

ЛАЗЕРНАЯ СПАЙКА ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ С КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИМ БИОМАТЕРИАЛОМ (ИССЛЕДОВАНИЕ *in vitro*)

DOI: 10.17691/stm2023.15.6.04

УДК 616–003.973:615.849.19

Поступила 22.06.2023 г.

© Н.Ю. Игнатьева, д.х.н., доцент химического факультета^{1, 2};
О.Л. Захаркина, научный сотрудник³;
А.П. Свиридов, д.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник³

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991;

²Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», ул. Мясницкая, 20, Москва, 101000;

³Институт фотонных технологий Федерального научно-исследовательского центра «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук, ул. Пионерская, 2, Москва, Троицк, 108840

Цель исследования — оценка эффективности лазерной спайки биологических тканей и материалов для объемного прогрева альбуминового припоя на примере соединения интактного и химически модифицированного хрящей перегородки носа свиньи.

Материалы и методы. Материалами для соединения служили двукратно трипсинизированные и обработанные глицериновым альдегидом пластины, изготовленные из хряща перегородки носа свиньи, и интактный хрящ. Для спайки этих материалов в качестве припоя использовали 25% раствор альбумина. Место соединения прогревали лазерным излучением с длинами волн 1,56 и 1,68 мкм посредством оптического волокна. Процесс контролировали с помощью цифрового USB-микроскопа. После соединения материалов проводили механические испытания образцов, а также определяли долю интактного коллагена в областях, прилегающих к припою. С помощью тепловизора регистрировали динамику температурного поля в области лазерного воздействия.

Результаты. Эффективная спайка хрящевой ткани с коллагенсодержащим биоматериалом происходит при последовательном нанесении и лазерной обработке двух/трех слоев припоя для излучений с длинами волн 1,68/1,56 мкм соответственно. Плотности мощности излучения в слоях припоя составляли 0,7/0,8 Вт/мм² (средняя температура поверхности ~85°C) для $\lambda=1,68$ мкм и 1,77/1,34/0,96 Вт/мм² (средняя температура поверхности ~100°C) для $\lambda=1,56$ мкм. Предел прочности спаянных образцов достигал ~12% для $\lambda=1,56$ мкм и ~15% для $\lambda=1,68$ мкм от предела прочности интактного хряща. В областях ткани, прилегающих к первому слою альбумина, на толщине ~300 мкм большая часть коллагенового каркаса была разрушена. В остальных областях коллаген преимущественно сохранился.

Заключение. Лазерная спайка химически модифицированного и интактного хрящей может эффективно осуществляться с помощью излучения с $\lambda=1,56$ мкм и $\lambda=1,68$ мкм, поглощаемого не только припоем, но и самой тканью. Однако для минимизации области деградации необходимо достичь соответствия диаметра лазерного пятна и размера заполненного припоем зазора между конструкцией и интактным хрящом.

Ключевые слова: лазерная спайка; хрящевая ткань; денатурация коллагена.

Как цитировать: Ignatieva N.Yu., Zakharkina O.L., Sviridov A.P. Laser soldering of cartilage tissue to collagenous biomaterial (an *in vitro* study). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(6): 31, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.6.04>

Для контактов: Игнатьева Наталия Юрьевна, e-mail: nyu@kge.msu.ru

Laser Soldering of Cartilage Tissue to Collagenous Biomaterial (an *in vitro* Study)

N.Yu. Ignatieva, DSc, Associate Professor, Faculty of Chemistry^{1,2};

O.L. Zakharkina, MSc, Researcher³;

A.P. Sviridov, DSc, Leading Researcher³

¹Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia;

²National Research University Higher School of Economics, 20 Myasnitskaya St., Moscow, 101000, Russia;

³Institute of Photonic Technologies of Federal Scientific Research Center "Crystallography and Photonics" of the Russian Academy of Sciences, 2 Pionerskaya St., Moscow, Troitsk, 108840, Russia

The aim of the study was to assess the effectiveness of laser soldering of biological tissues and materials for bulk heating of albumin solder on the joints of the intact and chemically modified cartilage of the porcine nasal septum.

Materials and Methods. The materials for soldering were double-trypsinized and glyceraldehyde-treated plates made from cartilage of the porcine nasal septum, and intact cartilage. A 25% albumin solution was used as a solder. The junction was heated by laser radiation with the wavelengths of 1.56 and 1.68 μm through an optical fiber. The process was monitored using a digital USB microscope. After the materials were soldered, mechanical tests of the samples were conducted, and the fraction of intact collagen in the areas adjacent to the solder was determined. A thermal imager was used to record the dynamics of the temperature field in the area of laser exposure.

Results. The effective soldering of cartilage tissue with collagenous biomaterial occurs with sequential application and laser heating of two/three layers of solder for radiation with wavelengths of 1.68/1.56 μm , respectively. The laser power densities for the solder layers were 0.7/0.8 W/mm² (the average surface temperature $\sim 85^\circ\text{C}$) for $\lambda=1.68 \mu\text{m}$ and 1.77/1.34/0.96 W/mm² (the average surface temperature $\sim 100^\circ\text{C}$) for $\lambda=1.56 \mu\text{m}$. The tensile strength of the soldered samples reached $\sim 12\%$ for $\lambda=1.56 \mu\text{m}$ and $\sim 15\%$ for $\lambda=1.68 \mu\text{m}$ of the tensile strength of intact cartilage. In the tissue areas adjacent to the first layer of albumin, at a thickness of $\sim 300 \mu\text{m}$, most of the collagen network was destroyed. In other areas, collagen was predominantly preserved.

