Лазерная регенерация хрящевой ткани

Э.Н. Соболь, А.В. Басков, А.Б. Шехтер, О.Л. Захаркина, А.И. Омельченко, О.И. Баум, Н.Н. Воробьева, А.Е. Гуллер

Предложен новый подход к управляемой регенерации биологических тканей под действием неразрушающего лазерного излучения, модулированного во времени и в пространстве. Исследованы физические и химические процессы, происходящие при лазерном воздействии на структуру и поле механических напряжений в хрящевой ткани. Впервые показана возможность управляемой регенерации гиалинового хряща. Разработанны фундаментальные основы новых применений лазеров в ортопедии для лечения заболеваний позвоночника и суставов.

Введение

Заболеваниями хрящей позвоночника и суставов страдает более 80% взрослого населения планеты. Эта социальная проблема по количеству связанных с ней финансовых затрат стоит сегодня в мире на втором месте после сердечно-сосудистых заболеваний.

Традиционный арсенал лечебных воздействий (и хирургических, и терапевтических) направлен, преимущественно, на ликвидацию острых симптомов болезни или замену разрушенного межпозвонкового диска (МПД). Для того чтобы избежать негативных последствий хирургического лечения, в последние годы широкое распространение получили миниинвазивные методы, к преимуществам которых следует отнести малую травматичность, отсутствие общей анестезии и значительное сокращение периода реабилитации пациента. В рамках этого направления стали развиваться пункционные способы воздействия физических факторов, в частности нагрева, на ткани МПД. Однако эти методы по-прежнему связаны с удалением или разрушением части структур МПД, имеют ограниченные показания и не решают проблемы дальнейшей деградации ткани. В последние годы активно ведется поиск новых подходов к лечению остеохондроза позвоночника.

Несмотря на интенсивное развитие новых консервативных и хирургических методов лечения артритов и артрозов, эта социальная проблема также далека от окончательного решения. В частности, известно, что образовавшиеся в результате травмы большие поверхностные дефекты суставного хряща никогда не заживают самостоятельно. Еще более распространенными и трудноизлечимыми являются дегенеративные поражения суставного хряща (остеоартроз). Главная трудность в решении этой проблемы связана с низким уровнем метаболизма в зрелой хрящевой ткани и низкой пролиферативной активностью хондроцитов. Однако число эффективных методов, обеспечивающих замедление процесса дегенерации или восстановление утраченных в результате патологических процессов хрящевых структур, пока невелико. К наиболее перспективным направлениям в этой области следует отнести генную терапию, введение в поврежденную ткань факторов роста, трансплантацию аутологичных хондроцитов или мезенхимальных стволовых клеток, а также комбинацию последних с биоактивными скаффолдами.

Одним из результатов наших исследований лазерной термопластики ушного хряща является обнаружение лазерно-стимулированных процессов регенерации ткани при умеренных лазерных нагревах. Было установлено, что лазерное воздействие приводит к пролиферации хондроцитов, регенерации перихондрия и росту нового хряща гиалинового типа.

В результате междисциплинарных исследований нами был предложен новый подход - управляемая модификация тонкой структуры и поля напряжений в биологических тканях путем воздействия неразрушающего лазерного излучения, индуцирующая репаративный ответ поврежденной или деградированной ткани; таким образом, возникли реальные предпосылки разработки принципиально новых малоинвазивных подходов к лечению заболеваний хрящей позвоночника и суставов.

Импульсно-периодический лазерный нагрев биоткани

С целью оптимизации режимов лазерного воздействия, стимулирующего репаративные процессы в МПД, были проведено экспериментальное изучение динамики температурных полей при лазерном нагреве ткани пульпозного ядра (ПЯ) *ex vivo*. Импульсно-периодическое излучение Er-волоконного лазера с длиной волны 1,56 мкм подводилось внутрь ткани по кварцевому световоду диаметром 400 мкм, что обеспечивало размеры области поглощения не более 0,5x0,5x1 мм^3. Мощность излучения изменялась в диапазоне 0,7-3 Вт, длительность импульса (T) – 0,01-1 сек, частота следования (f) - 0,3-2 Гц. Радиальные распределения температуры записывались тепловизором ИРТИС-200 (IRTIS Ltd, Россия) с частотой 140 Гц. На основании этих данных были выбраны 3 группы режимов импульсно-периодического облучения так, что максимальная температура ткани составляла: 1) 35-40ºС; 2) 20-25ºС; 3) 7-8ºС (рис. 1).

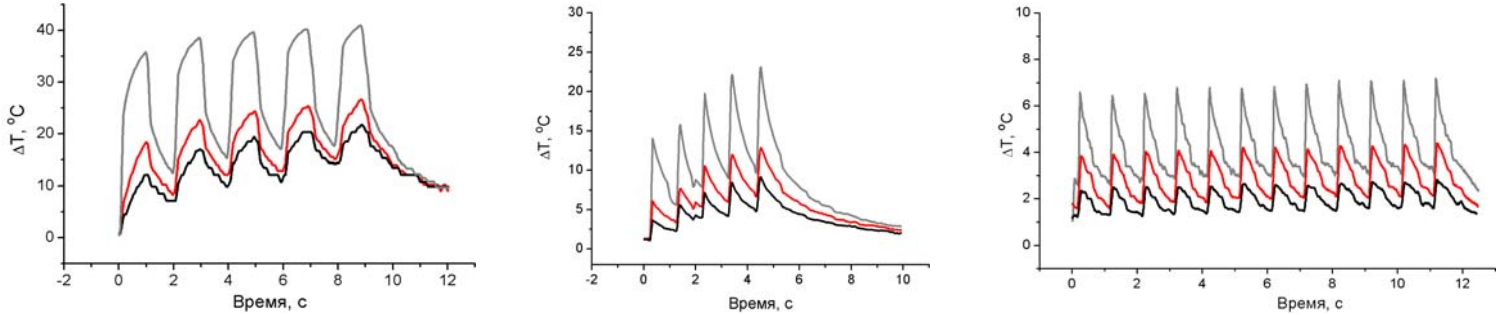


Рис. 1. Динамика температуры при лазерном облучении ПЯ в различных режимах. Верхняя кривая – температура в центре зоны нагрева; средняя кривая - температура на расстоянии 0,5 мм от центра; нижняя кривая - температура на расстоянии 1,0 мм от центра.

В дополнение к температурным измерениям была проведена видеосъемка процесса облучения ткани ПЯ в режимах группы 1 и 2 в проходящем поляризованном свете при скрещенных поляризаторах. Анализ экспериментальных данных показал локальность тепловой модификации ткани, а также реорганизацию архитектоники матрикса ПЯ в объеме, значительно превышающем область нагрева.

