

Лазерно-активируемые нанобиоматериалы для восстановления тканей и дозированного высвобождения лекарств*

П.Маттеини, Ф.Ратто, Ф.Росси, Р.Пини

Представлены последние достижения в области сшивания биологической ткани с минимальной инвазивностью и контролируемой дозировки лекарственных препаратов на основе лазерно-активируемых нанобиоматериалов. В частности рассмотрены успехи в биомедицинском применении золотых нанохромофоров, поглощающих в ИК спектральном диапазоне, для фототермического восстановления хирургических разрезов и нанотриггеров дозированного высвобождения лекарств из гибридных биополимерных структур.

Ключевые слова: лазерная сварка, взаимодействие лазерного излучения с тканью, фототермические свойства, хромофоров, золотые наночастицы, нанокмозиты.

1. Введение

Широкое распространение лазеров во многих областях медицины обусловлено рядом отличительных особенностей лазерной техники, основная из которых – минимальная инвазивность – предоставляет значительные преимущества, включая возможность терапии с повышенной точностью и контролируемостью и минимизацию возникновения хирургических травм и послеоперационных осложнений, вызванных повторным наложением швов и скоб. Эти преимущества способствуют улучшению качества медицинских процедур, снижению времени выздоровления и, в конечном счете, – повышению качества жизни пациентов [1, 2].

Лазерное излучение в ближнем инфракрасном (БИК) диапазоне спектра применяется для решения ряда задач хирургии и терапии вследствие высокого пропускания биотканей в интервале 700–1300 нм [3]. Благодаря слабому поглощению основных компонентов биотканей, таких как меланин, гемоглобин и коллаген, БИК-излучение проникает глубоко в ткань и сводит к минимуму ее повреждения [1]. К замечательным примерам биомедицинского использования лазеров БИК диапазона относятся, помимо прочего, бесшовная пайка и восстановление биоткани, а также локализованное высвобождение фармацевтических препаратов «по требованию». В этих случаях лазерная обработка сопровождается синергетическим эффектом использования органических хромофоров или нанохромофоров [4]. Они обеспечивают контролируемое фототермическое действие при активации БИК излучением, на которое можно влиять с помощью таких параметров лазера, как интенсивность, время об-

лучения и способ доставки излучения. В этом обзоре мы представляем уже используемые, а также апробируемые лазерные методы, разрабатываемые в Институте прикладной физики (CNR, Италия) для лазерного восстановления биологических тканей и лазерного высвобождения лекарственных средств из имплантируемых устройств.

2. Лазерное сшивание и восстановление биотканей с помощью обычных органических хромофоров

Запаивание случайных ран и хирургических разрезов с помощью лазеров является ценной и устойчивой процедурой, способной заменить традиционные подходы [3, 5, 6]. Использование лазеров может обеспечить мгновенную водонепроницаемую запайку ран, что существенно для многих критически важных областей, таких как микрохирургия, лапароскопия, эндоскопия, а также для лечения очень тонких тканей, например при восстановлении желудочно-кишечных и сосудистых покровов, без внешнего шовного материала. Преимуществом по сравнению с обычным наложением швов является меньшее время операции, снижение требований к квалификации персонала, ослабление отторжения инородных тканей и, следовательно, менее активная воспалительная реакция, усиленные способности к регенерации первоначальной структуры ткани и ее улучшенный косметический вид [7].

В этой связи использование высокой проникающей способности БИК излучения и соответствующих экзогенных органических хромофоров или красителей, выборочно и локально преобразующих свет в тепло, стало перспективным направлением исследований в течение последнего десятилетия [3, 8]. Раствор красителя применяется для создания вокруг краев раны теплового эффекта, стимулирующего ее заживление. В настоящее время используются два различных подхода к лазерному сшиванию с возможным добавлением лазерно-активируемого клея [7]. При первом подходе, обычно называемом лазерной пайкой, экзогенный материал, такой как раствор белка или полимерный препарат, служит для создания

* Перевод с англ. А.П.Попова.

P. Matteini, F. Ratto, F. Rossi, R. Pini. Institute of Applied Physics ‘Nello Carrara’, National Research Council, via Madonna del Piano, 10, 50019 Sesto Fiorentino, Italy; e-mail: R.Pini@ifac.cnr.it

Поступила в редакцию 2 марта 2014 г., после доработки – 4 мая 2014 г.

или улучшения адгезии. Смесь этого материала и красителя помещают между краями раны и облучают БИК-лазером, что приводит к термической активации припоя [7]. При втором подходе, называемом лазерной сваркой, краситель наносится на открытые границы раны. Тепло, выделяемое при облучении БИК-лазером, вызывает локальное термическое изменение основных компонентов тканей, таких как гликозаминогликаны и коллаген (рис.1) [9,10]. В свою очередь эти компоненты обеспечивают связь между краями раны, что приводит к ее быстрому заживлению с минимальным образованием рубцов и снижает степень риска отторжения ткани. После лечения инородный материал, включая хромофоры и клеи, всасывается, и ткань раны постепенно восстанавливается до нормального состояния.

2.1. Лазерное устранение повреждений роговицы

Рассмотрим несколько примеров приложений лазерного сшивания, достигших доклинической и клинической апробации, которые были разработаны нашей группой в течение последнего десятилетия. Все они основаны на использовании диодного лазера БИК диапазона, излучающего на длине волны 810 нм, и красителя индоцианинового зеленого (ИЗ), имеющего высокое оптическое поглощение на длине волны лазерного излучения. Выбор ИЗ был обусловлен его биосовместимостью, способствующей применению этого препарата в ряде биомедицинских приложений [14, 15]. Этот краситель обычно используется в виде коммерчески доступного водного концентрированного раствора (10% по весу/объему) для биомедицинских применений (например, IC-Green Akorn, США, или ICG-Pulsion Medical Systems AG, Германия). Раствор наносят на области ткани, предназначенные для сварки, избегая случайного окрашивания окружающих