Conclusion. Laser soldering of chemically modified and intact cartilages can be effectively conducted using radiation of $\lambda=1.56 \mu\text{m}$ and $\lambda=1.68 \mu\text{m}$, absorbed not only by the solder, but also by the tissue. However, to minimize the area of degradation, it is necessary to match the diameter of the laser spot and the size of the solder-filled cavity between the construction and the intact cartilage.

Key words: laser soldering; cartilage tissue; collagen denaturation.

Введение

Применение лазерной спайки тканей в клинической практике в качестве перспективного бесшовного метода соединения поврежденных коллагенсодержащих тканей обсуждается более 25 лет [1–4]. Методика заключается в нанесении припоя (концентрированного раствора альбумина, зачастую с добавлением сенсбилизатора–хромофора) на место соединения тканей и обработке нанесенного слоя лазерным излучением. Если в качестве источника излучения используются лазеры с длиной волны 0,8–1,0 мкм, то в качестве хромофора применяют органические красители [1–7]. Для увеличения прочности спайки возможно добавление в материал припоя углеродных нанотрубок [6, 7]. Эффективность процедуры *in vivo* была подтверждена на примере лазерной спайки кожи кролика [6]. Одним из основных достоинств использования хромофоров в припое декларируется отсутствие поглощения излучения самой тканью. Однако из-за таких особенностей лазерного воздействия, как его длительность (~ 60 с) и значительный диаметр лазерного пятна (~ 5 мм), нагрев ткани происходит за счет теплоотвода из области непосредственного облучения.

Излучение с длиной волны более 1,3 мкм может поглощаться водой в соответствии с положением полос в спектре поглощения [8], при этом хромофор не вводится в состав припоя и время воздействия оказывается меньше (~ 10 с) [9]. В ряде работ лазерная спайка осуществлялась при $\lambda=10,6$ мкм [10–12] и $\lambda=1,9$ мкм [9, 13–15]. Отметим, что применение излучения с $\lambda=10,6$ мкм приводит к разогреву слоя на ~ 30 мкм [8] и соединение концов ткани происходит лишь по поверхности, причем прилегающая к припою ткань подвергается значительной деградации, вплоть до карбонизации [12]. Глубина проникновения излучения при $\lambda=1,9$ мкм в 25% раствор альбумина и в ткань составляет $\sim 0,2$ мм [8], что обеспечивает больший объем прогрева. Однако, как показано на примере спайки роговицы свиньи *in vivo*, и в этом случае наблюдается деградация края ткани [9]. Отметим, что лазерная спайка при воздействии излучения с $\lambda=2,09$ мкм, с глубиной проникновения, близкой к таковой для $\lambda=1,9$ мкм [8], была применена в клинической практике с целью соединения аутентичной ткани/титанового протеза и слуховой косточки для восстановленных элементов цепи звукопроводящей системы [16]. Авторы [16] доказали, что лазерная

спайка биотканей повышает надежность фиксации элементов звукопроводящей системы среднего уха при оксидулопластике.

Лазерная спайка хрящевой ткани проводилась на моделях *in vitro* для аутоимплантатов суставного хряща и хряща трахеи с использованием излучения с $\lambda=0,808$ мкм [5] и $\lambda=1,9$ мкм [14] соответственно. Авторы этих работ показали, что в случае нанесения припоя лишь со стороны поверхности лазерного облучения припой остается на поверхности. Для более эффективной фиксации требуется заполнение и отверждение припоя по всей глубине соединяющихся краев ткани, что возможно лишь на подложке [5].

Фиксация скаффолда является важной задачей в тканевой инженерии замещения остеохондрального дефекта. В работе [17] мы предложили использовать для этих целей тканеинженерную конструкцию на основе децеллюризованного хряща. Эта конструкция имеет высоту 2 мм, и ее матрица отличается меньшей термической стабильностью, чем матрица хрящевой ткани. Для лазерной спайки скаффолда с хрящом необходимо выполнить некоторые условия воздействия. С одной стороны, припой должен заполнять все пространство контакта конструкции и хряща, а излучение — проникать по всей глубине припоя. С другой стороны, повреждение матрикса конструкции должно быть по возможности минимальным.

Цель исследования — оценка эффективности лазерной спайки с использованием излучения с длиной волны 1,56 и 1,68 мкм для локального объемного прогрева припоя на примере соединения химически модифицированного хряща (аналога тканеинженерной конструкции) и хрящевой ткани при минимизации деградации коллагеновой матрицы.

Материалы и методы

Материалы. В качестве исходных материалов использовали пластины из гиалинового хряща перегородки носа свиньи. Из части материала были приготовлены аналоги тканеинженерной конструкции (АТК). Методика приготовления АТК из исходного хряща детально описана в работе [17] и включала все стадии за исключением точечного лазерного воздействия. Стабилизацию проводили в 0,02 М растворе глицеральдегида в течение 54 ч.

Из исходного хряща и АТК нарезали полоски шириной $4,0 \pm 0,4$ мм, толщиной $1,9 \pm 0,3$ мм и длиной 14–18 мм. С помощью специального ножа на одной стороне каждой полоски делали косой срез под углом 15° . Далее выбирали по одной полоске каждого материала и соединяли их на гидрофобной поверхности. Для оценки деградации подложки в отдельных экспериментах полоски укладывали на трипсинизированный хрящ толщиной $0,6 \pm 0,2$ мм (рис. 1).

В качестве припоя использовали 25% раствор бычьего сывороточного альбумина (A7030-100G; Sigma-Aldrich, США).

