

Применение индоцианина зеленого в составе нанокompозитных припоев для повышения прочности и однородности швов при лазерной сварке сухожилий

Аннотация

Продемонстрирована возможность формирования швов бычьего сухожилия с помощью макета аппарата для лазерной сварки биотканей. Предложены новые составы припоя на основе углеродных нанотрубок (0,1 % мас.) в водной матрице бычьего сыровороточного альбумина (25 % мас.) с добавлением медицинского лазерного красителя индоцианина зеленого в концентрации 0,01 % мас. Максимум поглощения составов нанокompозитного припоя совпал с длиной волны аппарата 800 нм. Использование индоцианина зеленого в качестве абсорбера излучения в составе нанокompозитных припоев позволило повысить прочность лазерных сварных швов сухожилия. Максимальное значение достигнуто при использовании припоя на основе многостенных углеродных нанотрубок ~ 0,82 МПа. Рентгеновская микротомография швов позволила доказать равномерность соединения сухожилия по глубине и длине при образовании нанокompозита между двумя сваренными фрагментами биоткани. Продемонстрирован рост клеток фибробластов на поверхности композита, сформированного в области лазерного сварного шва.

Введение

Разрыв или частичное нарушение целостности биоткани различного типа являются частым явлением при проведении хирургической операции или получении травмы. Для восстановления структуры биоткани важно получить прочное и герметичное тканевое соединение. Это особенно важно, если биоткань практически не снабжается кровью и обладает чрезвычайно медленным процессом регенерации (связки, хрящи, сухожилия).

Травмы и растяжения сухожилий являются частой проблемой у пациентов из разных возрастных групп. Данный тип биоткани имеет уникальную структуру и состоит из плотно прилегающих коллагеновых волокон, способных выдерживать значительные нагрузки при растяжении за счет скольжения между собой. Для достижения лучших результатов восстановления структуры сухожилия необходимо его активное движение, однако это может привести к повторному повреждению. Поэтому при формировании соединения важно сохранение его способности выдерживать значительные прочностные нагрузки при растяжении и гладко проскальзывать через окружающие ткани без какого-либо противодействия. Это можно осуществить за счет формирования лазерного сварного соединения разорванных волокон сухожилия при минимизации шовного рубцевания [1].

Тепловой нагрев, индуцированный лазерным излучением, дает возможность склеивать ткани без образования рубца, при этом не контактируя с ними. При правильно подобранных

параметрах лазера (длина волны, мощность, длительность и пространственный профиль излучения) тепловой нагрев генерируется внутри самой ткани и вызывает коагуляцию коллагеновых волокон.

В работах [2], [3] показана перспективность влияния припоя, особенно содержащего наночастицы, наносимого на свариваемые лазером участки биотканей. Ранее было предложено использовать композитный припой на основе углеродных нанотрубок (УНТ) в белковой матрице [4], [5]. Для обеспечения равномерного нагрева свариваемой области биоткани в составе припоя используются медицинские лазерные красители, которые играют роль абсорбента излучения [6], [7]. Преимущество такого состава заключается в том, что при лазерном воздействии тепло индуцируется в припое, следовательно, нагрев ткани происходит за счет теплопроводности. Данный эффект позволяет избежать перегрева и некроза биоткани, приводя к увеличению прочности на разрыв и уменьшению рубцевания области лазерного сваривания.

Материалы и методы

Эксперименты по лазерной сварке биотканей проводились с использованием макета аппарата, который включал в себя блок питания и управления 1, термоконтроллерный блок 2, лазерную головку 3, систему подачи нанокompозитного припоя 4, персональный компьютер 5 (рис. 1а). На рис. 1б показано размещение шприца 6 системы подачи нанокompозитного припоя, благодаря чему осуществляется порционная подача припоя в область сваривания. Также на рисунке представлен