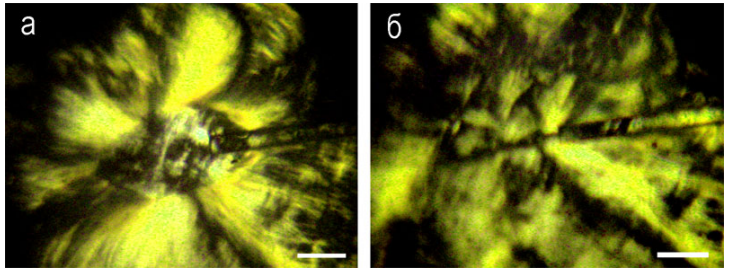


Рис. 2. Реорганизация матрикса ПЯ в области лазерного воздействия в режимах группы 1 (а) и группы 2 (б). Съемка в поляризованном свете. Бар 1 мм.

При лазерном воздействии в режимах группы 1 (рис. 2а) наблюдается относительно свободное перемещение тканевой воды за пределы зоны нагрева, стягивание коллагеновых волокон к торцу волокна (область температурного максимума), где происходит их частичная денатурация.

При лазерном облучении ткани в режимах группы 2 (рис. 2б) смещение воды и коллагеновых структур ПЯ незначительны, однако, периодические возмущения среды распространяются существенно дальше (до 5-7 мм).

Изменение пористой структуры и гидравлической проницаемости хрящевой ткани после лазерного воздействия

Изменение водопроницаемости суставного хряща при лазерном облучении изучалось в квазистатических условиях проникновения физиологической жидкости сквозь слой ткани при постоянном перепаде гидростатического давления и постоянной мощности лазерного излучения. Испытания облученных образцов показали увеличение коэффициента гидравлической проницаемости в 15 раз по сравнению с необлученными образцами, что может быть вызвано образованием каналов в ткани при возникновении открытой пористости в процессе лазерно-индуцированной дегидратации.

Образование пор является одним из известных механизмов релаксации напряжений в твердых телах. Впервые обнаруженное нами образование суб-мироканалов в хряще с помощью атомно-силовой микроскопии является одним из наиболее ярких проявлений модификации надмолекулярной структуры хряща при лазерном нагреве. Развитая сеть глубоких микропор хорошо видна на рис. 3.

.

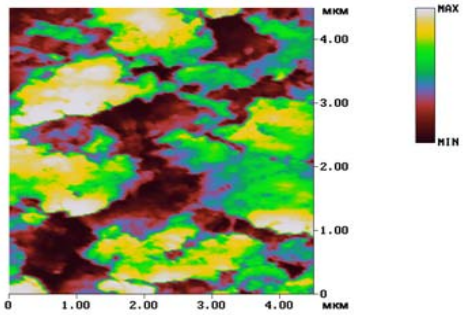


Рис. 3. Изображение поверхности облученного хряща. Разными цветами изображены относительные уровни глубины поверхности.

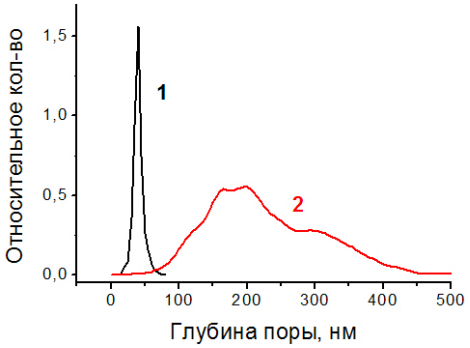


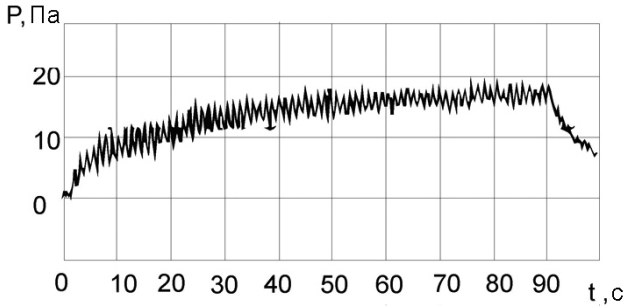
Рис. 4. Распределение микропор по размерам до (1) и после (2) лазерного облучения хрящевой ткани.

Проведенный анализ распределения глубины ямок по сечению образца и распределения глубин по размерам (рис. 4) показал, что лазерное облучение не приводит к радикальному изменению структуры поверхности. В то же время, в результате лазерного облучения распределение становится шире и асимметричнее. Размер микропор (100 нм–400 нм) соответствует характерному размеру протеогликана (длина 300-400 нм, ширина 80 -100 нм). Образование суб-микропор может быть связано с отделением протеоглиановых молекул от гиалуроновой кислоты. Кроме того, оно хорошо коррелирует с особенностями светорассеяния. Увеличение светорассеяния при повышении температуры показывает рост числа рассеивающих центров вследствие кратковременного освобождения протеогликановых единиц, а уменьшение рассеяния при остывании ткани связано с установлением новой равновесной конфигурации.

Появление большого числа новых микропор облегчает массоперенос воды в хрящевом матриксе, улучшает питание хондроцитов, что в значительной мере способствует процессам лазеро-индуцированной регенерации хрящевой ткани.

Роль механических напряжений

Механические эффекты при лазерном воздействии на биологические ткани могут играть существенную роль, как в процессах разрушения, так и в процессах регенерации. Известно, что клетки биологической ткани чувствительны к внешним механическим давлениям: в определенном диапазоне амплитуды механические напряжения способствуют активации регенеративных процессов, а большие давления приводят к торможению клеточной активности и к гибели клеток. В приложении к процессу лазерно-стимулированной регенерации биологических тканей, для которой важно обеспечить заданный режим импульсно-периодического нагрева и механических напряжений, задача определения давления имеет первостепенное значение для мониторинга и оптимизации лазерного воздействия.



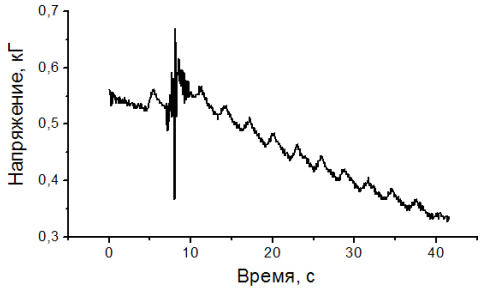


Рис. 5. Динамика изменения давления (напряжений) в гидрогеле (слева) и в МПД (справа) при лазерном облучении.