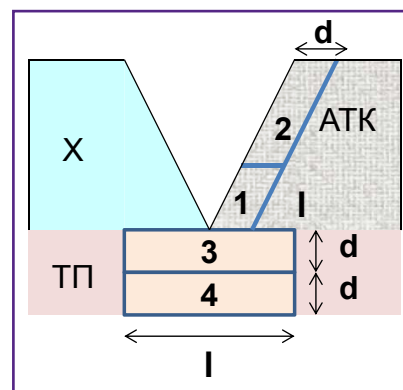


Рис. 1. Расположение интактного хряща (Х), аналога тканеинженерной конструкции (АТК), трипсинизированной подложки (ТП) и областей, используемых для термического анализа:

1 — часть, спаянная с первым слоем альбумина, $d=0,4 \pm 0,1$ мм, $l=0,7 \pm 0,1$ мм; 2 — часть, спаянная со вторым/третьим слоем альбумина, $d=0,4 \pm 0,1$ мм, $l=1,3 \pm 0,1$ мм; 3 — верхняя часть подложки, $d=0,3 \pm 0,1$ мм, $l=1,4 \pm 0,2$ мм; 4 — нижняя часть подложки, $d=0,3 \pm 0,1$ мм, $l=1,4 \pm 0,2$ мм

Методика эксперимента. Щель между АТК и интактным хрящом заполняли 25% раствором альбумина объемом 8 мкл. Первая доза альбумина частично затекла под образец и не заполняла щель полностью. После лазерного воздействия первый слой создавал подложку, на которой следующая доза альбумина (5 мкл) удерживалась без вытекания. После повторного лазерного воздействия создавался второй слой. В случае излучения с $\lambda=1,68$ мкм двух слоев альбумина оказалось достаточно для полного закрытия щели. В случае использования излучения с $\lambda=1,56$ мкм наносили третий слой альбумина, на который оказывалось лазерное воздействие.

В экспериментах использовали два источника непрерывного лазерного излучения: допированный эрбием волоконный лазер с $\lambda=1,56$ мкм и волоконный рамановский лазер с $\lambda=1,68$ мкм (оба производства «ИРЭ-Полус», Россия). Мощность излучения контролировали измерителем мощности UP12-H (Gentec Electro-Optics, Канада). Излучение с $\lambda=1,56$ мкм и $\lambda=1,68$ мкм подавалось через оптическое кварцевое волокно с числовой апертурой 0,22 и диаметром сердцевины 400 и 600 мкм соответственно.

Образец на подложке размещали горизонтально, волокно располагали над ним. Все перемещения выполняли с помощью микрометрических винтов. Расстояние от торца волокна до облучаемой поверхности составляло от 1 до 3 мм для разных слоев альбумина. Воздействие осуществляли точно в течение 10 с, расстояние между центрами лазерных пятен равнялось радиусу лазерного пятна. Процесс облучения зоны спайки контролировали с помощью цифрового USB-микроскопа Dino-Lite Premier (Dino-Life, Тайвань). Установка изображена на рис. 2. Для

каждого режима воздействия получали от 12 до 15 образцов.

После воздействия определяли толщину и ширину образцов в зоне спайки и проводили механические испытания образцов. Затем для каждого режима воздействия у трех образцов АТК отделяли области, непосредственно примыкающие к зоне спайки, и исследовали сохранение коллагена в них с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). На рис. 1 схематично изображены области припаянного АТК и трипсинизированной подложки, подвергаемые ДСК-анализу.

Помимо этого для одного из режимов и трех образцов механические испытания проводили после выдерживания образцов в 0,15 М растворе NaCl в течение 24 ч.

В отдельном эксперименте регистрировали динамику температурного поля. Установка была аналогична представленной на рис. 2, однако вместо микроскопа закрепляли камеру тепловизора FLIR A655sc с объективом FOL25 (FLIR Systems Inc., США). Частота кадров составляла 3,125 Гц. Пространственное разрешение составляло 10 пкс/мм. С помощью программного обеспечения FLIR Research IR Max проводили обработку термограмм и определяли динамику максимальной температуры, достигаемой на поверхности, среднюю температуру нагрева в зоне облучения и температурный профиль по диаметру зоны нагрева.

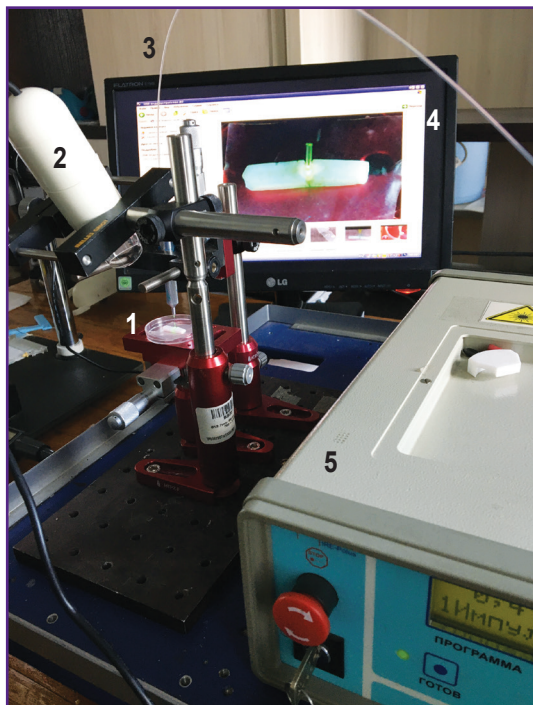


Рис. 2. Экспериментальная установка для лазерной спайки:

1 — образец; 2 — цифровой USB-микроскоп; 3 — оптическое волокно; 4 — монитор с изображением объекта; 5 — лазер

Термический анализ. Термическое поведение образцов исследовали на дифференциальном сканирующем калориметре (модель DSC 204 Phoenix; Netzsch, Германия). Образцы массой 1,5–3,0 мг герметично закрывали в стандартных алюминиевых чашках объемом 20 мкл. В случае применения раствора альбумина в чашку помещали 10 мкл этого раствора. Начальная и конечная температура составляли 20 и 90°C соответственно, скорость нагрева — 10 К/мин. Долю интактного белка (β) в образце определяли по уменьшению теплового эффекта ΔH денатурации в экспериментальных образцах: $\beta = \Delta H / \Delta H_d$, где ΔH_d и ΔH — тепловой эффект денатурации коллагена в образцах областей спайки 1–4 и аналоге конструкции без лазерного воздействия.