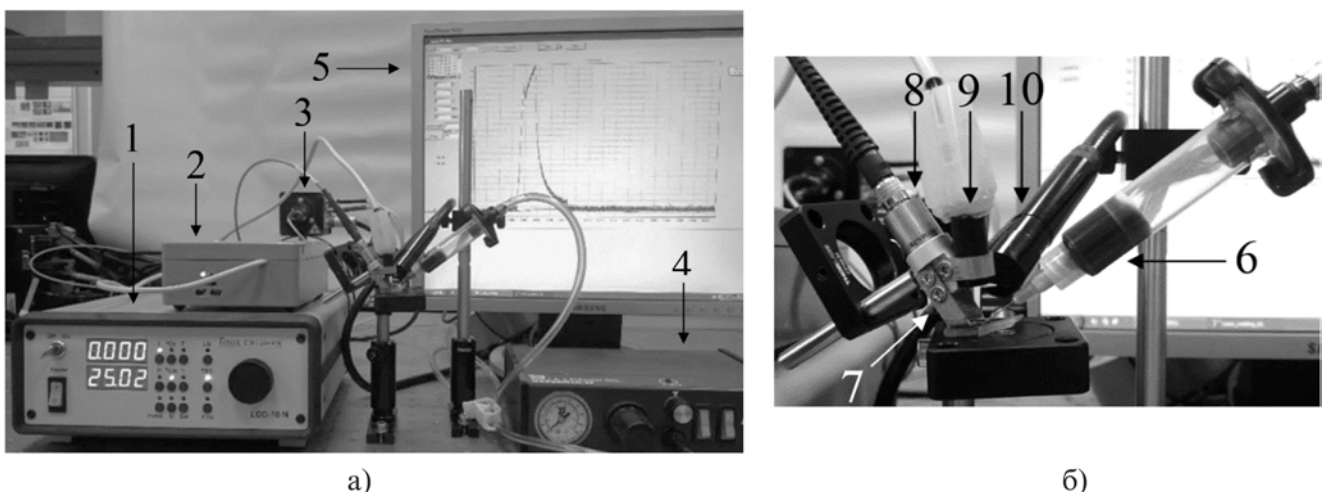


Рис. 1. Общий вид макета аппарата для лазерной сварки биотканей (а) и область лазерного воздействия на биоткань (б) (пояснения – в тексте)

сварочный карандаш 7, удерживающий коллиматор 8 и ИК-датчик 9. Между иглой шприца и сварочным карандашом на рис. 1б расположен видеомодуль 10.

Воздействие излучением на биоткань осуществлялось диодным лазером мощностью до 8 Вт и длиной волны генерации 808 нм. Температура области сварки определялась с помощью ИК-датчика. Мощность лазерного излучения динамически регулировалась в зависимости от данных о температуре от ИК-датчика с целью поддержания ее на необходимом уровне [3].

Для визуализации процесса сваривания тканей, помимо мониторинга процесса нагрева, который достаточно просто поддается автоматизации, необходим зрительный контроль области сварки. Это особенно актуально при работе с малыми размерами сварного шва и построении системы наведения лазерного пучка на шов с использованием технологии компьютерного зрения.

В экспериментах по лазерной сварке использовали пять составов нанокompозитного припоя (табл. 1). В качестве белковой матрицы для многостенных (МУНТ) и одностенных (ОУНТ) углеродных нанотрубок применяли бычий сывороточный альбумин (БСА). Абсорбентом лазерного излучения был выбран краситель индоцианин зеленый (ИЦЗ). Все составы припоев были растворены в дистиллированной воде.

Таблица 1

Концентрации компонентов нанокompозитных припоев

Компонент	Состав № 1, % мас.	Состав № 2, % мас.	Состав № 3, % мас.	Состав № 4, % мас.	Состав № 5, % мас.
БСА	25	25	25	25	25
МУНТ	–	–	–	0,1	0,1
ОУНТ	–	0,1	0,1	–	–
ИЦЗ	0,01	–	0,01	–	0,01

Для приготовления нанокompозитного припоя УНТ добавляли в дистиллированную воду и перемешивали в течение 40 мин магнитной мешалкой, затем полученную дисперсию подвергали обработке ультразвуковым гомогенизатором в течение 60 мин. После этого в дисперсию добавляли БСА в концентрации 25 % мас. и составы № 1, 3 и 5 перемешивали с ИЦЗ в концентрации 0,01 % мас. магнитной мешалкой в течение 25 мин и обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение такого же промежутка времени.

На рис. 2 представлены спектры поглощения припоев: состав – БСА (рис. 2а, кривая 1) в сравнении с составом № 1 – БСА/ИЦЗ (рис. 2а, кривая 2); состав № 2 – БСА/ОУНТ (рис. 2б, кривая 1) в сравнении с составом № 3 – БСА/ОУНТ/ИЦЗ (рис. 2б, кривая 2); состав № 4 – БСА/МУНТ (рис. 2в, кривая 1) в сравнении с составом № 5 – БСА/МУНТ/ИЦЗ (рис. 2в, кривая 2).