В настоящей работе был использован оптоакустический подход для регистрации давления акустической волны, возникающей при взаимодействии лазерных импульсов с облучаемой средой. Исследование акустических волн проводили в гидрогелях, близких по механическим свойствам к биотканям, помещенных в замкнутый объем, зажатый между стеклянными пластинками. В процессе облучения проводилась регистрация температуры и акустического сигнала. На рисунке 5 представлены результаты измерения давления в гидрогеле, нагреваемого импульсно-периодическим излучением Er-волоконного лазера. Видно, что за несколько лазерных импульсов реализуется стационарный режим установившихся колебаний давления.

Для определения области действия акустической волны и распределения давления проводилась визуализация уплотнения среды с помощью теневой камеры. Тенеграммы, полученные с помощью покадровой съемки, показали, что волна давления локализована в пределах области поглощения излучения и существенно не распространяется за пределы лазерного пучка (рис. 6).

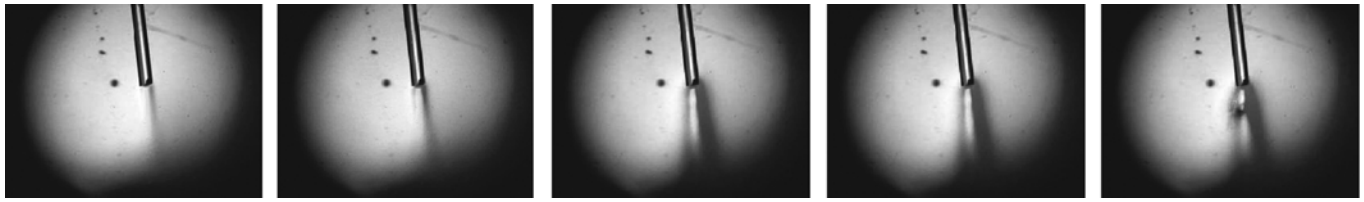


Рис. 6. Лазерное облучение гидрогеля. Последовательность кадров с интервалом 150 мс. Вверху – оптическое волокно d=0,6 мм.

Абсолютные измерения силы, действующей на ткани ПЯ, были проведены на выделенных МПД, зажатых герметично между неподвижным основанием и пластиной с отверстием. МПД подвергался постоянной деформации силой 1,1 кГ.
Во время облучения наблюдалось уменьшение силы, обусловленное вязкоупругой релаксацией тканей ПЯ. На падающем участке релаксационной кривой наблюдались импульсы давления амплитудой ~25 кПа, совпадающие по длительности с импульсами лазерного излучения (рис. 5).
В результате исследования различных механизмов релаксации напряжений в хрящевой ткани был выявлен низкоэнергетический механизм, связанный с изменением организации структуры хрящевого матрикса, а именно с выстраиванием системы хондронов [11] при неразрушающем воздействии модулированного лазерного излучения. Такой процесс релаксации напряжений, известный для кристаллических материалов под названием полигонизации, для биологических тканей нами был обнаружен впервые.

Термомеханическое лазерное воздействие на ткани МПД

Проведено исследование стабильности коллагена в фиброзном кольце (ФК) при гидротермальном и ИК лазерном воздействии. Ткань ФК, обладающая хорошо упорядоченной оптически анизотропной укладкой коллагеновых структур, а также естественным натяжением в составе межпозвонкового симфиза, была выбрана в качестве модели для изучения термомеханического эффекта неоднородного и нестационарного нагрева. Данные об оптической анизотропии ткани ФК и ее изменении при различных способах нагрева были получены методом кросс-поляризационной оптической когерентной томографии (КП-ОКТ). Термические свойства и степень деградации коллагена контролировались методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Однородный нагрев образцов проводился в водяной бане.

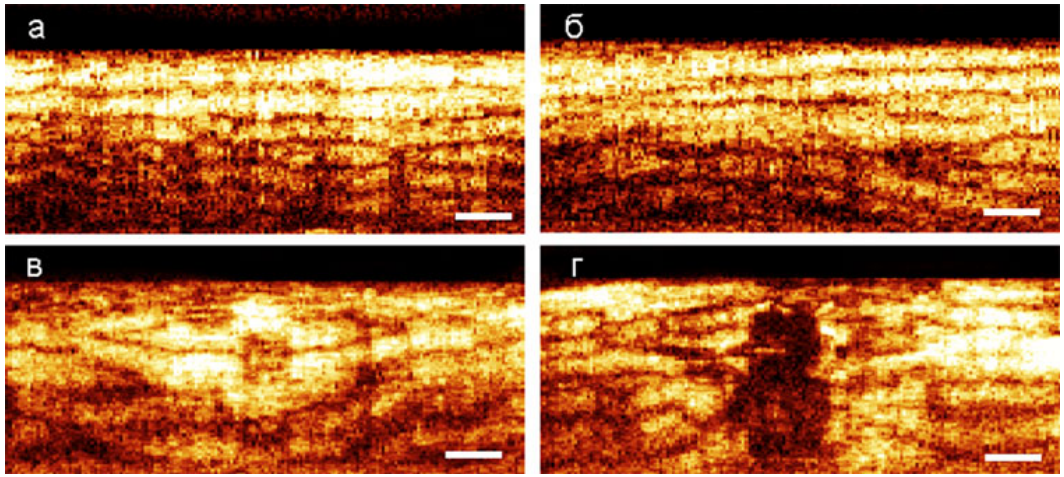


Рис. 7. Томограммы ткани фиброзного кольца: а – интактной, б – после гидротермальной обработки, в, г – после лазерного воздействия.

Неабляционное лазерное воздействие осуществлялось в непрерывном режиме с различной мощностью и длительностью. Анализ КП-томограмм выявил изменения двулучепреломления анизотропной структуры ФК от $\Delta n = (7{,}0 \pm 0{,}2) * 10^{-3}$ для интактных образцов ткани

(рис.7а) до Δn = (4,8 ± 0,2) * 10^{-3} для образцов, подвергнутых гидротермальной обработке (рис.7б). Данные ДСК по термической стабильности коллагена показали, что при однородном нагреве целостной структуры ФК до 80^0С денатурация коллагена не происходит, а ИК лазерное воздействие приводит к частичной денатурации коллагена в ФК, хотя температура и время воздействия не превышают соответствующих величин при однородном нагреве. Степень денатурации при этом возрастает с увеличением мощности и времени обработки. На ОКТ-изображениях облученной зоны наблюдается искажение исходной полосатой структуры (рис.7в), а при увеличении энергии лазерного излучения появляются изотропные области (рис. 7г).