Механические испытания. Механические испытания проводили на универсальной настольной испытательной машине EZ Test (модель EZ-SX; Shimadzu, Япония) при комнатной температуре в условиях одноосного растяжения. В процессе растяжения со скоростью 0,2 мм/с автоматически регистрировали данные в координатах «сила–ход» и затем рассчитывали предел прочности.

Статистическая обработка данных. Экспериментальные данные механического анализа обрабатывали с использованием пакета программ OriginPro 2015 (OriginLab Corporation, США). Соответствие выборки значений предела прочности нормальному распределению оценивали по критерию Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения определяли среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD). Разницу между средними величинами независимых выборок для образцов после воздействия излучением с $\lambda = 1,56$ мкм и $\lambda = 1,68$ мкм оценивали по двухвыборочному непарному t -критерию Стьюдента. Необходимое для применения t -критерия условие равенства дисперсий проверяли по F -критерию Фишера. Отметим, что применение U -критерия Манна–Уитни для выявления различия в средних значениях показалось нам нецелесообразным ввиду некоторого количества совпадающих значений в выборочных данных.

Если распределение отличалось от нормального, а также в случаях, когда объем выборки не превышал четырех единиц, данные были представлены в виде диапазона полученных значений (\min – \max).

Результаты

Термический анализ 25% раствора альбумина показал, что денатурация этого белка происходит в две стадии в диапазоне 40–70°C (рис. 3, а, кривая 1) с тепловым эффектом 15,6±0,5 Дж/г. Коллаген в материале АТК денатурировал в диапазоне 61–69°C с максимумом 65±1°C (рис. 3, б, кривая 1). Тепловой эффект денатурации ΔH_d составлял 10±1 Дж/г.

На начальном этапе эксперимента по лазерной спайке образцов установлена минимальная плот-

ность мощности (I_{\min}) для воздействия на первый слой альбумина, ниже которой спайка тканей не происходила. Часть альбумина в припое после такого воздействия оставалась интактной (рис. 3, а, кривая 2). После лазерного воздействия с плотностью мощности, равной I_{\min} , конечный результат спайки тканей оказался непредсказуем. Некоторые образцы разъединялись даже при осторожных манипуляциях, что делало невозможным проведение их механических испытаний. При повышении плотности мощности выше I_{\min} весь альбумин припоя денатурировал при лазерном облучении (рис. 3, а, кривая 3) и система интактный хрящ–АТК была стабильной. Механические испытания подтвердили, что спаянные части ведут себя как единое целое (рис. 4, а, б); предел прочности σ достигал значительных величин

(табл. 1), хотя и меньших, чем $\sigma=5,8$ МПа для интактного образца (рис. 4, в).

В табл. 1 представлены характеристики лазерного воздействия при $I=I_{\min}$ и $I>I_{\min}$, а также результаты механических испытаний спаянных образцов. Отметим, что в образцах, спаянных с помощью лазера ($\lambda=1,68$ мкм, плотность мощности — $0,7$ Вт/мм²) на поверхности 1-го слоя альбумина наблюдалось уменьшение предела прочности в 1,5–2,5 раза после гидратации (рис. 4, б).

Термический анализ АТК и трипсинизированной подложки в областях спайки (см. рис. 2) показал, что происходит заметная деградация коллагенового каркаса, прилежащего к первому слою альбумина (см. табл. 1).

Анализ динамики максимальной T_{\max} и средней

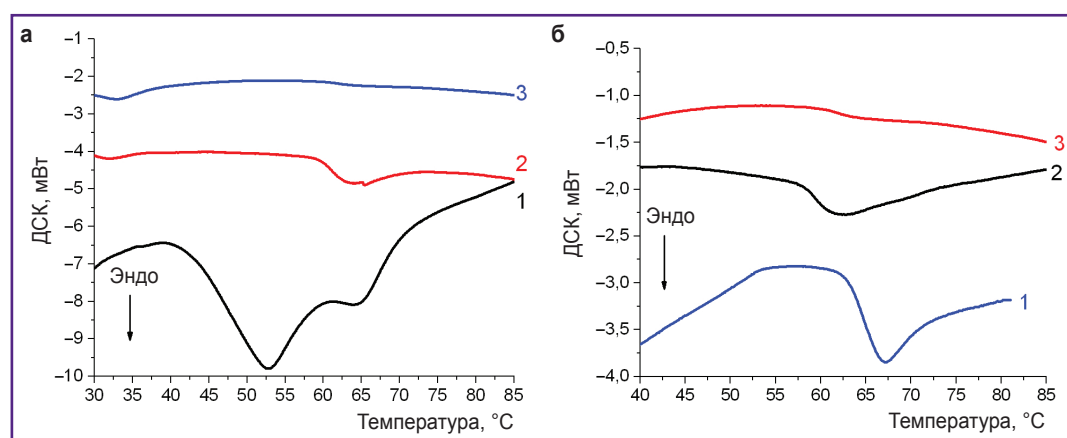


Рис. 3. Примеры ДСК-термограмм, иллюстрирующих количество интактных макромолекул белка, претерпевающих денатурацию при нагреве в калориметре:

