinet P., Bengele H., Bonnemain B., Dencausse A., Idée J.M., Jacobs P., Lewis J., Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10 an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. // *Invest. Radiol.* 2006. V.413. P.313–324.
95. Schulze E., Ferrucci Jr.J.T., Poss K., Lapointe L., Bogdanova A., Weissleder R., Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro. // *Invest. Radiol.* 1995. V.30. P.604–610.
96. Никифорова Т.Е., Омельченко А.И., Соболев Э.Н., Магнитолазерное управление распределением ферромагнитных наночастиц в гидратированных тканях и гелях. // *Перспективные материалы*. 2008. Т.6. №1. С.450-453.
97. Афонькин В.Ю., Добрецов К.Г., Кириченко А.К., Ладыгина В.П., Сипкин А.В., Стимуляция проникновения магнитных наночастиц в хрящевую и костную ткань с помощью градиента магнитного поля. // *Сибирское медицинское обозрение*. 2008. Т.50. №2. С.37-39.
98. Baum O. I., Golubev V.V., Omelchenko A.I., Sobol E.N., Shekhter A.B., Advance of magnetic nanoparticles application in laser diagnostics and healing of cartilage damage. In: 3th Eurasian congress on medical physics and engineering. 2010. V.3. P.222 - 224.
99. Thanh N.T.K.; Green, L.A.W., Functionalization of nanoparticles for biomedical applications. // *Nano Today*. 2010. V.5. P.213—230.
100. Sun X. Zheng Ch., Zhang F., Yang Ya., Wu G., Yu A., Size-Controlled Synthesis of Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles Coated with Glucose and Gluconic Acid from a Single Fe (III) Precursor by a Sucrose Bifunctional Hydrothermal Method. // *J. Phys. Chem. C*. 2009. V.113. P.16002–16008.

101. Iida H., Takayanagi K., Nakanishi K., Osaka T., Synthesis of Fe_3O_4 nanoparticles with various sizes and magnetic properties by controlled hydrolysis. // *J. Colloid. Interf. Sci.* 2007. V.314. P.274–280.
102. Babes L., Denizot B., Tanguy G., Le Jeune J.J., Jallet P., Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents: A Parametric Study. // *J. Colloid. Interf. Sci.* 1999. V.212. P.474 – 482.
103. Bomati-Miguel O., Miguel-Sancho N., Abasolo I., Candiota A.P., Roca A.J., Acosta M., Schwartz Jr., S., Arus C., Marquina C., Martinez G., Santamaria J., Ex vivo assessment of polyol coated-iron oxide nanoparticles for MRI diagnosis applications: toxicological and MRI contrast enhancement effects. // *J. Nanopart. Res.* 2014. V.16. P.2292.
104. Wan Sh., Huang J., Yan H., Liu K., Size-controlled preparation of magnetite nanoparticles in the presence of graft copolymers. // *J. Mater. Chem.* 2005. V.16. P.298–303.
105. Daniel-Da-Silva A.L. Trindade T., Biofunctional Composites of Polysaccharides Containing Inorganic Nanoparticles. // Dr. Abbass Hashim (Ed.). *Advances in Nanocomposite Technology*. ISBN: 978 – 953 – 307 – 347 – 7. InTech. P. 275 - 297.
106. Jiang J.-S., Gan Zh.-F., Yang Y., Du B., Qian M., Zhang P., A novel magnetic fluid based on starch-coated magnetite nanoparticles functionalized with homing peptide. // *J. Nanopart. Res.* 2009. V.11. P.1321 – 1330.
107. Lin M.M., Li Sh., Kim H.-H., Kim H., Lee H.B., Muhammed M., Kim D.K., Complete separation of magnetic nanoparticles via chemical cleavage of dextran by ethylenediamine for intracellular uptake. // *J. Mater. Chem.* 2010. V.20. P.444 – 447.
108. Chin A.B., Yaacob I.I., Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure. // *J. Mater. Process. Tech.* 2007. V.191 (1-3). P.235 – 237.
109. Abu Mukh-Qasem R., Gedanken A.. Sonochemical synthesis of stable hydrosol of Fe_3O_4 nanoparticles, // *J. Colloid. Interf. Sci.* 2005. V.284. P.489 – 494.

110. Amendola V., Meneghetti M., What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution? // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013. V.15. P.3027 - 3046.
111. Narayanan K.B., Sakthivel N., Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. // *Adv. Coll. Interf. Sci.* 2010. V.156. P.1–13.
112. Liu J., Zhang Y., Yang T., Ge Y., Zhang S., Chen Z., Gu N., Synthesis, Characterization, and Application of Composite Alginate Microspheres with Magnetic and Fluorescent Functionalities. // *J. Appl. Pol. Sci.* 2009. V.113. P.4042–4051.
113. Kim D.K., Mikhaylova M., Wang F.H., Kehr J., Bjelke B., Zhang Y., Tsakalacos T., Muhammed M., Starch-Coated Superparamagnetic Nanoparticles as MR Contrast Agents. // *Chem. Mater.* 2003. V.15. P.4343-4351.
114. Сердюк Е.Н., Евсева О.Н., Новые возможности аналитического ультрацентрифугирования для анализа гидродинамических свойств белков. // *Успехи биологической химии.* 2006. Т.46. С.349 – 372.
115. Philo J.S., Is Any Measurement Method Optimal for All Aggregate Sizes and Types? // *The AAPS Journal.* 2006. V.8. №3. Article 65.
116. Berne B.J., Pecora R., *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics.* // Courier Dover Publications. 2000. P.11 – 18.
117. 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.
118. Sobol E., Shekhter A., Guller A., Baum O., Baskov A., Laser-induced regeneration of cartilage // *J. Biomed. Opt.* 2011. V.16. №8. P.080902.
119. 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.
120. Лыков А.В. *Тепломассообмен.* М.: Энергия, 1978. 480 С.

121. 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.