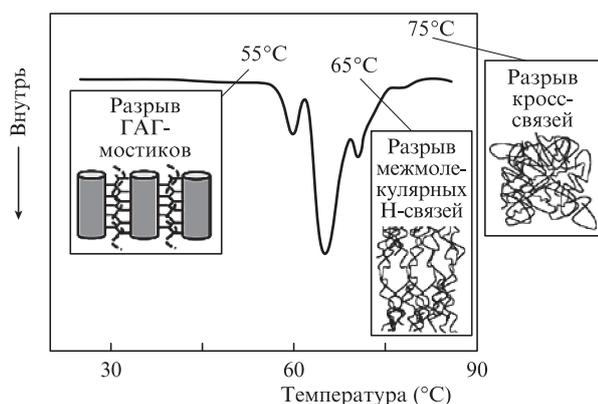


Рис.1. ДСК-термограмма роговицы глаза свиньи, иллюстрирующая три различных процесса в диапазоне 50–80°C. Нативные фибриллы коллагена располагаются параллельно друг другу с одинаковым межволоконным расстоянием, обусловленным гликозаминогликановыми (ГАГ) мостиками. Каждая фибрилла представляет собой регулярно упакованные молекулы коллагена с внутримолекулярными водородными связями (Н-связи) и межмолекулярными ковалентными связями (кросс-связи). При температуре выше 50°C происходит разрыв межволоконных мостиков, нарушающий упорядоченное расположение фибрилл. При более высоких температурах начинается ломка внутримолекулярных водородных связей фибриллярного коллагена, представляющая собой первый шаг его денатурации, за которой следует разрыв ковалентных поперечных связей между молекулами коллагена и внутри них, приводящая к полной деструкции регулярной пептидной структуры и гомогенизации соединительной ткани. По материалам работ [11–13].

тканей и поглощения света ими. Затем с помощью хирургического микроскопа осуществляется лазерная сварка краев раны. В доклинических испытаниях, а также в клинике используется диодный AlGaAs-лазер WELD 800 (Ei. Ep. SpA, Италия), оснащенный волоконно-оптической системой. Волоконный наконечник установлен в ручной держатель, что позволяет легко манипулировать пучком излучения лазера под хирургическим микроскопом и хорошо контролировать подачу пучка.

Бесконтактное облучение непрерывным диодным лазером было предложено для устранения повреждений роговицы (раны, порезы) в качестве замены традиционного наложения швов или в сочетании с ним [16, 17]. Эта технология применяется при сквозной (пересадка всех слоев роговицы) и послойной (трансплантация части слоев роговицы) кератопластике [18]. В первом случае донорскую роговицу наносят на глаз пациента и закрепляют небольшим количеством (как правило, 8–16) прерывистых швов. Затем раствор ИЗ вводят в разрез роговицы, чтобы окрасить его стенки по глубине. Во втором случае аккуратно удаленная часть донорской роговицы накладывается на то место, где она будет пришита к роговице пациента, с применением обычного шовного материала или без него, а затем стенки раны окрашиваются ИЗ, как описано выше. Через несколько минут после нанесения ИЗ раствор вымывают большим количеством воды и по всей длине разрез подвергают лазерной обработке вместо обычного наложения швов.

Плотность мощности лазера при клиническом использовании составляет около $8 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-2}$, что достаточно для хорошей сварки [9]. Во время облучения кончик волокна удерживают на рабочем расстоянии около 1.5 мм и под углом 45° к поверхности роговицы. Такое положение волокна обеспечивает однородное облучение по глубине стенок раны и предотвращает случайное облучение более глубоких структур глаза. Кончик волокна непрерывно перемещается над свариваемой тканью, совокупное время лазерного облучения составляет несколько минут.

На сегодняшний день перфорационная кератопластика была выполнена у более чем 200 пациентов с удовлетворительными результатами. Как было установлено, положение соединенных краев остается стабильным, обеспечивая оптимальные результаты с точки зрения послеоперационного астигматизма после удаления катаракты и при кератопластике. В случае послойной кератопластики послеоперационные и следующие в течение 12 месяцев наблюдения выявили образование более гладкой поверхности роговицы, полное отсутствие отека и воспаления и снижение послеоперационного астигматизма по сравнению с обычными способами сшивания.

2.2. Лазерное восстановление артерий и их сшивание

Манипуляции, аналогичные описанным выше, были проведены *ex vivo* и *in vivo* на животных при микрососудистой хирургии. Стоит отметить, что стандартные методы сшивания применять не всегда удобно из-за малых диаметров сосудов, тогда как наличие инородного материала может вызвать серьезные воспалительные реакции, что в итоге приводит к тромбозу и окклюзии в месте соединения [5, 19]. Пытаясь решить эти проблемы, мы разработали метод лазерной пайки на основе ИЗ и биополимера. Нашей целью была стабилизация оптических свойств хромофора с течением времени, а также возмож-

ность разработать гибкий, биосовместимый и легкий в обращении лазерно-активированный клей, различные формы которого можно было бы использовать для определенных хирургических нужд. Созданная нами смесь состоит из содержащих ИЗ пленок хитозана толщиной ~40 мкм, которые тестировались как припой для лазерного восстановления и сшивки сосудов (ЛВС и ЛСС соответственно). При его использовании импульсное лазерное облучение для жесткой стабилизации пленки, обрабатывающей сосуд (например, артерию), сочеталось с непрерывным облучением с целью инициирования прикрепления пленки к сосудистой ткани [20].

Пленки получали диспергированием хитозана до окончательной концентрации 3.5% (по весу/объему) в слабом кислотном растворе, содержащем 0.02% ИЗ; затем следовали заливка в пластиковые формы, сушка и их окончательное превращение в водно-нерастворимую форму щелочным раствором [21, 22]. Приготовленные пленки устойчивы, гибки и стабильны в физиологической среде, показывают равномерное распределение хромофора по всему биополимерному остову и сохраняют свои оптические характеристики в течение многих дней после изготовления. При использовании типичной методики после временного отсечения близкой и дальней частей сегмента сосуда делается разрез длиной ~5 мм – продольный (ЛВС) или по всей толщине сосуда (ЛСС). Затем пленка на основе ИЗ-хитозана наносится на пораженный участок, обрабатывается вокруг сосуда и припаивается лазером в нужном положении (рис.2). В случае ЛСС три прерванных стежка рекомендуется приблизить к обрубленным концам сосудов и усилить сочленение. Облучение производится одиночными лазерными импульсами (типичная выходная пиковая мощность 0.9 Вт, длительность импульса