Результаты исследования показали, что нарушение структурной организации коллагеновой сети ФК МПД определяются не только температурой нагретой зоны. Неоднородное во времени и пространстве распределение температуры ткани приводит к расширению нагретых областей, движению внутритканевой воды и развитию градиентов давления в зоне воздействия. Вследствие этого возникают локальные очаги нарушения строго упорядоченной укладки коллагеновых волокон и фибрилл. Если же температура ткани при этом оказывается выше температуры денатурации, макромолекулы коллагена могут претерпевать превращение спираль-клубок, что приводит к локальной усадке волокна. Этот процесс, в свою очередь, стимулирует развитие дополнительного натяжения на соседние волокна, что приводит к обрыву отдельных волокон. Для определения факторов, отвечающих за степень повреждения компонентов матрикса при лазерном воздействии, было проведено дополнительное исследование влияния изменений биохимического состава ткани ФК в системе межпозвонкового симфиза на непосредственный ответ ткани на лазерное облучение. С этой целью межпозвонковые диски обрабатывали химическими агентами, действие которых моделирует дегенеративные изменения ткани. Глицеральдегид провоцирует увеличение числа поперечных сшивок коллагена, гиалуронидаза приводит к снижению гликозаминогликанов (ГАГ), трипсин вызывает комплексную деградацию матрикса. Экспериментальные данные показали, что изменение материальных свойств ткани, вызванное изменением ее биохимического состава, определяет ответ модифицированного ФК на лазерное облучение, отличный от реакции интактной ткани. Так разрушение ГАГ приводит к снижению повреждения коллагена, предварительное воздействие трипсина усиливает последующую денатурацию, а гликация глицеральдегидом определяет различный ответ макромолекул коллагена и коллагеновой сети на лазерное воздействие. Таким образом, данные эксперименты продемонстрировали термомеханический характер неоднородного лазерного, нагрева, который приводит к изменениям структуры межклеточного матрикса за пределами зоны собственно термического воздействия. Результаты этих экспериментов объясняют причины, по которым различные применяющиеся в настоящее время методы, связанные с нагревом ФК (в том числе лазерные, электротермические и токи высокой частоты), приводят к уменьшению механической и термической стабильности МПД, что является причиной послеоперационных осложнений. Дальнейшие наши исследования были направлены на термомеханическое лазерное воздействие на ПЯ и область замыкательных пластин (ЗП) МПД без существенного воздействия на ФК.

В процессе облучения ПЯ, вблизи торца световода образовывался газовые пузырьки, размеры которых осциллировали в такт подаваевым лазерным импульсам. При этом температура в зоне воздействия не превышала 50°С. Одновременно с температурой регистрировалось давление внутри облучаемой полости с помощью пъезодатчика. На графике (рис. 8) изменения давления отмечается фаза роста давления, регистрируемого датчиком вне зоны лазерного нагрева и фаза релаксации давления.

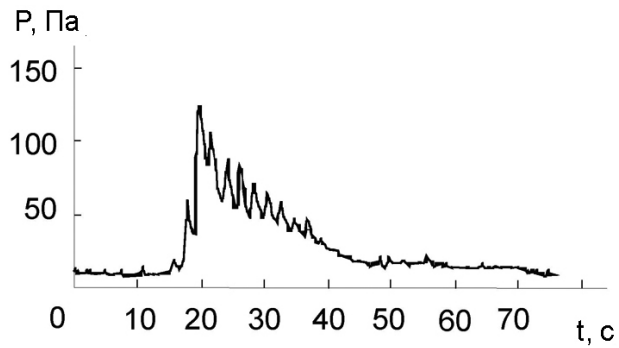


Рис. 8. Динамика роста давления в образце ткани ПЯ в замкнутом объеме.

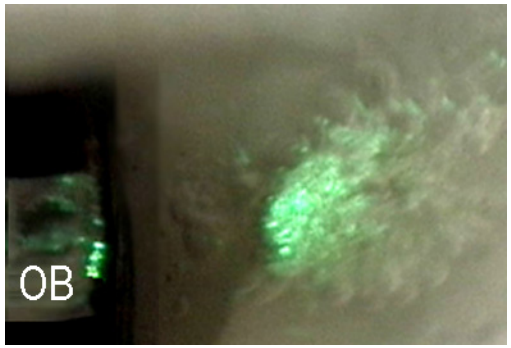


Рис. 9. Образование пузырьков в ткани ПЯ при лазерном воздействии. ОВ – оптическое волокно, d=0,6 мм

Рисунок 9 демонстрирует картину образования пузырьков в ткани. Образующиеся в результате неоднородного нагрева ПЯ газовые пузырьки претерпевают колебательное изменение размеров и совершают возвратно-поступательное движение в пространстве, что способствует активации регенерационных процессов в хрящевой ткани МПД.

Измерения электропроводности ткани МПД

Исследования электропроводности ПЯ МПД при термомеханическом воздействии импульсно-периодического излучения проводились с помощью Er-волоконного лазера с длиной волны излучения 1,56 мкм. Измерения кинетики проводимости ткани проводились на частоте переменного тока 100 Гц с помощью коаксиальных электродов, совмещенных с оптическим волокном доставки лазерного излучения к облучаемой ткани. Для визуализации структурных изменений, происходящих в ткани при лазерном облучении, одновременно с измерением электропроводности проводилась цифровая видеосъемка с помощью теневого метода.

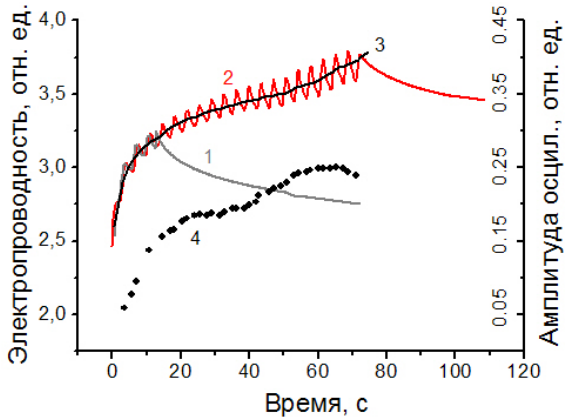


Рис. 10. Изменение электропроводности ткани ПЯ 1 - при воздействии 5-х лазерных импульсов и после выключения лазера; 2 - при длительном воздействии лазерных импульсов. 3 - среднее значение проводимости ткани, 4 - амплитуда колебаний проводимости.