альбумин (а) исходный (кривая 1); в материале припоя после воздействия излучения с $\lambda=1,56$ мкм, плотностью мощности $1,20/1,10/0,85$ Вт/мм² (кривая 2); в материале припоя после воздействия излучения с $\lambda=1,56$ мкм, плотностью мощности $1,77/1,34/0,96$ Вт/мм² (кривая 3);

коллаген (б) в материале АТК (кривая 1); в области 1 АТК после воздействия излучения с $\lambda=1,68$ мкм, плотностью мощности $0,70/0,80$ Вт/мм² (кривая 2); в области 2 АТК после воздействия излучения с $\lambda=1,68$ мкм, плотностью мощности $0,70/0,80$ Вт/мм² (кривая 3). Стрелкой указано направление изменения сигнала из-за протекания в системе эндотермического процесса

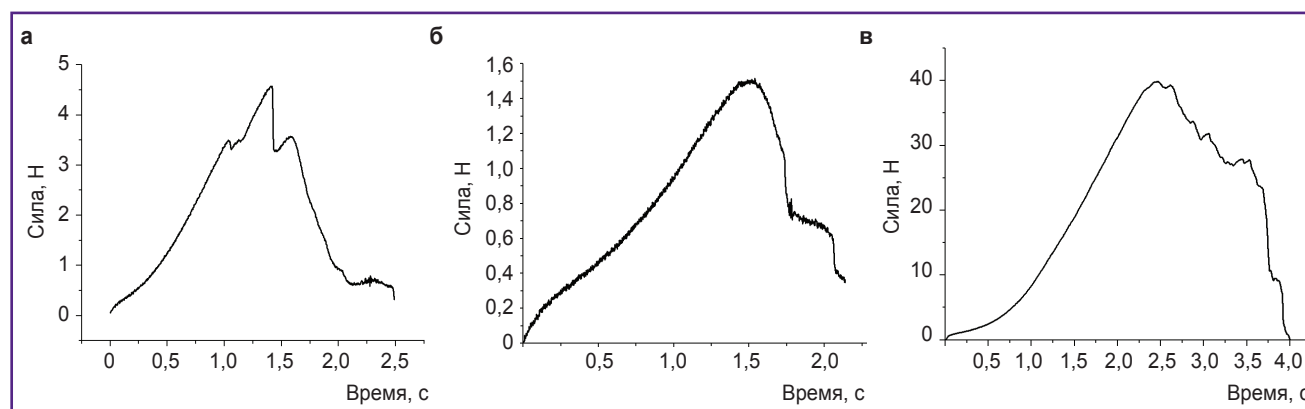


Рис. 4. Типичные примеры результатов механических испытаний качества спайки образцов ($\lambda=1,68$ мкм) на универсальной испытательной машине:

а — спайка интактного хряща и АТК; б — спайка интактного хряща и АТК после гидратации; в — интактный хрящ

Таблица 1

Параметры лазерного воздействия и характеристики образцов

I, в 1/2/3 слое альбумина, Вт/мм ²	Предел прочности σ , МПа (min-max, M \pm SD)	Доля интактного коллагена β в областях, %			
		1	2	3	4
$\lambda=1,56$ мкм					
1,41/1,34/0,96	0–0,2	50–60	>95	80–90	100
1,77/1,34/0,96	0,7 \pm 0,2*	30–40	80–90	60–70	100
$\lambda=1,68$ мкм					
0,55/0,80	0–0,15	10–15	70–90	20–30	80–100
0,7/0,8	0,85 \pm 0,20*	<10	60–80	10–20	60–80

* средние значения σ статистически значимо не различались.

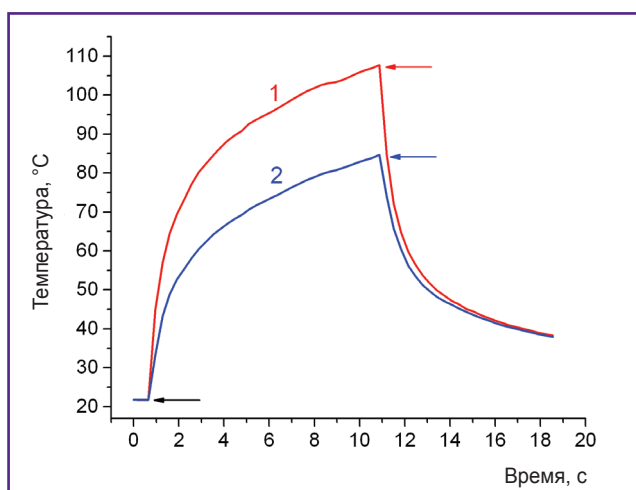


Рис. 5. Типичная динамика максимальной (1) и средней (2) температуры на примере воздействия лазерного излучения с длиной волны 1,68 мкм на второй слой альбумина