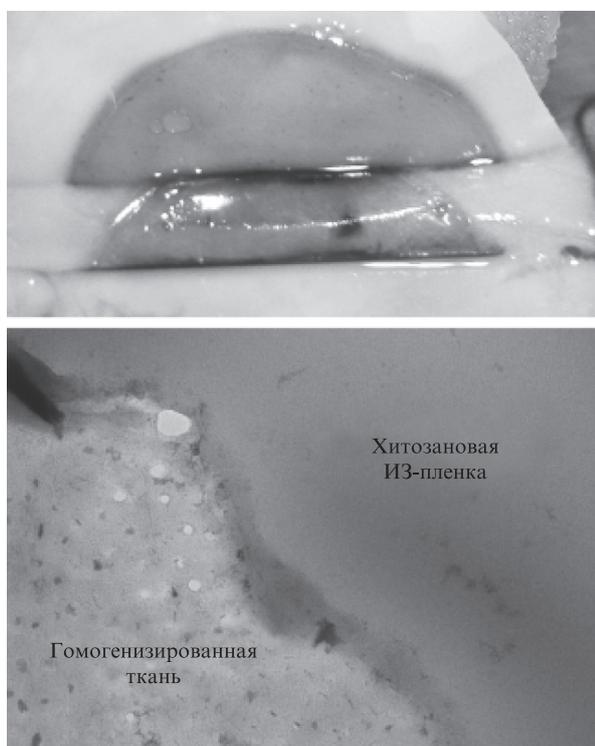


Рис.2. Лазерное восстановление общей артерии (аорты) новозеландского кролика с помощью импульсного лазерного облучения хитозановой ИЗ-пленки. Вверху – артерия, обернутая хитозановой ИЗ-пленкой, внизу – ТЭМ-микрофотография линии фототермической адгезии между пленкой и артериальной тканью [20].

80 мс и флюенс 100 Дж·см⁻²), при этом кончиком волокна следует осторожно нажимать на пленку, сохраняя зону облучения хорошо увлажненной. Одиночные лазерные пятна распределяются по всей поверхности пленки для улучшения ее адгезии с сосудом. Затем осуществляется облучение непрерывным лазером (200 мВт, плотность мощности 18 Вт·см⁻², флюенс 200 Дж·см⁻²). Для герметизации и улучшения адгезии пленки к поверхности сосуда используется метод, похожий на лазерную сварку роговицы. После операции было отмечено хорошее восстановление структур стенок сосудов и морфологии физиологического эндотелия при отсутствии тромбогенетических эффектов в случае как кратковременного (2 и 7 дней), так и долгосрочного (30 и 90 дней) периода наблюдения. Кроме того, доплеровские анализы до и после операции показали, что использование пленки не влияет на кровоток даже в случае плотно обернутых сосудов.

3. Лазерное сшивание с помощью плазмонных наночастиц

3.1. Плазмонные нанохромофоры

Несмотря на широкое применение в практической хирургии, органические красители, используемые в лазерных методах лечения, могут иметь серьезные недостатки, такие как ограниченная оптическая эффективность, низкий порог фотообесцвечивания, возможная фототоксичность (например, генерация активных форм кислорода), низкая стабильность в воде и затрудненная диффузия в биологической среде [14, 23, 24]. Кроме того, органические красители обладают низкой степенью химической универсальности, которая ограничивает выбор составов в функциональных соединениях, а также слабой оптической универсальностью, которая ограничивает возможность их использования в сложных случаях.

Эти ограничения вызвали дискуссии о необходимости замены органических хромофоров плазмонными наночастицами, перспективными с точки зрения расширения спектра применений лазерного лечения [23, 25–28]. К широкому классу таких наночастиц принадлежат разнообразные структуры на основе золота – золотые наностержни, наноболочки (ядро – из оксида кремния, оболочка – из золота), наноклетки и другие формы; золотые наностержни упоминаются примерно в 80% современной литературы. Спектры экстинкции этих наночастиц представляют собой «отпечатки пальцев» коллективных колебаний свободных электронов, или плазмонных резонансов, и обычно содержат более слабую полосу в зеленом диапазоне спектра, подобную той, что есть у золотых наносфер, и довольно сильную полосу в БИК диапазоне частот [29, 30]. Эту полосу можно настраивать во всем БИК диапазоне путем изменения основных морфологических параметров, таких как отношение сторон (длины к диаметру перетяжки) золотого наностержня или соотношения между толщиной оболочкой и диаметром ядра для золотых наноболочек, которые можно контролировать при синтезе.

Активно исследуются вопросы точного контроля размера и формы плазмонных наночастиц [31, 32]. На рис.3 показаны синтезированные в нашей лаборатории золотые наностержни, имеющие сходные формы, но различные средние размеры. После возбуждения лазером БИК диапазона эти плазмонные колебания релаксируют, в основном, по безызлучательному каналу [33]. Соотношение фи-

зических и химических свойств золотых наночастиц создает ряд благоприятных особенностей. Это исключительно высокое сечение оптической экстинкции (на пять порядков больше, чем у органических хромофоров [29, 34]), высокая стабильность в организме и высокий порог фотообесцвечивания [33], низкая токсичность [35, 36] и универсальность конъюгирования с дополнительными молекулами, включая лиганды и лекарства. Кроме того, способность частиц размером в несколько десятков нанометров пассивно накапливаться в опухоли после внутривенной инъекции благодаря ее повышенной проницаемости, открыла путь к использованию плазмонных наночастиц в онкологии. Важные области применения частиц включают в себя фотоакустический имиджинг [37–39] и оптическую гипертермию [40–42] рака, для которой можно использовать одни и те же контрастные агенты.

Для таких применений плазмонные наночастицы сначала модифицируются с целью их доставки к опухоли и ее окрашивания, часто осуществляемых через кровотоки, что требует медленной фильтрации крови и, возможно, высокого сродства к неопластическим клеткам. Доставка может ускоряться при покрытии частиц полимерной оболочкой, например из полиэтиленгликоля, что увеличит их шансы избежать иммунной реакции организма [43–45]. Окрашивание можно продемонстрировать при добавлении лигандов специфических белков, которые избыточно экспрессируются на плазматических мембранах злокачественных клеток, таких как рецептор эпидермального фактора роста [40, 41, 46, 47], рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста [40], рецептор фолиевой кислоты [48–51] и т.д. После окрашивания опухоли плазмонными наночастицами они возбуждаются короткими лазерными импульсами, часто в наносекундном режиме с модуляцией добротности В результате возникает фото-

акустический ультразвук, т.е. каскад фототермических и термоупругих явлений, которые можно использовать для визуализации тканей с оптическим контрастом на глубину проникновения ультразвука.

С другой стороны, использование непрерывных лазеров может быть удобно для гипертермической терапии, уже проходящей клинические испытания [52]. Недавние предложения по удалению опухоли с помощью плазмонных наночастиц включают в себя использование коротких (наносекундных или даже фемтосекундных) лазерных импульсов, вызывающих образование пузырьков пара и кавитацию, что может привести к гибели отдельных злокачественных клеток [53] или к добавлению цитотоксинов, ингибиторов и т.д. В настоящее время биохимическая инертность и слабая подвижность золотых наночастиц, способность долго находиться *in situ* и неясные пути выведения из организма воспринимаются как критическое препятствие для их клинического внедрения. Однако сочетание нескольких особенностей этих наночастиц, в том числе их высокая эффективность и стабильность, биохимическая инертность, низкая токсичность, а также медленная диффузия, вероятно, делают их идеальными для лазерной сварки, при которой желательна высокая локализация хромофора после местного наложения.