Измерения проводимости тканей МПД при импульсно-периодическом лазерном воздействии показали, что в зависимости от длительности облучения в ткани могут происходить как обратимые, так и необратимые изменения электропроводности (рис. 10, кривые 1 и 2).
Перемещение ткани относительно межэлектродного пространства вызывает перераспределение свободных ионов внутритканевой жидкости и увеличение вклада этих ионов в проводимость ткани. Кроме того, денатурация ткани может привести к дополнительному вкладу связанных контрионов в проводимость ткани. Все это увеличивает проводимость в области лазерного воздействия. Циклические перемещения ткани модулируют величину тока проводимости в межэлектродном пространстве, что может использоваться в качестве индикатора механического состояния ткани. Величина модуляции амплитуды тока показывает динамику механических колебаний (рис. 10, кривая 4), а среднее значение – концентрацию ионов проводимости в коагуляционном мешке.

Исследование динамики оптических свойств ткани ПЯ в процессе лазерного воздействия

Для мониторинга динамики рассеяния видимого света в процессе лазерного нагрева ткани ПЯ МПД была выбрана оптическая схема с одним волокном, позволяющая осуществлять доставку в ткань через созданный канал как рабочего, так и зондирующего лазерного излучения.
Для проведения экспериментов был разработан и изготовлен многофункциональный оптический адаптер. С его помощью в зону лазерного нагрева ткани вводится зондирующее излучение и осуществляется сбор и доставка ДИ к датчику.
Лазерное облучение МПД проводилось через оптическое волокно с помощью Er-волоконного лазера, работающего в импульсно-периодическом режиме. В качестве зондирующего излучения было использовано излучение лазерного диода с длиной волны 532 нм. Огибающие сигнала ДИ и максимальной температуры ткани в ходе лазерного облучения мощностью 1,5 Вт, частотой 0,33 Гц с длительностью импульса 2 с. представлены на рис. 11. Разнообразие поведения ДИ во многом связано с особенностями ткани ПЯ. Структурно ткань ПЯ представляет собой сильно гидратированный гель, имеющий полисахаридную природу, в который хаотично погружены волокна коллагена II типа.

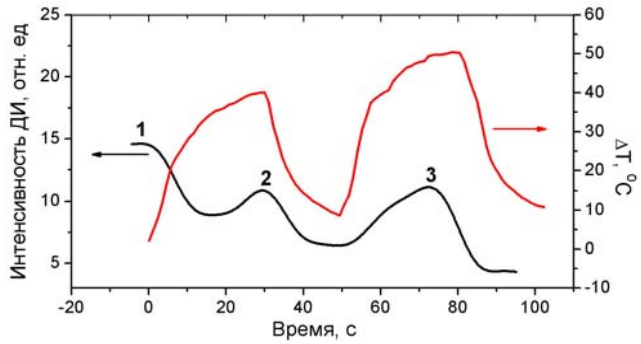


Рис. 11. Огибающие характерных изменений ДИ и максимальная температура ткани, регистрируемая ИК камерой в ходе облучения.

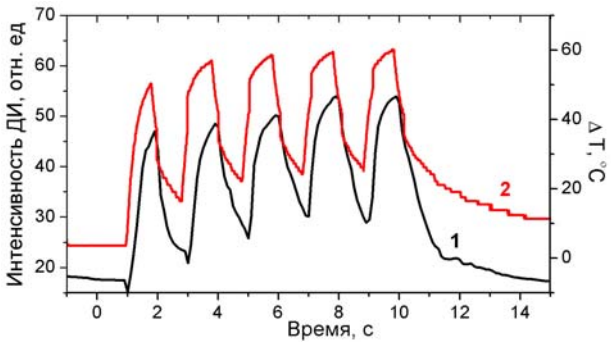


Рис. 12. Динамика изменения интенсивности ДИ, отраженного от пузыря (1) и динамика максимальной температуры (2).

Уменьшение интенсивности ДИ на начальной стадии нагрева ткани (рис. 11, область 1) связано с образованием отрицательной тепловой линзы, которое наблюдалось в гидратированных биотканях в неоднородном и нестационарном температурном поле. Развитие локальных давлений в ходе лазерного нагрева и последующего охлаждения ткани приводит к возникновению направленных потоков воды и к деформации сети коллагеновых волокон. Рост сигнала рассеяния (рис. 11, область 2) вызван уходом воды из облучаемой области и модификацией надмолекулярной структуры матрикса. При достижении температуры 65°С происходит денатурация ткани ПЯ, что приводит к дальнейшему росту ДИ (рис. 11, область 3). Возникновение градиента давления в ходе облучения ткани ПЯ может привести к образованию и движению в поле напряжений микропузырьков газа вблизи торца оптического волокна. При некоторых сочетаниях состояния ткани ПЯ (в частности при ее дегенеративных изменениях) и условий нагрева микропузырьки могут сливаются друг с другом в пузырь, сравнимый по размеру с диаметром оптического волокна. В условиях периодического нагрева и остывания ткани пузырь плавно меняет свой размер, что приводит к характерному изменению сигнала ДИ, практически повторяющему ход температурной кривой (рис. 12). Появление такого пузыря в клинических условиях может приводить к нежелательным последствиям, в частности, к разъединению ткани и к изменению заданного температурного режима лазерной процедуры. Исследования динамики обратного рассеяния в ткани ПЯ в условиях лазерного нагрева, выполненные в оптической схеме с одним волокном, показали возможность мониторинга состояния биоткани в зоне воздействия.

Эксперименты *in vivo* по лазерной реконструкции межпозвонковых дисков

Для поиска оптимальных условий неразрушающего лазерного облучения, стимулирующих эффективные процессы регенерации, были проведены экспериментальные исследованиях на животных. Эксперименты проводились совместно с нейрохирургами и патоморфологами из РМАПО и ММА им. ИМ Сеченова, а также специалистами НЦБМТ РАМН.

В результате первых экспериментов *in vivo* на кроликах была продемонстрирована возможность формирования новой хрящевой ткани фиброзно-гиалинового и гиалинового типов в МПД в ответ на локальное лазерное облучение ПЯ. Кроме того, в части дисков, подвергавшихся лазерному воздействию, наблюдалось образование костной или костно-подобной ткани, содержащей специфические клетки - остеоциты и минеральную составляющую матрикса.

Эксперименты по дальнейшему изучению ремоделирования ткани МПД при неразрушающем лазерном воздействии были проведены *in vivo* на кроликах Шиншилла. Излучение Er-волоконного лазера подводилось в центр ПЯ МПД по 400-мкм кварцевому световоду. Режимы лазерного облучения были выбраны на основе предварительных температурных измерений. Вариации параметров составили: длительности импульса – 10-2000 мкс, частоты повторения – 0,3-2 Гц, энергии импульсов 0,03-3,5 Дж. После выведения животных из эксперимента поясничные диски были извлечены для гистологического и электронно-микроскопического исследования.