Стрелки указывают на начало и окончание лазерного облучения

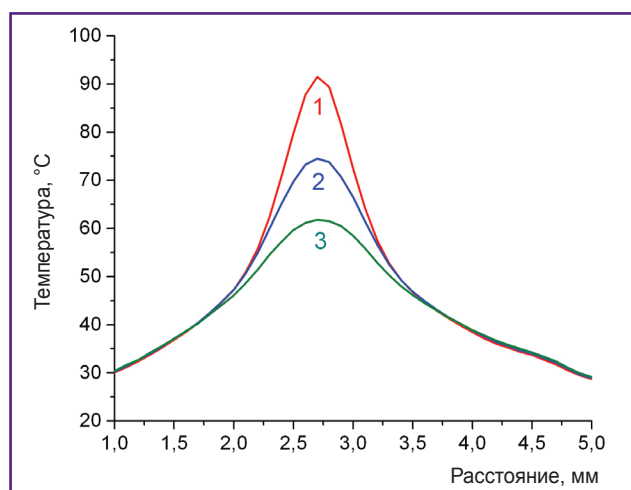


Рис. 6. Типичные распределения температуры по диаметру нагретой области на примере воздействия лазерного излучения с длиной волны 1,68 мкм на первый слой альбумина:

1 — в момент выключения лазера, 2 и 3 — через 0,32 и 0,64 с после выключения лазера соответственно

Таблица 2

Температурные характеристики лазерного воздействия на поверхности альбумина

I, Вт/мм ²	$\lambda=1,56$ мкм		$\lambda=1,68$ мкм		
	$T_{\text{макс}}$, °C	$T_{\text{ср}}$, °C	$T_{\text{макс}}$, °C	$T_{\text{ср}}$, °C	
1,41 (слой 1)	73	62	0,55 (слой 1)	80	64
1,77 (слой 1)	114	96	0,70 (слой 1)	92	80
1,34 (слой 2)	116	95	0,80 (слой 2)	107	85
0,96 (слой 3)	110	102			

температуры $T_{\text{ср}}$, достигаемой на поверхности альбумина в зоне облучения, показал, что температура повышается при лазерном воздействии и достаточно быстро понижается после выключения лазера (рис. 5), при этом расширения нагретой зоны не происходит

(рис. 6). Значения $T_{\text{макс}}$ и $T_{\text{ср}}$ в момент выключения лазера представлены в табл. 2.

Обсуждение

При используемой в работе концентрации (25%) денатурация альбумина протекает в две стадии. Форма кривой ДСК, а также ΔH_d соответствуют литературным данным [18]. Денатурация завершается при температуре 70°C. В случаях, когда весь объем альбумина недостаточно прогрет, денатурация этого белка будет не полной. При плотности мощности лазерного излучения ниже $I_{\text{мин}}$ средняя температура всей области лазерного пятна становится ниже 65°C. Таким образом, для эффективной спайки тканей альбумином его денатурация с последующей коагуляцией и «отверждением» раствора является необходимым условием. Это предположение о механизме

спайки выдвигали другие исследователи [3, 19], мы подтвердили его экспериментально.

В нашем исследовании предел прочности σ на разрыв был несколько меньше 1 МПа (см. табл. 1), что близко к значениям, полученным как для спайки хрящ–хрящ [5, 7] так и для других коллагенсодержащих тканей [2, 7, 15, 19, 20]. В работе [7] для спаянных хрящей трахеи с использованием припоя альбумина с добавками углеродных частиц, повышающих поглощение лазерного излучения, получено значение $\sigma=1,9$ МПа. Действительно, вариации химического состава припоя и мощности излучения (температуры припоя) позволяют получить почти двукратное увеличение σ . Поскольку мы использовали минимально возможные мощности, то увеличение мощности неизбежно сопровождалось повышением как максимальной, так и средней температуры в объеме альбумина, в том числе и в слое, прилегающем к ткани. В свою очередь это приводило к дополнительной деградации этих областей ткани (см. табл. 1). На самом деле задачей спайки тканеинженерной конструкции (имплантата) и хряща является лишь временная фиксация имплантата. Полученная прочность оказывается достаточной для этого [5]. Отметим, что затекание альбумина под конструкцию и его последующая денатурация при замещении дефекта непосредственно в суставном хряще приводят к дополнительному укреплению системы [5]. Кроме того, такая конфигурация «имплантат–подготовленная полость» в суставном хряще предохраняет отделение припоя от тканей в процессе гидратации. Так, при выдерживании спаянных полосок в водном растворе более суток начинается постепенное отслоение припоя от ткани и, как следствие, уменьшается прочность образцов [2, 21]. Заметное уменьшение прочности мы наблюдали при гидратации наших образцов в течение 24 ч. В то же время при спайке подогнанного по размеру имплантата в полости хряща гидратация не сопровождается уменьшением прочности системы [5], поскольку площадь контакта места спайки с жидкостью существенно меньше общей площади спаянной области.

Важным аспектом применения лазерной спайки в живой системе является сохранение ткани в функциональном состоянии. Исследователи, которые определяли морфологические изменения в спаянных тканях, отмечали заметные повреждения в ткани, прилегающей к месту спайки [22], в частности гибель клеток [5], некроз и коагуляцию [6], изменение структуры коллагена [23]. При этом спайка осуществлялась в присутствии сенсibilизатора в припое, т.е. сама ткань не поглощала лазерное излучение. Тем не менее термическая деградация ткани происходила за счет отвода тепла из облучаемой области. Площадь деградации практически совпадала с размером лазерного пятна, и глубина имела значительные размеры [5, 6]. В нашем случае излучение поглощалось водой, таким образом разогревался как сам припой, так и прилежащие ткани, если глубина поглощения