3.2. Синтез и оптическая перестройка плазмонных наночастиц

Деятельность нашей группы фокусируется на дизайне и синтезе наностержней золота. Водные суспензии этих наночастиц могут быть синтезированы путем самосборки при восстановлении хлорзолотой кислоты аскорбиновой кислотой в присутствии ионного поверхностно-активного вещества – бромида цетримония (ЦТАБ), образующего мицеллы в водной среде и плотный бислой вокруг кристаллов золота, очень маленьких золотых наносфер, которые действуют как зародыши, и небольших количеств нитрата серебра. Во время роста наночастиц адгезия цетримония происходит предпочтительно вдоль определенных граней золотых кристаллов, вероятно, из-за стерических условий. Это влияет на подачу ионов золота, и поэтому рост происходит быстрее в тех направлениях, где меньше цетримония, что приводит к удлинению частиц [32, 54], вытянутая форма которых отвечает за появление плазмонных полос в БИК области спектра. После окончания роста поверхность золотых наностержней можно легко изменить, заменив цетримоний более биосовместимыми молекулами, часто с использованием тиолов или аминов [55].

Мы разработали новую процедуру систематической модуляции размера и формы наностержней золота путем контроля концентрации и скорости восстановления хлорзолотой кислоты аскорбиновой кислотой [32]. Эта процедура начинается со стандартного, наиболее часто используемого метода [56], в котором исходный раствор для роста оставляет 80% золотых ионов из хлорзолотой кислоты частично восстановленными или практически неиспользуемыми. Постепенное добавление аскорбиновой кислоты приводит к последовательному уменьшению количества этих ионов золота и к новому росту наночастиц. Скорость добавления аскорбиновой кислоты влияет на мелкие детали их формы, приводя к появлению частиц гладкой формы или в виде кости [33, 57]. В дополнение к стандартному контролю отношения сторон частиц, регулирующего положение плазмонных резонансов (обычно в

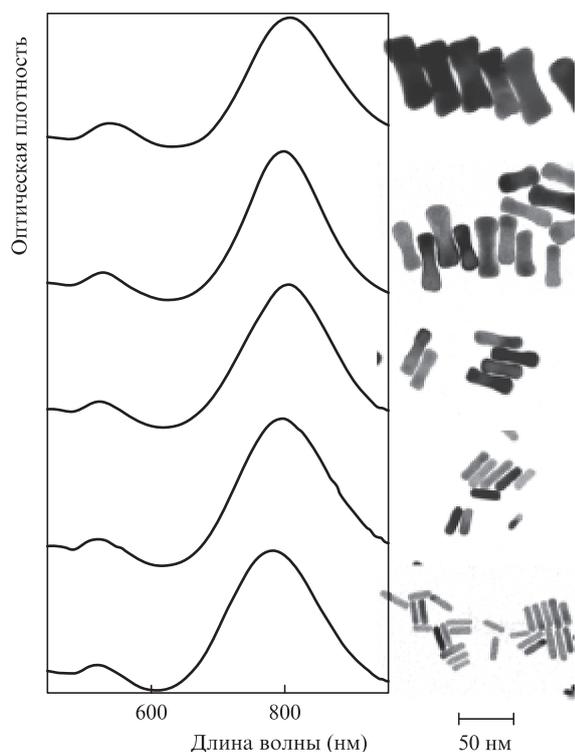


Рис.3. Типичные ТЭМ-микрофотографии золотых наностержней со сходными формами и разными размерами (справа) и их типичные оптические спектры ослабления.

спектральном диапазоне 600–1200 нм), отметим, что размер частиц играет ключевую роль для таких параметров, как отношение оптического рассеяния и поглощения [29, 32] и тепловое сопряжение с окружающей средой. Возможность модулировать все эти параметры оказывается полезной для оптимизации многих фототермических и фотоакустических приложений, в том числе лазерной сварки биоткани.

3.3. Предварительные испытания плазмонных наночастиц для лазерной сварки глазной ткани

С целью доказательства возможности замены органических красителей золотыми наностержнями мы протестировали возможность использования водных суспензий этих наночастиц с плазмонным резонансом в БИК области, попадающей в область оптического поглощения ИЗ, для лазерной сварки модельной глазной ткани – капсулы хрусталика глаза свиньи [34, 58]. Это соединительная ткань с высокой прозрачностью и однородной структурой. Сваривание капсульных клапанов остается одной из важнейших проблем в разработке новых операций в глазной хирургии, например для перезаполнения зрачка. В наших тестах мы смоделировали пересадку части капсулы хрусталика от донора реципиенту. Интерфейс между этими тканями окрашивали водной суспензией золотых наностержней, а лазерное излучение (810 нм) доставлялось через оптическое волокно диаметром 300 мкм. Одиночные импульсы излучения длительностью 40 мс подавались в виде пятен. В этих условиях мы смогли продемонстрировать воспроизводимые сварные швы с механической прочностью, аналогичной прочности нативных тканей при световом потоке в диапазоне 80–110 Дж·см⁻². Фототермические эффекты, ответственные за сварку капсульных участков, обычно выражались в локальной денатурации коллагеновых волокон с последующей макроскопической усадкой ткани более чем на 50% от первоначальной толщины. Хотя об использовании золотых нанооболочек в сочетании с альбуминовым припоем для лазерной сварки мышц и кожи уже сообщалось [57], наши эксперименты впервые подтвердили возможность вызывать функциональные и хорошо локализованные фототермические эффекты непосредственно в биологической ткани при возбуждении подходящих растворов золотых наностержней.

3.4. Лазерно-активируемый нанокомпозитный гель для закрытия сосудов

После предварительной демонстрации целесообразности применения золотых наностержней для лазерной

сварки мы исследовали ряд недостатков, которые могут быть устранены при использовании непокрытых коллоидных суспензий таких наночастиц. В частности, несколько важных проблем лазерной сварки могут быть решены путем включения золотых наностержней в биополимерную матрицу [23]. Введение защитного барьера от физиологической среды повышает стабильность, долговечность и эффективность хромофоров [59]. Кроме того, наночастицы защищаются от агрегации – одной из самых распространенных проблем коллоидных суспензий при контакте с физиологическими жидкостями. В свою очередь, агрегаты плазмонных частиц страдают от значительной потери эффективности фототермического преобразования [60, 61]. С хирургической точки зрения, включение хромофора в биополимерную матрицу создает дополнительные возможности для более удобного манипулирования и улучшенного контроля над его локальной плотностью, что имеет решающее значение с точки зрения воспроизводимости и безопасности применения этой лазерной методики. Кроме того, биополимер, используемый для изготовления нанокомпозита, может играть активную роль во время операции или в послеоперационном периоде, например, улучшая восстановление ткани, уменьшая образование рубцов и даже предотвращая микробные инфекции. Биополимерную матрицу можно также наполнить лекарствами или функциональными молекулами, которые могут оптимизировать или ускорить процесс заживления ран.