На спектрах поглощения всех составов припоев с красителем ИЦЗ присутствует его характерный пик с максимумом в районе длины волны 800 нм (рис. 2). Амплитуда пика поглощения веществ свидетельствует о влиянии поглощающих способностей ИЦЗ и УНТ в составе нанокompозитного припоя и увеличении его оптической плотности. Поскольку границы полосы поглощения ИЦЗ простираются от 600 до 840 нм, дан-

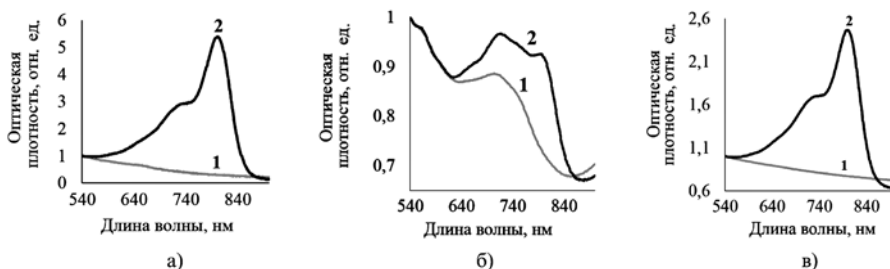


Рис. 2. Спектры поглощения составов припоев на основе БСА [(а), кривая 1], БСА/ИЦЗ [(а), кривая 2], БСА/ОУНТ [(б), кривая 1], БСА/ОУНТ/ИЦЗ [(б), кривая 2], БСА/МУНТ [(в), кривая 1], БСА/МУНТ/ИЦЗ [(в), кривая 2] (пояснения – в тексте)

ный краситель наиболее подходит для макета аппарата с длиной волны генерации 808 нм.

В качестве образца биоткани было выбрано бычье сухожилие, изъятное из лабораторного животного непосредственно перед экспериментом. Для формирования лазерных сварных швов биоткань нарезали на образцы в форме полосок размерами: ширина – 6...13 мм, длина – 20...25 мм, толщина – 0,8...2 мм (рис. 3).

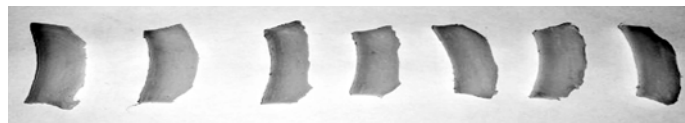


Рис. 3. Внешний вид экспериментальных образцов бычьего сухожилия

Образцы рассекали по центру для получения двух равных по площади фрагментов ткани. Следующим шагом являлось равномерное нанесение припоя на место будущего лазерного шва с помощью автоматизированного дозатора. Далее фрагменты ткани максимально плотно прижимали друг к другу, а так как для формирования лазерного сварного шва использовали поточечный метод, то введение состава припоя повторяли перед получением каждой последующей сварной точки.

Результаты

Одним из критериев удавшейся структуры лазерных сварных швов является равномерность их соединения по глубине и длине. На рис. 4 представлено изображение, полученное с помощью рентгеновского микротомографа «Bruker SkyScan 1174». Твердый нанокompозит, который образуется при лазерном испарении жидкостной составляющей припоя между двумя краями фрагментов биоткани, обладает меньшей оптической плотностью в рентгеновском диапазоне по сравнению с самой тканью. Это позволило оценить структуру сформированного сварного шва и наличие в нем несоединенных областей.

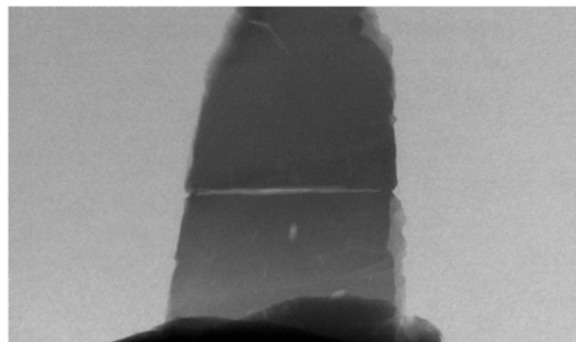


Рис. 4. Томограмма лазерного сварного шва бычьего сухожилия с использованием нанокompозитного припоя МУНТ/БСА/ИЦЗ

Наиболее равномерный лазерный сварной шов бычьего сухожилия с разрешением изображения 18 мкм был получен с использованием нанокompозитного припоя МУНТ/БСА/ИЦЗ (рис. 4). Сформированный между двумя краями лазерного сварного шва нанокompозит должен обеспечить прорастание биоткани при его биорезорбции в течение времени регенерации волокон сухожилия.