Уже на 4 сутки после лазерного облучения в МПД обнаруживаются признаки процесса регенерации. Наиболее четко они выражены во внутреннем слое ФК, на периферии зон некроза. Появляются крупные активные хондроциты и изогенные группы клеток. Вокруг них наблюдается накопление ГАГ (рис. 13).

На поздних сроках признаки регенерации наблюдаются во внутреннем слое ФК и в ПЯ. Значительно увеличивается число активных крупных хондроцитов, окруженных лакунами. Они синтезируют компоненты матрикса: вокруг таких клеток нарастает количество коллагеновых фибрилл с типичной периодичностью, а также мелкозернистых протеогликанов, что видно на электронной микроскопии. Часто обнаруживаются 2-3-клеточные и многоклеточные изогенные группы. При световой и электронной микроскопии новообразованная

ткань имеет смешанные признаки фиброзного и гиалинового хряща. Подобную ткань мы обозначили как фиброзно-гиалиновый хрящ.

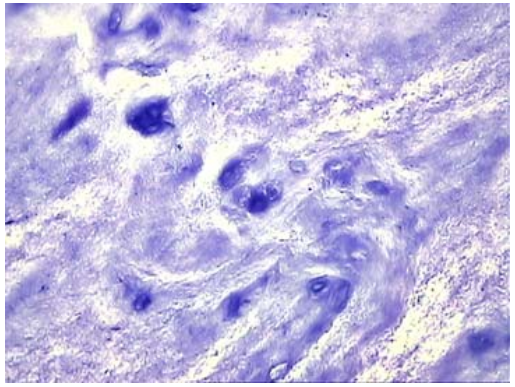


Рис. 13. Синтез ГАГ в юных хондробластах. Окраска толуидиновым синим, х400.

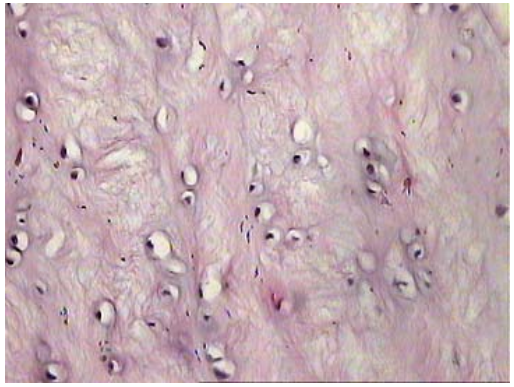


Рис. 14. Внутренний слой ФК. Крупное поле гиалинизирующегося хряща. Окраска гематоксилином и эозином, х400.

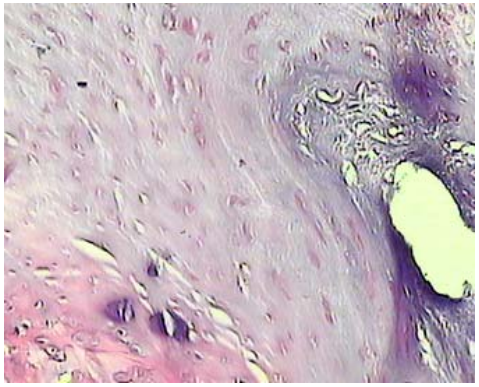


Рис. 15. Зона контакта ФК, костной части ЗП и ПЯ: участок гиалиноподобного хряща. Окраска гематоксилином и эозином, х200.

Наряду с этим, во внутреннем слое ФК, вблизи ЗП и в ПЯ возникают участки типичного гиалинового хряща с гомогенной, при световой микроскопии, структурой матрикса, содержащего тонкие и беспорядочно ориентированные коллагеновые фибриллы, а также с клетками, окруженными лакунами (рис. 14). В ПЯ происходит замещение ткани фиброзно-гиалиновым или гиалиновым хрящом за счет прорастания пролиферирующих клеток из внутреннего слоя ФК, из ЗП, а также резидентных низкодифференцированных клеток ПЯ (рис. 15). Объемное и пространственное соотношение различных по структуре участков, выраженность признаков регенерации зависят от режима лазерного облучения. Следует отметить, что гистологические изменения, обусловленные частичным механическим разрушением структур ФК и ПЯ при проколе диска без облучения, характеризуются репаративной реакцией хондроцитов ФК и клеток ПЯ без дифференцировки в специализированные хондроциты фиброзного или гиалинового хряща. В этих условиях клетки синтезируют преимущественно волокнистые компоненты матрикса.

Для проведения заключительной серии экспериментов *in vivo* на МПД кроликов была отработана и воспроизведена пункционная модель дегенерации дисков и проведен тщательный макроскопический, гистологический и гистохимический анализ изменений дегенеративно-измененных дисков кроликов на протяжении 9-месячного эксперимента. Изученная нами на кроликах модель дегенерации МПД по своим морфологическим проявлениям весьма близка к остеохондрозу человека и может быть адекватно использована для изучения механизма действия различных лечебных факторов, в том числе лазерно-индуцированной регенерации МПД.

Целенаправленное исследование неабляционного лазерного воздействия на МПД кроликов позволило выявить такие режимы облучения, которые индуцируют ярко выраженные процессы регенерации: пролиферацию хондроцитов ФК и ПЯ, метаплазию внутренних слоев ФК и поврежденного ПЯ в переходный фиброзно-гиалиновый или типичный гиалиновый хрящ. Контролируемое неабляционное лазерное

воздействие позволяет вернуть хрящу его природную способность к регенерации. С помощью оптического, теплового и механического действия лазерного излучения активируются клетки хряща. Это позволяет выращивать гиалиновый хрящ в разрушенном МПД.

Моделирование и лазерная регенерация заболеваний суставного хряща

С целью поиска условий стимуляции регенеративных процессов в поврежденной хрящевой ткани были проведены эксперименты *in vivo* по изменению структуры суставного хряща кролика под действием излучения Но-лазера (λ=2,09 мкм) и Er-волоконного лазера (λ=1,56 мкм) с использованием 2-х групп режимов облучения [20]. Гистологическое исследование ткани показало, что более «жесткое» излучение 1-ой группы приводит к деструкции хрящевой пластинки вплоть до субхондральной кости, вызывающей рост грануляционной ткани, которая затем частично трансформируется в «хондроидную» ткань и фиброзный хрящ, замещающие поврежденный гиалиновый хрящ (рис. 16). При неповреждающих режимах лазерного излучения 2-ой группы в дистрофически измененной хрящевой ткани происходит пролиферация хондробластов из резерва недифференцированных клеток гиалинового хряща путем увеличения числа клеток и формирования многоклеточных клонов, в которые входят до 40 клеток. В отдельных суставах участки поврежденного суставного хряща полностью замещались регенерирующим гиалиновым хрящом (рис. 17). Неабляционное лазерное воздействие на суставные хрящи может вызывать некротические, дистрофические и регенерационные процессы в зависимости от параметров излучения.