В наших ранних экспериментах поверхность золотых наностержней сначала стабилизировалась полиэтиленгликолем (ПЭГ), а затем погружалась в гиалуроновый гель [62]. Выбор гиалуроновой кислоты был обусловлен ее известными физико-химическими и биологическими свойствами и высоким сродством к биоткани [63]. Полученный таким способом нанокомпозитный гель обладал достаточной вязкостью и сохранял оптические характеристики покрываемых золотых наностержней постоянными в течение нескольких месяцев в условиях дневного освещения. Мы протестировали этот материал *in vivo* при лазерном закрытии малых разрезов сосудов в сонной артерии кроликов. При хирургической процедуре гель наносили на поверхность продольного разреза длиной 3 мм на рассеченной аорте (рис.4). Затем рану облучали непрерывным лазером ($\lambda = 810$ нм) с помощью оптического волокна диаметром 300 мкм с оптимальной плотностью мощности 30 Вт·см⁻² и средним временем облучения 50 с. Доплеровский анализ показал, что окклюзия не происходила ни во время операции, ни в течение 30 дней после этого. Кроме того, сразу после вмешательства не наблюдалось ни кровотечения, ни кровоизлияния, а кол-

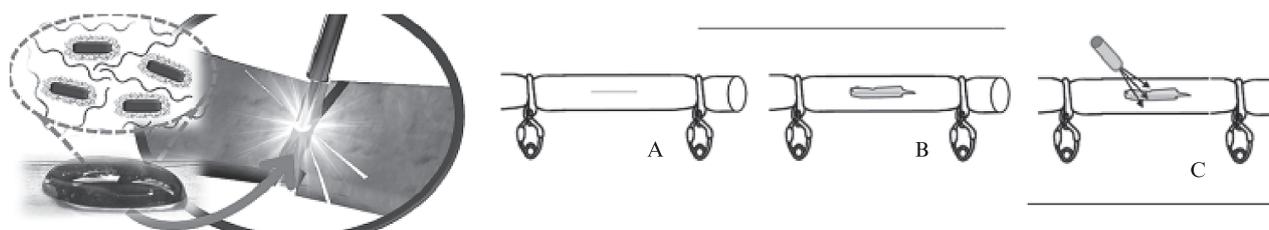


Рис.4. Лазерное закрытие сосудов с использованием геля из гиалуроновой кислоты и золотых наностержней. Общая схема (слева) и детальный процесс (справа) лазерной шивки сосудов. Золотые наностержни покрываются ПЭГ, а затем погружаются в гиалуроновый гель, сохраняя свою первоначальную фототермическую эффективность. После местного наложения геля на края раны доставленное по волокну непрерывное лазерное излучение БИК диапазона обеспечивает прочность сваренного шва.

лагиновые и эластиновые волокна возвращались в нормальное состояние [64].

Обсуждаемый выше лазерный подход технически легко выполним, а использование золотых наночастиц улучшает селективность фототермического воздействия и сводит к минимуму хирургическое повреждение сосудов, оптимизируя процесс заживления. Низкий по сравнению с органическими хромофорами коэффициент диффузии золотых частиц через тканевую матрицу приводит к долговременной задержке частиц в ткани, тогда как органические хромофоры выводятся из организма в течение двух-трех дней. Механизм вывода золотых наностержней из тела все еще остается невыясненным. Специальные исследования послеоперационного распределения в организме золотых наностержней, а также исследования их возможной токсичности должны проводиться для правильной оценки преимуществ нанотехнологий по сравнению со стандартными процедурами.

3.5. Лазерно-активированные гибридные клеящиеся биопленки для восстановления тканей

Для дальнейшей оптимизации лазерной сварки с помощью плазмонных наночастиц мы протестировали гибкие хитозановые пленки, содержащие золотые наностержни [65]. Подобно хитозановым ИЗ-пленкам, обсуждаемым в п.2.2, кислотную смесь золотых наностержней и хитозана разливают в формы и высушивают для получения устойчивых гибких стабильных гибридных пленок толщиной ~ 40 мкм. Интересно, что введение хитозана и повторная промывка в процессе изготовления минимизируют концентрацию остающегося поверхностно-активного цитотоксичного вещества ЦТАБ до уровня ниже 50% ингибирующей концентрации, обуславливая его незначительную токсичность и безопасность для организма человека. Отметим, что относительные концентрации хитозана и золотых наностержней должны быть хорошо сбалансированы, чтобы сохранить оптическое поглощение гибридных пленок близким к поглощению изолированных наночастиц и обеспечить достаточную эффективность фототермического преобразования. Мы продемонстрировали возможность использования пленок на основе золотых наностержней и хитозана для лазерного восстановления артериальной ткани. Эффективное сцепление между пленкой и эксплантированным куском сонной артерии свиньи имело место при импульсном облучении лазером БИК диапазона (длительность 100 мс, энергия 100 мДж, флюенс $140 \text{ Дж}\cdot\text{см}^{-2}$) и формировало область местной сварки. Процесс адгезии изучался с помощью термокамеры и компьютерного моделирования, которые показали, что на границе раздела пленки и ткани необходимо создать температуру около 130°C для активации функциональных фрагментов с обеих сторон, что позволит достичь удовлетворительной (около 12 кПа) прочности [66]. Отметим, что тогда как короткие импульсы (длительностью от фемто- до наносекунд) вызывают, как правило, сильное аккумулялирование тепловой энергии в пределах плазмонной наночастицы с последующим изменением ее формы, с фрагментацией или даже сублимацией золота, миллисекундные импульсы, используемые в нашем протоколе, минимизируют ненужный перегрев отдельных наночастиц, предотвращая тем самым негативные побочные эффекты и обеспечивая точный контроль над фототермическим лечением [65].