Для выяснения биосовместимости нанокompозита, сформированного в области лазерных сварных швов, были проведены исследования роста биологических клеток – фибробластов на поверхности образцов швов с помощью флуоресцентной микроскопии. Образцы обрабатывали дезинфицирующим раствором, высушивали и помещали в культуральный планшет. В качестве контрольных образцов выступал фрагмент ткани сухожилия без лазерного сварного шва. Перед началом эксперимента образцы стерилизовали УФ-излучением с обеих сторон в течение 1 ч, затем помещали в лунки планшета, в которые добавляли суспензию фибробластов в культуральной среде с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой. Далее планшет помещали в CO₂-термостат при температуре 37 °C на 48 ч. После инкубации в термостате образцы промывали культуральной средой, а клетки фиксировали 10%-ным водным раствором формалина. Затем образцы окрашивали раствором флуоресцентного органического красителя акридинового оранжевого с концентрацией 0,1 мг/мл в цитратно-фосфатном буфере (pH = 5) в течение 10 мин.

Приготовленные препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа «Olympus BX43» с длиной волны возбуждения 280 нм. Неоднородная структура образцов делала невозможным фокусировку объектива микроскопа на всей площади объекта, поэтому проводилось послышное изучение структуры швов с помощью инструментов программы *FISHView System*. На рис. 5 представлены флуоресцентные микроизображения сформированного лазерного сварного шва с использованием состава припоя на основе МУНТ (рис. 5а) и ОУНТ (рис. 5б) с окрашенными клетками в виде светлых участков. Краситель акридиновый оранжевый накапливался в ядрах фибробластов, окрашивая цитоплазму крайне незначительно.

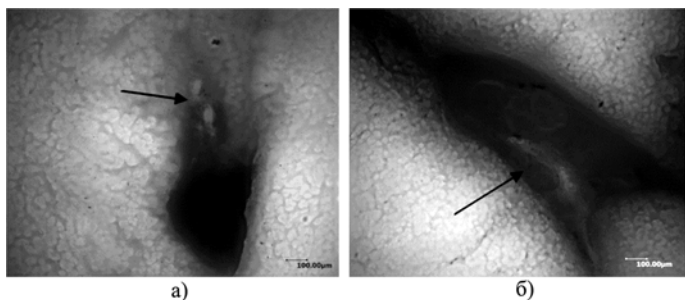


Рис. 5. Флуоресцентные микроизображения лазерного сварного шва с использованием составов нанокompозитного припоя МУНТ/БСА (а) и ОУНТ/БСА (б) с окрашенными ядрами фибробластов (указаны стрелками)

Данные исследования подтвердили рост фибробластов на образцах лазерных сварных швов через 48 ч их инкубации, что указывает на биосовместимость нанокompозитов, образованных лазерным аппаратом между двумя фрагментами сухожилия.

Для вычисления прочности на разрыв лазерных сварных швов определяли их площадь поперечного сечения и разрывную силу с использованием электронного динамометра. По этим данным вычисляли значение прочности на разрыв, а затем его среднее значение для каждого состава припоя. Полученные значения приведены в табл. 2.

Сравнение прочности лазерных сварных швов с различным составом припоя позволяет сделать ряд выводов о влиянии состава припоя при лазерном сваривании бычьего сухожилия. В условиях эксперимента прочность швов, полученных с водно-альбуминовым припоем на основе МУНТ, в несколько раз

выше, чем в случае применения аналогичного припоя на основе ОУНТ. Та же закономерность наблюдается и при добавлении красителя ИЦЗ в указанные выше составы припоя. Прочность лазерных швов, полученных с водно-альбуминовым припоем без нанотрубок, оказалась ниже, чем при использовании водно-альбуминового припоя на основе МУНТ, но несколько выше, чем в случае применения водно-альбуминового припоя с ОУНТ.