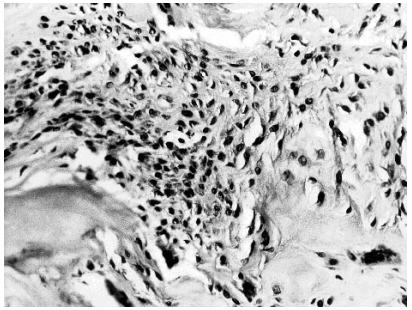


Рис. 16. Рост фиброзно-грануляционной ткани, замещающей некротизированный гиалиновый хрящ. Окраска гематоксилином и эозином; х320.

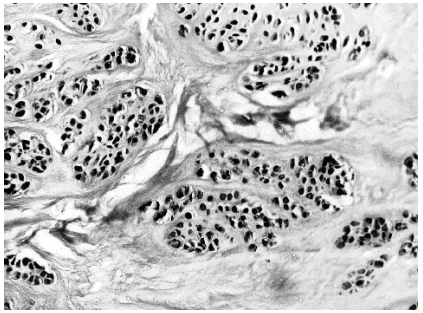


Рис. 17. Некротизированная ткань замещается новообразованным гиалиновым хрящом с большим количеством многоклеточных изогенных групп. Окраска: гематоксилином и эозином; х250.

Следующим этапом работы по лазерной активации регенерационных процессов в суставном хряще явилось лазерное облучение дегенеративно-измененной ткани в экспериментах *in vivo*. С этой целью проводилось экспериментальное моделирование заболеваний коленных суставов задних конечностей минисвиней. Через 2 месяца экспериментальные травматические дефекты четко выделялись на поверхности суставного хряща, кроме того, в части оперированных суставов вблизи первичных дефектов в зонах наибольшей физиологической нагрузки наблюдалось появление вторичных дефектов.

При подготовке экспериментов по стимуляции регенеративных процессов в поврежденном суставном хряще были выбраны режимы лазерного облучения, обеспечивающие термомеханическое воздействие на ткань. Для облучения использовался волоконный лазер ЛАХТА-

МИЛОН с длиной волны излучения 1,45 мкм (глубина поглощения в хрящах 0,4 мм). Такая длина волны была выбрана, чтобы исключить заметное лазерное воздействие на расположенную под суставным хрящом костную ткань и избежать запуска репаративных процессов, связанных с активацией клеток кости и костного мозга. В процессе лазерного воздействия с помощью тепловизора ИРТИС-200 контролировалось изменение температуры в зоне облучения (диаметр 0,6 мм), которое не превышало 10 ^{0}С. При этом пространственная модуляция лазерного излучения обеспечивала градиенты температур порядка 100 градусов/см, а временная модуляция обеспечивала термомеханическое воздействие с частотами 0,5-1,0 Гц. Через два месяца после лазерного облучения животные выводились из эксперимента; облученные и контрольные образцы ткани были направлены на гистологическое исследование. Результаты гистологического исследования показали, что лазерно-индуцированная регенерация хрящевой ткани поверхностных дефектов происходит только за счет клеток самого хряща, а не за счет клеток костной ткани, костного мозга или фибробластов, присутствующих в синовиальной жидкости. Уменьшение размеров видимого дефекта происходит за счет заполнения его регенерировавшей хрящевой тканью в направлении от краев дефекта к центру. Важно отметить, что, регенерация поверхностного дефекта происходит путем роста гиалинового хряща. Результаты лазерной регенерации хрящей суставов животных показали перспективность применения неразрушающего лазерного излучения, модулированного в пространстве и во времени для лечения травматических дефектов и дегенеративных заболеваний суставного хряща.

Механизмы лазерной регенерации биологических тканей

Регенерация является естественным ответом биологической ткани практически на любое внешнее повреждающее воздействие. Однако степень репаративных процессов, скорость их протекания и результаты (тип образующейся ткани) зависят от характеристик внешнего воздействия. Различают два типа регенерации – заместительную (замещение дефекта ткани или органа соединительной тканью, часто с образованием рубца) - быстрый ответ системы на достаточное сильное внешнее воздействие и клеточную (основанную на пролиферации имеющихся клеток) – относительно медленный процесс, приводящий к росту высоорганизованной ткани.

Обсудим существующие представления о механизмах лазеро-индуцированной регенерации биологических тканей применительно к проблеме регенерации гиалинового хряща.

1. Известно, что хондроциты чувствительны к окружающим условиям, в частности, к температуре и механическим напряжениям. Модулированное в пространстве и во времени лазерное излучение вызывает импульсно периодический нагрев, приводящий к неоднородному термическому расширению и неоднородному пульсирующему полю механических напряжений, что может активно влиять на функции хондроцитов, способствуя их пролиферации и биосинтетической активности.

2. В наших исследованиях впервые показано образование пор размерами порядка 1 мкм в гиалиновом хряще после неабляционного воздействия лазерного излучения. При этом не наблюдалось значительных структурных изменений хрящевой ткани. Микро и нано поры, образующиеся в хряще МПД, играют важную роль в улучшении питания и стимуляции регенераторного процесса после лазерного воздействия.

3. Один из возможных механизмов регенерации является неспецифическим для лазерного излучения и характерным для повреждения ткани любой этиологии. Известно, что повреждение клеток может привести к репаративному отклику системы. Однако этот механизм регенерации чаще приводит к быстрому росту более грубой соединительной ткани и не всегда является желательным в процессах лазерного репаративного воздействия на хрящевые ткани суставов и межпозвонковых дисков.

Заключение

В результате всего комплекса проведенных нами исследований была впервые показана возможность управляемого роста хрящевой ткани гиалинового типа и созданы научные основы метода лазерной реконструкции дисков (ЛРД). При тесном сотрудничестве сотрудников лаборатории с нейрохирургами из РМАПО и клиники ОРТОСПАЙН была разработана технология процедуры ЛРД. На основе детального изучения процесса взаимодействия неразрушающего лазерного излучения с тканями МПД подготовлены технические требования для создания специализированного лазерного медицинского оборудования, которое сможет обеспечить эффективность и безопасность лазерной процедуры. Оборудование должно включать в себя волоконный лазер, одноразовый оптоволоконный инструмент, программное обеспечение и контрольную систему с обратной связью, которая позволит корректировать режим воздействия или отключать лазерное излучение при возникновении нештатных ситуаций во время проведения процедуры ЛРД.