4. Лазерно-стимулированное высвобождение лекарств из гибридных губок

Дополнительной возможностью использования лазерно-активируемых нанокомпозитов для биомедицинских приложений является способ, недавно разработанный нами для контролируемой доставки лекарств из имплантируемых устройств. Эти устройства, как правило, состоят из золотых наностержней, распределенных в пористой структуре хитозана, а также включают в себя диспергированные термочувствительные мицеллы, которые могут быть нагружены определенными препаратами (рис.5) [67, 68]. В готовых светореагирующих пористых композитах (губках) сочетается согласованное действие двух основных компонентов – плазмонных наночастиц, которые легко реагируют на внешнее оптическое возбуждение, осуществляя, таким образом, хорошо контролируемое повышение температуры, а также мицеллярных носителей лекарств, химико-структурные свойства которых модифицируются при нагревании, делая возможным хорошо контролируемое высвобождение лекарства. Последнее можно точно модулировать параметрами облучения [69]. В частности, мы тестировали мицеллы поли(капролактон-блок-этиленгликоль-блок-капролактон-тона) поли(КЛ-ЭГ-КЛ), которые показали превосходную способность к накоплению лекарства [70]. Важно отметить, что эти мицеллы имеют фазовый переход в области 40°C , в результате чего происходит их обратимое сжатие примерно на 35% по объему, сохраняющееся и после их введения в пористый хитозан, что вызывает высвобождение лекарства из губки во внешнюю среду.

Мы показали возможность тонкой настройки температуры, генерируемой внутри губки, при непрерывном облучении диодным лазером (длина волны 810 нм) и наличии линейной зависимости между оптической интенсивностью и температурой, при которой происходит высвобождение лекарства (т.е. чуть выше физиологической температуры, от $\sim 40^\circ\text{C}$ до $\sim 50^\circ\text{C}$) [1]. Оптимальные результаты были получены при интенсивности лазерного облучения $0.1-0.5 \text{ Вт}\cdot\text{см}^{-2}$ и времени облучения порядка нескольких минут. Контроль температуры позволяет предотвратить перегрев, снижая вероятность необратимых повреждений здоровых тканей. В свою очередь, точная подстройка температуры обеспечивает согласованность и контроль над дозой высвобождаемого лекарства, зависящей от оптической интенсивности и длительности облучения. Все эти особенности приводят к созданию концепции индивидуальных фармакологических методов лечения, в которых в полной мере используется потенциал лазерно-активированных нанобиоматериалов.

Мы проверили эффективность наших нанокомпозитов для контролируемой химиотерапии раковых клеток. Губки, пропитанные химиотерапевтическим средством доксорубин, были введены в культуру клеток HeLa аденокарциномы шейки матки. Изменяя условия облучения, нам удалось достичь различного уровня гибели клеток. Большие времена активации и большие интенсивности облучения обеспечивали более эффективную химиотерапию. Как и ожидалось, противоопухолевая эффективность доксорубина увеличивалась за счет синергии с гипертермией, которая стимулировала поглощение лекарства клетками в результате временного увеличения текучести плазматической мембраны. Кроме того, имел место улучшенный пространственный контроль за высво-

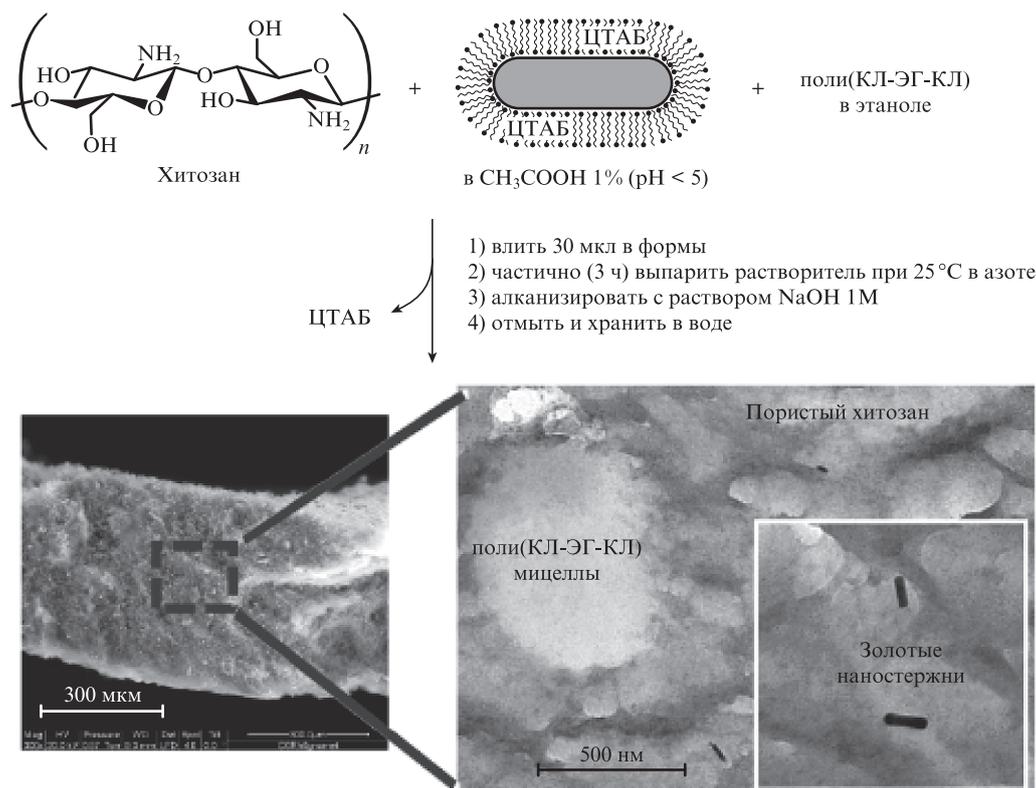


Рис.5. Схема изготовления гибридных губок (из работы [67]). Хитозан растворяют в водной суспензии золотых наностержней с последующим добавлением сополимера поли(КЛ-ЭГ-КЛ). Затем смесь разливают в формы и после трехчасового выпаривания в контролируемых условиях сшивают щелочным раствором с последующим обильной промывкой водой [67]. Внизу: микрофотографии, полученные при сканирующей электронной (слева) и трансмиссионной (справа) электронной микроскопии поперечного сечения губки (на вставке – увеличенный вид золотых наностержней, диспергированных внутри хитозановой матрицы).

бождением лекарства, что мы приписываем термически индуцированной проницаемости клеток, находящихся в тесном контакте с нагреваемой лазером частью губки.

И наконец, мы провели испытания варианта, при котором активация губки для высвобождения ее содержимого в отдельных областях различных тканей животных, в том числе в образцах глазных и желудочно-кишечных тканей, осуществлялась сфокусированным лазерным пучком. Изменяя условия облучения и учитывая оптические свойства различных тканей, мы наблюдали локализованное высвобождение лекарства в тех областях культуры клеток, где губка облучалась. Это создало предпосылки для использования предлагаемого метода с целью доставки лекарства в локализованные области ткани с уникальной пространственной точностью, обусловленной контролем размера лазерного пучка и дозы лекарства, которую можно заранее определить при выборе определенных параметров облучения. Например, эти особенности могут представлять интерес для разработки современных персонализированных методов фармакотерапии, требующих точной дозировки препаратов, доставляемых в конкретные области ткани.