Заключение

В статье приведены результаты получения швов бычьего сухожилия с помощью макета аппарата для лазерной сварки биотканей. Аппарат генерировал излучение с длиной волны 808 нм и мощностью до 8,5 Вт и позволял осуществлять визуализацию и мониторинг температуры при формировании лазерного сварного шва, а также имел систему подачи припоя в область сваривания. В качестве припоя предложено использовать углеродные нанотрубки (концентрация 0,1 % мас.) в водной матрице бычьего сывороточного альбумина (концентрация 25 % мас.) с добавлением медицинского лазерного красителя индоцианина зеленого в концентрации 0,01 % мас. Спектры поглощения полученных составов нанокompозитных припоев имели выраженный пик ИЦЗ в области 800 нм. Использование красителя в качестве абсорбера лазерного излучения в составе нанокompозитных припоев на основе МУНТ, ОУНТ и БСА позволило повысить прочность лазерных сварных швов бычьего сухожилия. Этот эффект, вероятнее всего, достигался за счет увеличения оптической плотности составов и передачи теплового нагрева, индуцированного в припое биоткани. Наивысшим значением прочности на разрыв обладали лазерные сварные швы, сформированные при использовании припоя на основе БСА/МУНТ/ИЦЗ, значения прочности составили ~ 0,82 МПа.

Исследование структуры лазерных сварных швов с помощью рентгеновской микротомографии указало на ровные границы и равномерность соединения сухожилия по глубине и длине при образовании нанокompозита между двумя фрагментами биоткани. Таким образом, можно сделать вывод о низкой вероятности появления рубца при лазерном сваривании живых объектов.

Показана биосовместимость композита, сформированного на основе обоих типов УНТ в области лазерного сварного шва путем роста клеток соединительной ткани фибробластов на его поверхности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение 14.575.21.0044, RFMEFI57514X0044). Авторы выражают благодарность коллегам Н.Н. Журбиной, У.Е. Куриловой, М.В. Мезенцевой и И.А. Суетиной за помощь в проведении клеточных исследований.

Список литературы:

1. Tarek F. El-Wakil, El-kharbotly A., Hossam Hussien. Tendon Repair by Suturing Vs Carbon Dioxide Laser Welding: An in-Vivo Study in Rabbits // Egyptian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery. 2003. Vol. 27. № 2. PP. 295-303.
2. Schöni D.S. et al. Nanoshell assisted laser soldering of vascular tissue // Lasers in surgery and medicine. 2011. Vol. 43. № 10. PP. 975-983.
3. Nourbakhsh M.S., Khosroshahi M.E. An in-vitro investigation of skin tissue soldering using gold nanoshells and diode laser // Lasers in medical science. 2011. Vol. 26. № 1. PP. 49-55.

Таблица 2

Значения прочности образцов на разрыв

Состав	Состав 1 (БСА/ИЦЗ)	Состав 2 (ОУНТ/БСА)	Состав 3 (ОУНТ/БСА/ИЦЗ)	Состав 4 (МУНТ/БСА)	Состав 5 (МУНТ/БСА/ИЦЗ)
Прочность на разрыв, МПа	0,54 ± 0,15	0,14 ± 0,06	0,38 ± 0,01	0,4 ± 0,16	0,82 ± 0,3

4. Gerasimenko A. Yu., Gubarkov O. V., Ichkitidze L. P., Podgaetskii V. M., Selishchev S. V., Ponomareva O. V. Nanocomposite solder for laser welding of biological tissues // *Semiconductors*. 2011. Vol. 45. № 13. PP. 93-98.
5. Gerasimenko A. Yu., Ichkitidze L. P., Pavlov A. A., Piyankov E. S., Ryabkin D. I., Savelyev M. S., Selishchev S. V., Rimshan I. B., Zhurbina N. N., Podgaetskii V. M. Laser System with Adaptive Thermal Stabilization for Welding of Biological Tissues // *Biomedical Engineering*. 2016. Vol. 49. № 6. PP. 344-348.
6. Rossi F., Pini R., Menabuoni L. Experimental and model analysis on the temperature dynamics during diode laser welding of the cornea // *Journal of Biomedical Optics*. 2007. Vol. 12. № 1. PP. 014031-014031-7.
7. Zajac A. et al. Procedures of optical control dedicated for laser welding process of biological tissues // *Opto-Electronics Review*. 2010. Vol. 18. № 1. PP. 48-55.

