14

Апробация технологии лазерного восстановления мягких тканей с помощью лазерной спекл-контрастной визуализации *in vivo*

© Д.И. Рябкин,[1,2] Д.Д. Ставцев,[1,2] В.В. Сучкова,[1,2] Е.А. Морозова,[3] Г.А. Пьявченко,[4] А.Н. Коновалов,[2,5] С.В. Селищев,[1] А.Ю. Герасименко[1,2]

[1]Институт биомедицинских систем, Национальный исследовательский университет „Московский институт электронной техники“,
124498 Москва, Зеленоград, Россия
[2]Институт бионических технологий и инжиниринга, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет),
119991 Москва, Россия
[3]Кафедра пропедевтики стоматологических заболеваний, Медицинский институт, Российский университет дружбы народов,
117198 Москва, Россия
[4]Кафедра анатомии и гистологии человека, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет),
119991 Москва, Россия
[5]Третье нейрохирургическое отделение, Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации,
125047 Москва, Россия
e-mail: molodykh1999@gmail.com

Поступило в Редакцию 18 декабря 2024 г.
В окончательной редакции 18 декабря 2024 г.
Принято к публикации 18 декабря 2024 г.

Целью работы является апробация разработанной технологии лазерного восстановления мягких тканей на лабораторных кроликах *in vivo*. Технология лазерного восстановления включает в себя нанесение на зону рассечения лазерного биополимерного припоя на основе бычьего сывороточного альбумина, одностенных углеродных нанотрубок и хромофора — индоцианина зеленого и последующее облучение лазерным излучением с длиной волны 810 nm. Лазерная система оснащена температурной обратной связью, позволяющей осуществлять непрерывный мониторинг и контроль температуры в зоне формирования лазерного шва. Во время операции и перед днем выведения методом лазерной спекл-контрастной визуализации проводилось исследование восстановления микроциркуляции кровотока в области лазерного соединения биологических тканей. После проведения экспериментов на каждый день выведения проводились гистологические и иммуногистохимические исследования лазерных швов для оценки эффективности заживления тканей и степени рубцевания, а также токсикологические исследования лимфатических узлов, прилегающих к зоне лазерного восстановления. В результате исследований было установлено, что разработанная технология не нарушает кровоток и позволяет создавать швы без образования грубого рубца.

Ключевые слова: лазерная хирургия, спекл-контрастная визуализация, биополимеры, одностенные углеродные нанотрубки.

DOI: 10.61011/JTF.2025.05.60299.444-24

Введение

Одним из ключевых этапов хирургических вмешательств является соединение рассеченных участков биологических тканей. Для восстановления целостности таких рассечений традиционно используются иглы и шовные материалы. Метод шовного соединения отличается простотой и относительной доступностью. Однако несмотря на указанные преимущества, существуют значительные недостатки данного подхода, такие, как дополнительная травматизация раны, возможность возникновения иммунной реакции и формирование грубых рубцов. Современной альтернативой является бесшовное соединение, исключающее проколы биологических тканей, при котором используются клеящие вещества, а также электрическая сварка тканей.

Клеевые технологии обеспечивают создание герметичных швов с минимальным образованием рубцов, однако часто страдают от недостаточной прочности. Наивысшую прочность среди клеевых методов демонстрируют цианоакрилаты, но их высокая токсичность может вызывать воспалительные и аллергические реакции, а также нейротоксичность и мутагенность [1]. В качестве альтернативы цианоакрилатам используется фибриновый клей. Фибрин не вызывает воспалительных реакций или токсического некроза тканей, однако его механические свойства часто недостаточны для применения в условиях, требующих высокой прочности. Кроме того,

существует риск передачи инфекций через кровь. Современные опасения также связаны с увеличением случаев синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) и губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота (ГЭБ). Одним из способов решения этих проблем является выделение фибриногена из собственной крови пациента. Этот подход позволяет избежать риска передачи инфекций, однако требует, как минимум, двухдневной подготовки, что может отсрочить операцию [2].

При использовании электрической, ультразвуковой и радиочастотной сварки биологических тканей существует риск побочных электромеханических эффектов, негативно влияющих на окружающие клетки. Эти методы имеют ограничения в практическом применении. Ультразвуковая сварка, например, характеризуется узкой зоной термической обработки, что может приводить к локальному перегреву и повреждению тканей. Исследования показывают, что прочность соединений, полученных с использованием этих методов, не всегда соответствует клиническим требованиям, что может вызвать осложнения в процессе заживления и функциональную недостаточность соединенных тканей [3].

Наиболее перспективным методом бесконтактного восстановления тканей является лазерное восстановление биологических тканей. Технология лазерного восстановления основывается на нанесении на место повреждения биоорганического белкового припоя и дальнейшем облучении лазерным излучением до денатурации белкового припоя и изменении молекулярной структуры как основных компонентов внеклеточного матрикса соединительной ткани, которые образуют соединительные мостики, так и в нанесенном биоорганическом припое.

На первом этапе лазерного воздействия тройные спирали внутри молекул коллагена разматываются из-за реакции гидролиза водородных связей, и происходит распутывание коллагеновых волокон на концах разреза. Дальнейшее лазерное воздействие приводит к переплетению волокон и интердигитации поперек разреза. В результате происходит слияние либо между разрезанными концами коллагеновых волокон, либо между их параллельными гранями. Также при лазерном облучении образуются новые химические связи: ковалентные сшивки в месте пайки и нековалентные взаимодействия между размотанными нитями коллагена по обе стороны от шва. После охлаждения нековалентные взаимодействия между полученным затвердевшим (денатурированным) припоем и коллагеновой матрицей в ткани обеспечивают активную пролиферацию клеточных структур [4,5].