5. Заключение

На примере лазерного восстановления тканей мы обсудили некоторые из последних достижений в комбинированном использовании лазерного излучения, а также органических хромофоров и нанохромофоров с оптическим поглощением в так называемом терапевтическом окне БИК области спектра, где глубина проникновения

света в биоткань максимальна. Такая технология может заменить традиционные хирургические процедуры благодаря ряду преимуществ, включая возможность создания мгновенных водонепроницаемых пломб без инородного шовного материала. Недавний прогресс в разработке и синтезе новых наночастиц с универсальным оптическим откликом может улучшить имеющуюся технологию восстановления тканей на основе использования органических красителей и расширить спектр ее применения. Дальнейшее развитие предполагает применение гибридных материалов, полученных путем дисперсии хромофора в биополимерной матрице, с целью упрощения их использования, улучшения воспроизводимости и придания дополнительных функций. Примером является введение золотых наностержней в хитозановую пленку, которую можно точно прикрепить к биоткани с помощью импульсного лазерного облучения. Когда термочувствительный резервуар с лекарством добавляют к нанокompозиту, стимуляция маломощным излучением может способствовать высвобождению лекарства, локализация и дозировка которого контролируются путем изменения оптической интенсивности и времени облучения. Рассмотрение универсальности использования плазмонных наночастиц, проведенное в этом обзоре, позволяет считать, что дальнейшее развитие лазерной технологии и метода синтеза новых нанокompозитов должно привести к созданию многофункциональных терапевтических платформ, способствующих улучшению медицинского обслуживания.