излучения была достаточной. Действительно, коллагеновый каркас конструкции имел наибольшие повреждения в областях 1 и 3 (см. рис. 1), где излучение проникало в ткань (см. табл. 1). Важно отметить, что нагрев ткани вне зоны воздействия за счет теплопроводности не осуществлялся (см. рис. 6), и в областях 2 и 4 повреждения были существенно меньше. При этом для излучения с $\lambda=1,68$ мкм доля сохранившегося интактного коллагена оказалась значительно ниже, чем для излучения с $\lambda=1,56$ мкм. Очевидно, что это связано с характерной глубиной проникновения излучения δ , которая для хрящевой ткани составляет 1,35–1,45 мм при $\lambda=1,68$ мкм, что почти двукратно превышает $\delta=0,86$ мм для $\lambda=1,56$ мкм [24]. С другой стороны, при большем значении δ (что обусловлено меньшим эффективным коэффициентом поглощения [24]) спад температуры по глубине оказывается меньше, и прогрев объема осуществляется более равномерно. Об этом свидетельствуют меньшие значения температуры, регистрируемой на поверхности образца в режимах эффективной спайки излучением с $\lambda=1,68$ мкм по сравнению с $\lambda=1,56$ мкм (см. табл. 2). В результате для прогрева всего объема припоя при $\lambda=1,68$ мкм требуется меньшая мощность излучения I , чем для $\lambda=1,56$ мкм. При значении $I=0,7$ – $0,8$ Вт температура прогреваемого объема составляет ~ 70 – 80°C , что соотносится с оптимальной температурой лазерной спайки, полученной при систематических исследованиях данного явления [2, 19, 20]. Помимо этого, использование лазера с $\lambda=1,68$ мкм позволяет ограничиться двумя слоями альбумина, в отличие от излучения с $\lambda=1,56$ мкм, когда требуется 3 слоя припоя.

Что касается некоторой деградации ткани, то это явление неизбежно как в случае сенсibilизированного, так и прямого нагрева. Тем не менее деградация ткани малого объема не является ключевым препятствием использования лазерной спайки *in vivo*, поскольку сам альбумин представляет собой терапевтический агент [25] и эффективно способствует регенерации после лазерной спайки [6].

Заключение

Лазерная спайка аналога тканеинженерной конструкции для замещения остеохондрального дефекта и интактной хрящевой ткани может эффективно осуществляться с помощью излучения с длинами волн 1,56 мкм и 1,68 мкм, поглощаемого не только припоем, но и самой тканью. Параметры лазерного воздействия обеспечивают такое пространственно-временное распределение температур, чтобы область, заполненная раствором альбумина, прогревалась до температуры денатурации альбумина. На краях ткани, на которые попадает излучение, температура ниже, и деградация каркаса происходит в локальной области, прилежащей к нижней части припоя ткани. Для минимизации области деградации необходимо уменьшить диаметр лазерного пятна,

чтобы его размер по возможности соответствовал области заполнения припоем промежутка между конструкцией и интактным хрящом. Отметим, что профиль края тканеинженерной конструкции и ширину зазора можно немного варьировать, поскольку вытекание раствора альбумина ограничено целостностью интактной части хряща и костной подложкой. Благодаря этому возможно уменьшить как количество слоев припоя, так и степень деградации соединяемых тканей, что является задачей следующих исследований.

Финансирование исследования. Работа выполнена в рамках Государственного задания ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН и по Государственному заданию (тема №АААА-А21-121011990019-4).