Александр Юрьевич Герасименко,
канд. физ.-мат. наук, доцент,
ст. научный сотрудник,
Леван Павлович Ичкитидзе,
канд. физ.-мат. наук, ст. научный сотрудник,
Евгений Сергеевич Пьянков,
канд. техн. наук, ведущий инженер,
Иван Владимирович Пьянов,
канд. физ.-мат. наук, доцент,
Ирина Борисовна Римшан,
инженер,
Дмитрий Игоревич Рябкин,
аспирант, инженер,
Михаил Сергеевич Савельев,
канд. физ.-мат. наук, ведущий инженер,
Виталий Маркович Подгаецкий,
д-р физ.-мат. наук, гл. научный сотрудник,
Национальный исследовательский университет «МИЭТ»,
г. Москва, г. Зеленоград,
e-mail: gerasimenko@bms.zone

А.А. Аристов, Е.В. Носова, А.Н. Солдатов

Применение метода фотометрии лежащих капель для задач клинической лабораторной диагностики

Аннотация

В статье представлены теоретические обоснования и экспериментальные исследования, посвященные разработке метода диагностики жидких сред на основе фотометрии образцов проб в виде лежащих капель. Приведены обоснования механизмов влияния протекающих в капельных пробах процессов на их оптические свойства. Представлены результаты апробации метода фотометрии капель для оценки динамики оседания эритроцитов и процесса образования фибринового сгустка при проведении клоттинговых тестов.

Введение

Принцип работы большинства медицинских анализаторов состава и свойств биологических сред основан на регистрации оптических свойств конечного продукта, полученного в результате преобразования исходной пробы. Соответственно, все манипуляции с пробой перед фотометрическим измерением направлены на то, чтобы вызвать максимальное изменение величины того или иного фотометрического показателя в зависимости от изменения концентрации анализируемого компонента или в зависимости от активности протекающих процессов. В связи с этим данные исследования всегда сопровождаются многоэтапной пробоподготовкой, что неизбежно влечет появление и накопление ошибок в ходе анализа. Причем количество этих ошибок будет возрастать с уменьшением объемов жидкостей, с которыми производят манипуляции. Следовательно, при работе с малыми объемами проб необходимо оптимизировать сами измерительные оптические методики с целью повышения их чувствительности к исследуемому процессу.

Как показал анализ существующих научных работ, на сегодняшний день направление создания диагностических систем для исследования биологических и химических проб с использованием малого объема анализируемого вещества является актуальным и интенсивно развивающимся.

С нашей точки зрения, интересным направлением в аналитических исследованиях является разработка «открытых» кювет, где объем и форма исследуемой области задаются силами поверхностного натяжения жидкости и межфазными взаимодействиями с подложкой, т. е. исследования проводятся с образцами в виде капель. Это позволяет сократить объемы проб

до нескольких микролитров или даже сотен нанолитров. Кроме того, появляется возможность помимо оценки оптических свойств среды исследовать энергетические характеристики образца, которые меняются в ходе химических и физико-химических преобразований вещества.

Достаточно полный анализ применения капельных методик на период до 2000 года дан в обзоре К.Е. Miller и R.E. Synovec с соавт. [1]. В нем содержится анализ работ по исследованию химических и физических явлений, связанных с каплями и микрожидкостными системами, а также рассматриваются вопросы технологий, связанных с капельными анализаторами химического вещества. В области медицинских лабораторных исследований также достаточно активно изучают возможности этих методов, но их применение в области массовых анализов ограничивает отсутствие как простой аппаратуры для их проведения, так и соответствующих методик, разработанных под конкретные виды медицинского анализа.

Нами также изучается вопрос применения капельных образцов для проведения клинических лабораторных тестов. Анализ и результаты апробации предлагаемой нами методики представлены в данной статье.

Метод фотометрии капельных образцов. Теоретические аспекты

В основном исследования жидкостей с использованием капель основаны на оценке их геометрических параметров, для чего используются системы фото- и видеорегистрации боковой проекции капли с дальнейшей обработкой. Оценка же оптических свойств образца при этом обычно не производится. В большинстве известных разработок, основанных на оценке энергетических характеристик пробы и использующих для это-