1. Niemz M.-H. *Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications* (Berlin: Springer, 2004).

2. Menabuoni L., Canovetti A., Rossi F., Malandrini A., Lenzetti I., Pini R. *Acta Ophthalmol.*, **91**, e494 (2013).
3. Pini R., Rossi F., Matteini P., Ratto F. *Laser Tissue Welding in Minimally Invasive Surgery and Microsurgery*, in *Biophotonics* (Berlin: Springer, 2008).
4. Matteini P., Rossi F., Ratto F., Pini R. *Laser Welding of Biological tissue: Mechanisms, Applications and Perspectives*, in *Laser Imaging & Manipulation in Cell Biology* (Berlin: Wiley-VCH, 2010).
5. Esposito G., Rossi F., Matteini P., Puca A., Albanese A., Sabatino G., Maira G., Pini R. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, **25**, 145 (2011).
6. Bass L.S., Treat M.R. *Lasers Surg. Med.*, **17**, 315 (1995).
7. McNally K.M. *Laser Tissue Welding*, in *Biomedical Photonics Handbook* (Boca Raton: CRC Press, 2003).
8. McNally K.M., Sorg B.S., Welch A.J., Dawes J.M., Owen E.R. *Physics in Medicine and Biology*, **44**, 983 (1999).
9. Matteini P., Rossi F., Menabuoni L., Pini R. *Laser Surg. Med.*, **39**, 597 (2007).
10. Matteini P., Sbrana F., Tiribilli B., Pini R. *Laser Med. Sci.*, **24**, 667 (2009).
11. Matteini P., Cicchi R., Ratto F., Kapsokalyvas D., Rossi F., de Angelis M., Pavone F.S., Pini R. *Biophys. J.*, **103**, 1179 (2012).
12. Rossi F., Matteini P., Bruno I., Nesi P., Pini R. *Opt. Express*, **15**, 11178 (2007).
13. Matteini P., Ratto F., Rossi F., Cicchi R., Stringari C., Kapsokalyvas D., Pavone F.S., Pini R. *Opt. Express*, **17**, 4868 (2009).
14. Landsman M.L., Kwant G., Mook G.A., Zijlstra W.G. *J. Appl. Physiol.*, **40**, 575 (1976).
15. Thaler S., Schuttauf F., Haritoglou C. *Ophthalmologe*, **106**, 11 (2009).
16. Menabuoni L., Pini R., Rossi F., Lenzetti I., Yoo S.H., Parel J.M. *J. Cataract. Refr. Surg.*, **33**, 1608 (2007).
17. Buzzonetti L., Capozzi P., Petrocelli G., Valente P., Petroni S., Menabuoni L., Rossi F., Pini R. *J. Cataract. Refr. Surg.*, **39**, 1829 (2013).
18. Rossi F., Matteini P., Ratto F., Menabuoni L., Lenzetti I., Pini R. *J. Biophotonics*, **1**, 331 (2008).
19. Esposito G., Rossi F., Puca A., Albanese A., Sabatino G., Matteini P., Lofrese G., Maira G., Pini R. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, **24**, 307 (2010).
20. Esposito G., Rossi F., Matteini P., Scerrati A., Puca A., Albanese A., Rossi G., Ratto F., Maira G., Pini R. *Laser Surg. Med.*, **45**, 318 (2013).
21. Lauto A., Stoodley M., Marcel H., Avolio A., Sarris M., McKenzie G., Sampson D.D., Foster L.J.R. *Laser Surg. Med.*, **39**, 19 (2007).
22. Lauto A., Hook J., Doran M., Camacho F., Poole-Warren L.A., Avolio A., Foster L.J.R. *Laser Surg. Med.*, **36**, 193 (2005).
23. Ratto F., Matteini P., Centi S., Rossi F., Pini R. *J. Biophotonics*, **4**, 64 (2011).
24. Saxena V., Sadoqi M., Shao J. *J. Pharm. Sci.*, **92**, 2090 (2003).
25. Hu M., Chen J.Y., Li Z.Y., Au L., Hartland G.V., Li X.D., Marquez M., Xia Y.N. *Chem. Soc. Rev.*, **35**, 1084 (2006).
26. Murphy C.J., Gole A.M., Stone J.W., Sisco P.N., Alkilany A.M., Goldsmith E.C., Baxter S.C. *Accounts Chem. Res.*, **41**, 1721 (2008).
27. Huang X.H., Neretina S., El-Sayed M.A. *Adv. Mater.*, **21**, 4880 (2009).
28. Matteini P., Ratto F., Rossi F., Pini R. *J. Biomed. Opt.*, **17**, 0107011 (2012).
29. Jain P.K., Lee K.S., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. *J. Phys. Chem. B*, **110**, 7238 (2006).
30. Mercatelli R., Romano G., Ratto F., Matteini P., Centi S., Cialdai F., Monici M., Pini R., Fusi F. *Appl. Phys. Lett.*, **99**, 131113 (1–3) (2011).
31. Grzelczak M., Perez-Juste J., Mulvaney P., Liz-Marzan L.M. *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 1783 (2008).
32. Ratto F., Matteini P., Rossi F., Pini R. *J. Nanopart. Res.*, **12**, 2029 (2010).
33. Ratto F., Matteini P., Cini A., Centi S., Rossi F., Fusi F., Pini R. *J. Nanopart. Res.*, **13**, 4337 (2011).
34. Ratto F., Matteini P., Rossi F., Menabuoni L., Tiwari N., Kulkarni S.K., Pini R. *Nanomed-Nanotechnol.*, **5**, 143 (2009).
35. Alkilany A.M., Murphy C.J. *J. Nanopart. Res.*, **12**, 2313 (2010).
36. Khlebtsov N., Dykman L. *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 1647 (2011).
37. Agarwal A., Huang S.W., O'Donnell M., Day K.C., Day M., Kotov N., Ashkenazi S. *J. Appl. Phys.*, **102**, 064701 (2007).
38. Li P.C., Wang C.R.C., Shieh D.B., Wei C.W., Liao C.K., Poe C., Jhan S., Ding A.A., Wu Y.N. *Opt. Express*, **16**, 18605 (2008).
39. Mallidi S., Larson T., Tam J., Joshi P.P., Karpiouk A., Sokolov K., Emelianov S. *Nano Lett.*, **9**, 2825 (2009).
40. Huang X.H., El-Sayed I.H., Qian W., El-Sayed M.A. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2115 (2006).
41. Chen J.Y., Wang D.L., Xi J.F., Au L., Siekkinen A., Warsen A., Li Z.Y., Zhang H., Xia Y.N., Li X.D. *Nano Lett.*, **7**, 1318 (2007).
42. Dickerson E.B., Dreaden E.C., Huang X.H., El-Sayed I.H., Chu H.H., Pushpanketh S., McDonald J.F., El-Sayed M.A. *Cancer Lett.*, **269**, 57 (2008).
43. Niidome T., Yamagata M., Okamoto Y., Akiyama Y., Takahashi H., Kawano T., Katayama Y., Niidome Y. *J. Control Release*, **114**, 343 (2006).
44. Prencipe G., Tabakman S.M., Welscher K., Liu Z., Goodwin A.P., Zhang L., Henry J., Dai H.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 4783 (2009).
45. Rayavarapu R.G., Petersen W., Hartsuiker L., Chin P., Janssen H., van Leeuwen F.W.B., Otto C., Manohar S., van Leeuwen T.G. *Nanotechnology*, **21**, 145101 (2010).
46. El-Sayed I.H., Huang X.H., El-Sayed M.A. *Nano Lett.*, **5**, 829 (2005).
47. Loo C., Lowery A., Halas N.J., West J., Drezek R. *Nano Lett.*, **5**, 709 (2005).
48. Huff T.B., Tong L., Zhao Y., Hansen M.N., Cheng J.X., Wei A. *Nanomedicine-UK*, **2**, 125 (2007).
49. Shi X.G., Wang S.H., Meshinchi S., Van Antwerp M.E., Bi X.D., Lee I.H., Baker J.R. *Small*, **3**, 1245 (2007).
50. Tong L., Wei Q.S., Wei A., Cheng J.X. *Photochem. Photobiol.*, **85**, 21 (2009).
51. Lu W., Zhang G.D., Zhang R., Flores L.G., Huang Q., Gelovani J.G., Li C. *Cancer Res.*, **70**, 3177 (2010).
52. Stanwix H. *Nanomedicine-UK*, **8**, 10 (2013).
53. Lapotko D.O., Lukianova E., Oraevsky A.A. *Laser Surg. Med.*, **38**, 631 (2006).
54. Nikoobakht B., El-Sayed M.A. *Langmuir*, **17**, 6368 (2001).
55. Daniel M.C., Astruc D. *Chem. Rev.*, **104**, 293 (2004).
56. Nikoobakht B., El-Sayed M.A. *Chem. Mater.*, **15**, 1957 (2003).
57. Gou L.F., Murphy C.J. *Chem. Mater.*, **17**, 3668 (2005).
58. Pini R., Rossi F., Menabuoni L., Lenzetti I., Yoo S., Parel J.M. *Ophthal Surg. Las. Im.*, **39**, 260 (2008).
59. Mercatelli R., Ratto F., Centi S., Soria S., Romano G., Matteini P., Quercioli F., Pini R., Fusi F. *Nanoscale*, **5**, 9645 (2013).
60. Ungureanu C., Kroes R., Petersen W., Groothuis T.A.M., Ungureanu F., Janssen H., van Leeuwen F.W.B., Kooyman R.P.H., Manohar S., van Leeuwen T.G. *Nano Lett.*, **11**, 1887 (2011).
61. Joshi P.P., Yoon S.J., Hardin W.G., Emelianov S., Sokolov K.V. *Bioconjugate Chem.*, **24**, 878 (2013).
62. Matteini P., Ratto F., Rossi F., Rossi G., Esposito G., Puca A., Albanese A., Maira G., Pini R. *J. Biomed. Opt.*, **15**, 041508 (2010).
63. Matteini P., Dei L.G., Carretti E., Volp N., Goti A., Pini R. *Biomacromolecules*, **10**, 1516 (2009).
64. Esposito G., Rossi F., Matteini P., Ratto F., Sabatino G., Puca A., Albanese A., Rossi G., Marchese E., Maira G., Pini R. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, **26**, 447 (2012).
65. Matteini P., Ratto F., Rossi F., Centi S., Dei L., Pini R. *Adv. Mater.*, **22**, 4313 (2010).
66. Matteini P., Ratto F., Rossi F., de Angelis M., Cavigli L., Pini R. *J. Biophotonics*, **5**, 868 (2012).
67. Matteini P., Martina M.R., Giambastiani G., Tatini F., Cascella R., Ratto F., Cecchi C., Caminati G., Dei L., Pini R. *J. Mater. Chem. B*, **1**, 1096 (2013).
68. Matteini P., Tatini F., Luconi L., Ratto F., Rossi F., Giambastiani G., Pini R. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **52**, 5956 (2013).
69. Stuart M.A.C., Huck W.T.S., Genzer J., Muller M., Ober C., Stamm M., Sukhorukov G.B., Szleifer I., Tsukruk V.V., Urban M., Winnik F., Zauscher S., Luzinov I., Minko S. *Nat. Mater.*, **9**, 101 (2010).
70. Zhou S.B., Deng X.M., Yang H. *Biomaterials*, **24**, 3563 (2003).