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

1. Foyt D., Johnson J.P., Kirsch A.J., Bruce J.N., Wazen J.J. Dural closure with laser tissue welding. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 115(6): 513–518, <https://doi.org/10.1016/s0194-59989670005-0>.
2. McNally K.M., Sorg B.S., Chan E.K., Welch A.J., Dawes J.M., Owen E.R. Optimal parameters for laser tissue soldering. Part 1: tensile strength and scanning electron microscopy analysis. *Lasers Surg Med* 1999; 24(5): 319–331, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9101\(1999\)24:5<319::aid-lsm2>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9101(1999)24:5<319::aid-lsm2>3.0.co;2-n).
3. Kramer E.A., Rentschler M.E. Energy-based tissue fusion for sutureless closure: applications, mechanisms, and potential for functional recovery. *Annu Rev Biomed Eng* 2018; 20: 1–20, <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044702>.
4. Ashbell I., Agam N., Katzir A., Basov S., Platkov M., Avital I., Nisky I., Netz U. Laser tissue soldering of the gastrointestinal tract: a systematic review LTS of the gastrointestinal tract. *Heliyon* 2023; 9(5): e16018, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16018>.
5. Züger B.J., Ott B., Mainil-Varlet P., Schaffner T., Clémence J.F., Weber H.P., Frenz M. Laser solder welding of articular cartilage: tensile strength and chondrocyte viability. *Lasers Surg Med* 2001; 28(5): 427–434, <https://doi.org/10.1002/lsm.1070>.
6. Gerasimenko A.Y., Morozova E.A., Ryabkin D.I., Fayzullin A., Tarasenko S.V., Molodykh V.V., Pyankov E.S., Savelyev M.S., Sorokina E.A., Rogalsky A.Y., Shekhter A., Telyshev D.V. Reconstruction of soft biological tissues using laser soldering technology with temperature control and biopolymer nanocomposites. *Bioengineering (Basel)* 2022; 9(6): 238, <https://doi.org/10.3390/bioengineering9060238>.
7. Герасименко А.Ю., Губарьков О.В., Ичкитидзе Л.П., Подгаецкий В.М., Селищев С.В., Пономарева О.В. Нанокompозитный припой для лазерной спайки биологических тканей. *Известия вузов. Электроника* 2010; 4: 33–41. Gerasimenko A.Yu., Gubar'kov O.V., Ichkitidze L.P., Podgaetskiy V.M., Selishchev S.V., Ponomareva O.V. Nanocomposite solder for laser fusion of biological tissues. *Izvestia vyssih ucebnyh zavedenij. Elektronika* 2010; 4: 33–41.
8. Hale G.M., Query M.R. Optical constants of water in the 200-nm to 200- μ m wavelength region. *Appl Opt* 1973; 12(3): 555–563, <https://doi.org/10.1364/ao.12.000555>.
9. Gabay I., Basov S., Varssano D., Barequet I., Rosner M., Rattunde M., Wagner J., Platkov M., Harlev M., Rossman U., Katzir A. Closure of incisions in cataract surgery in-vivo using a temperature controlled laser soldering system based on a 1.9 μ m semiconductor laser. *Proc. SPIE 9702, Optical Fibers and Sensors for Medical Diagnostics and Treatment Applications XVI*, 97020B (2016), <https://doi.org/10.1117/12.2209133>.
10. Forer B., Vasilev T., Gil Z., Brosh T., Kariv N., Katzir A., Fliss D.M. CO₂ laser fascia to dura soldering for pig dural defect reconstruction. *Skull Base* 2007; 17(1): 17–23, <https://doi.org/10.1055/s-2006-959332>.
11. Mistry Y.A., Natarajan S.S., Ahuja S.A. Evaluation of laser tissue welding and laser-tissue soldering for mucosal and vascular repair. *Ann Maxillofac Surg* 2018; 8(1): 35–41, https://doi.org/10.4103/ams.ams_147_17.
12. Simhon D., Halpern M., Brosh T., Vasilev T., Ravid A., Tennenbaum T., Nevo Z., Katzir A. Immediate tight sealing of skin incisions using an innovative temperature-controlled laser soldering device: in vivo study in porcine skin. *Ann Surg* 2007; 245(2): 206–213, <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000232554.13719.10>.
13. Basov S., Varssano D., Platkov M., Gabay I., Rosner M., Barequet I., Rattunde M., Wagner J., Harlev M., Ofer D., Nisky I., Dankner Y., Katzir A. Strong bonding of corneal incisions using a noncontact fiber-optic laser soldering method. *J Biomed Opt* 2019; 24(12): 128002, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.24.12.128002>.
14. Yafit D., Basov S., Katzir A., Fliss D., DeRowe A. Laser soldering of cartilage graft interposed into a tracheal incision in a porcine model. *Laryngoscope* 2019; 129(1): 58–62, <https://doi.org/10.1002/lary.27468>.
15. Basov S., Milstein A., Sulimani E., Platkov M., Peretz E., Rattunde M., Wagner J., Netz U., Katzir A., Nisky I. Robot-assisted laser tissue soldering system. *Biomed Opt Express* 2018; 9(11): 5635–5644, <https://doi.org/10.1364/boe.9.005635>.
16. Семенов В.Ф. Применение лазерной спайки биологических тканей при оссиклопластике. *Вестник оториноларингологии* 2013; 6: 58–59. Semenov V.F. The application of laser beam welding of biological tissues for the purpose of ossiculoplasty. *Vestnik otorinolaringologii* 2013; 6: 58–59.
17. Ignatieva N.Yu., Zakharkina O.L., Sergeeva E.A., Serezhnikova N.B., Faizullin A.L., Shekhter A.B. Development of a two-layer porous scaffold based on porcine nasal septal cartilage for orthopedics. *Sovremennye tehnologii v medicene* 2021; 13(4): 48, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.4.05>.
18. Relkin P., Mulvihill D.M. Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1996; 36(6): 565–601, <https://doi.org/10.1080/10408399609527740>.
19. Rabi Y., Katzir A. Temporal heating profile influence on the immediate bond strength following laser tissue soldering. *Lasers Surg Med* 2010; 42(5): 425–432, <https://doi.org/10.1002/lsm.20927>.
20. McNally K.M., Sorg B.S., Welch A.J., Dawes J.M., Owen E.R. Photothermal effects of laser tissue soldering. *Phys Med Biol* 1999; 44(4): 983–1002, <https://doi.org/10.1088/0031-9155/44/4/013>.

21. Chan E.K., Brown D.T., Kovach I.S., Welch A.J. Laser assisted soldering: effects of hydration on solder-tissue adhesion. *J Biomed Opt* 1998; 3(4): 456–461, <https://doi.org/10.1117/1.429895>.
22. Dong J., Breitenborn H., Piccoli R., Besteiro L.V., You P., Caraffini D., Wang Z.M., Govorov A.O., Naccache R., Vetrone F., Razzari L., Morandotti R. Terahertz three-dimensional monitoring of nanoparticle-assisted laser tissue soldering. *Biomed Opt Express* 2020; 11(4): 2254–2267, <https://doi.org/10.1364/boe.389561>.
23. Chen Y., Huang J., Xia S., Wang K., Rui Y. Effect of laser energy on protein conformation and lipid structure in skin tissue. *Opt Laser Technol* 2023; 160: 109077, <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2022.109077>.
24. Sviridov A.P., Zakharkina O.L., Ignatieva N.Y., Vorobieva N.N., Bagratashvili N.V., Plyakin V.A., Kulik I.O., Sarukhanyan O.O., Minaev V.P., Lunin V.V., Bagratashvili V.N. Ex vivo laser thermoplasty of whole costal cartilages. *Lasers Surg Med* 2014; 46(4): 302–309, <https://doi.org/10.1002/lsm.22233>.
25. Horváthy D.B., Simon M., Schwarz C.M., Masteling M., Vác G., Hornyák I., Lacza Z. Serum albumin as a local therapeutic agent in cell therapy and tissue engineering. *Biofactors* 2017; 43(3): 315–330, <https://doi.org/10.1002/biof.1337>.