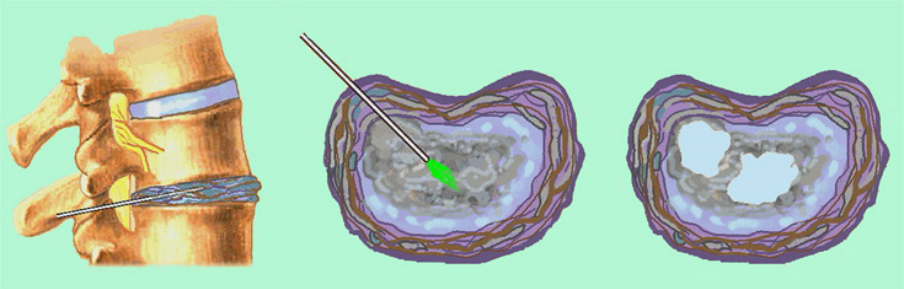


Рис. 18. Схема процедуры лазерной реконструкции дисков (ЛРД).

Клинические испытания ЛРД проводились в Центральной клинической больнице №1 ОАО "РЖД" и в клинике "ОРТОСПАЙН". В 2001 - 2008 гг. проведено более 360 лазерных операций по лечению дегенеративных заболеваний позвоночника и профилактике рецидивов грыжи межпозвонковых дисков. На основании клинического наблюдения у 86% пациентов с хроническим дискогенным болевым синдромом было получено выраженное статистически значимое различие между показателями уровня качества жизни и интенсивности болевого синдрома до и через полгода после процедуры ЛРД. Метод лазерного лечения заболеваний позвоночника прошел регистрацию Российской Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (регистрационное удостоверение ФС – 2006/025).

Управляемая лазерная модификация микроструктуры и поля механических напряжений биологических тканей – направление, открывающее новые, эффективные возможности применения лазеров в медицине: в ортопедии и спинальной хирургии. Лазерные технологии позволяют заменить ряд традиционных высокотравматичных операций на бескровные и безболезненные процедуры, которые обладают массовым спросом и могут проводиться в амбулаторных условиях.

Благодарности

Исследования по лазерной регенерации хрящевых тканей в ИПЛИТ РАН были инициированы академиком ВЯ Панченко, которому авторы выражают глубокую благодарность. Авторы признательны также И.А. Борщенко, В.В. Голубеву, И.Ю. Колышеву (клиника "ОРТОСПАЙН"), В.А. Баскову (РМАПО), Г.Д. Капанадзе (НЦБМТ РАМН) за помощь в проведении экспериментов на животных. Отдельные этапы работы выполнялись при финансовой поддержке РФФИ, ИНТАС, АФГИР, МНТЦ, и Аркюо Медикал Инк.

Основные публикации

Лазерная инженерия хрящей /Под ред. Баграташвили В.Н., Соболя Э.Н., Шехтера А.Б. М: ФИЗМАТЛИТ, 2006, 488 с.

Sobol E., Baskov A., Shekhter A., Borschenko I., Zakharkina O.. Laser regeneration of spine discs cartilage: mechanism, in-vivo study and clinical applications. Proceedings of Light-Activated Tissue Regeneration and Therapy Conference; R. Waynant and D. R. Tata eds.; Springer 2008; pp. 259-266.

Омельченко А И, Соболь Э Н. Оптомеханические испытания гидратированных биотканей при лазерном изменении их размеров и формы. Квант. Электрон. 2008; 38(3):269-272.

Sobol EN, Omel'chenko AI, Mertig M, Pompe W. Scanning force microscopy of the fine structure of cartilage irradiated with a CO2 laser. Lasers Med. Sci. 2000; 15(1):15-23

Ignatieva N., Zakharkina O., Leroy G., Sobol E., Vorobieva N., Mordon S. Molecular processes and structural alterations in laser reshaping of cartilage. Laser Phys. Lett. 2007; 4(10):749–753.

Ignatieva NY, Zakharkina OL, Andreeva IV, Sobol EN, Kamensky VA, Myakov AV, Averkiev SV, Lunin VV. IR laser and heat-induced changes in annulus fibrosus collagen structure. Photochem. Photobiol. 2007; 83(3):675-685.

Ignatieva N., Zakharkina O., Andreeva I., Sobol E., Kamensky V., Lunin V.. Effects of laser irradiation on collagen organization in chemically induced degenerative annulus fibrosus of lumbar intervertebral disc. Lasers Surg. Med. 2008; 40(6):422-432

Омельченко А.И., Соболь Э.Н. Изменения электропроводности тканей межпозвонковых дисков при импульсно-периодическом лазерном воздействии. Квант. Электрон. 2009; 39(3):279-282.

Sobol E., Zakharkina O., Baskov A., Shekhter A., Borschenko I., Guller A., Baskov V., Omelchenko A., Sviridov A.. Laser engineering of spine discs. Laser Phys. 2009; 19(4):825-835.

Басков АВ, Шехтер АБ, Соболь ЭН, Воробьева НН, Омельченко АИ, Гаврильчак АВ, Басков ВА, Захаркина ОЛ, Фельдштейн ФИ, Каменский ВА, Куранов РВ, Борщенко ИА, Желваков СВ. Влияние лазерного излучения на процессы регенерации хрящевой ткани межпозвонковых дисков. 1. Предварительное сообщение. Лазерная медицина 2002; 6(2):18-23

Sobol E.N., Milner T.E., Shekhter A.B., Baum O.I., Guller A.E., Ignatieva N.Y., Omelchenko A.I., Zakharkina O.L.. Laser reshaping and regeneration of cartilage**.** Laser Phys. Lett. 2007; 4(7):488-502

Шехтер А.Б., Басков В.А., Захаркина О.Л., Гуллер А.Е., Борщенко И.А., Колышев И.Ю., Капанадзе Г.Д., Басков А.В., Соболь Э.Н.. Моделирование дегенеративных изменений межпозвонковых дисков (остеохондроза) у кроликов: макроскопическое и гистологическое изучение. Биомедицина 2009; (3), принято в печать.

Шехтер АБ, Соболь ЭН, Мусалатов ХО, Силин ЛЛ, Гаврильчак АБ, Воробьева НН, Свиридов АП, Омельченко АИ, Месхи КТ, Целищева ЕЮ. Изменение структуры и регенерация суставного хряща при неабляционном воздействии лазерного излучения с длинами волн 2,09 и 1,56 мкм. Лазерная медицина 2001; 5(4):27-31

Соболь Э.Н., Голубев В.В., Шехтер А.Б., Баум О.И, Омельченко А.И., Басков А.В., Голубев В.Г., Гуллер А.Е. Регенерация суставного хряща при неразрушающем воздействии лазерного излучения. ДАН 2009, принято в печать.