Данный метод способен обеспечить гидроизоляцию области воздействия, обеспечить герметичность раны, а также позволяет запечатать небольшие сосуды и сократить продолжительность кровотечения. Кроме того, отсутствует необходимость сдавливать ткани швами, что уменьшает риск краевого некроза и способствует заживлению тканей без образования грубых рубцов. Благодаря бесконтактной природе лазерных методов минимизируется вероятность заражения раны [6–8].

Ключевыми недостатками лазерного воздействия являются чрезмерное термическое повреждение окружающих тканей и малая глубина проникновения лазерного излучения, приводящая к получению прочности на разрыв сварных швов, уступающей традиционному шовному методу с использованием шовного материала [9].

Глубина проникновения лазерного излучения и степень термического повреждения биологических тканей при воздействии лазерного излучения зависят от нескольких ключевых параметров, включающих мощность лазера, компонентный состав используемого припоя, длительность и способ воздействия, а также конечную результирующую температуру, достигаемую в тканях. Наибольшее распространение в лазерной пайке биологических тканей получили полупроводниковые лазерные системы с длиной волны в ближнем инфракрасном диапазоне (800–1100 nm). Полупроводниковые системы имеют меньшие по размеру габариты и потребляют значительно меньше энергии, чем другие лазерные технологии. Однако на использование диодных лазеров накладываются определенные ограничения, так как пиковая выходная мощность излучения значительно ниже, чем у излучения CO_2 и Nd : YAG-лазеров [10,11]. Этот недостаток минимизируется за счет биоорганических припоев и красителей, увеличивающих поглощающую способность ткани [12].

Использование биоорганических составов при лазерном восстановлении тканей значительно повысило прочность лазерных швов, снизило термический некроз тканей и ускорило процесс восстановления. В качестве основы биоорганических припоев наибольшее распространение получил белок крови „сывороточный альбумин“. Водная суспензия альбумина обеспечивает первичное склеивание краев повреждения, преобразуясь в твердый (разнообразный) нанокомпозит в процессе термической денатурации под действием лазерного излучения. Для того чтобы сфокусировать лазерное воздействие в зоне рассечения и предотвратить термический некроз окружающих тканей, не являющихся мишенью, в состав припоя добавляют хромофор, абсорбирующий длину волны лазерного излучения. Успешнейшей комбинацией в лазерном восстановлении биологических тканей является использование цианинового красителя индоцианина зеленого (ИЦЗ) совместно полупроводниковым лазером с длиной волны 810 nm [13]. ИЦЗ представляет собой нетоксичный флуоресцентный иодидный краситель с быстрым печеночным клиренсом [14]. Распространение этого сочетания связано с тем, что пик поглощения этого биоорганического красителя приходится на 800 nm, что совпадает с длиной волны лазерного излучения.

Несмотря на значительные достижения в отрасли лазерного восстановления биологических тканей, технология до сих пор имеет значительные ограничения и не получила широкого распространения в клинической практике.

В предыдущих исследованиях [15,16] авторами работы было выявлено, что добавление в состав биополимерно-

го припоя одностенных углеродных нанотрубок в малой концентрации (до 0.1 wt.%) приводит к формированию прочного нанокомпозитного материала, состоящего из армирующего каркаса на основе сваренных между собой углеродных нанотрубок в белковой матрице. Полученный нанокомпозит позволяет увеличить прочность лазерных швов на два порядка по сравнению с лазерными швами, сформированными с припоем без использования одностенных углеродных нанотрубок [17]. Также для предотвращения перегрева разработанный припой должен использоваться совместно с лазерной системой на основе полупроводникового лазера с длиной волны 810 nm, оснащенного обратной связью по температуре, что позволяет осуществлять непрерывный мониторинг и контроль температуры в зоне формирования лазерного шва, обеспечивая высокую точность терморегуляции, и способствует улучшению качества соединения.

Для демонстрации эффективности разработанной технологии в настоящей работе было проведено исследование *in vivo* на лабораторных кроликах. Во время операции и перед днем выведения методом лазерной спекл-контрастной визуализации проводилось исследование восстановления микроциркуляции кровотока в области лазерного восстановления биологических тканей. После проведения экспериментов проводились гистологические и микроскопические исследования лазерных швов для оценки эффективности заживления тканей и степени рубцевания, а также токсикологические исследования лимфатических узлов, прилегающих к зоне лазерного восстановления.

1. Материалы и методы

В данном разделе представлено подробное описание методики изготовления биоорганического припоя, описываются разработанная система для лазерного восстановления мягких тканей с использованием системы адаптивной термостабилизации, установка для контроля кровотока методом спекл-контрастной визуализации, методика проведения операции по лазерному восстановлению, а также методические подходы к проведению гистологических исследований.

1.1. Биополимерный припой

Биополимерный припой, наносимый на область формирования лазерного шва, представлял собой раствор одностенных углеродных нанотрубок (ОСУНТ, ООО „Углерод ЧГ“, Черноголовка, Россия) бычьего сывороточного альбумина (BioClot GmbH, Айденбах, Германия) и индоцианина зеленого в дистиллированной воде. Для приобретения гидрофильных свойств одностенные углеродные нанотрубки были функционализированы карбоксильными группами. Бычий сывороточный альбумин является основным белковым компонентом припоя, обладающим высокой биосовместимостью и не вызывающим иммунных реакций при введении в организм человека. Под воздействием лазерного излучения альбумин денатурирует и коагулирует, образуя прочную клейкую белковую матрицу. Эта матрица обеспечивает соединение краев раны, создавая условия для регенерации тканей. Альбумин постепенно рассасывается без образования токсичных продуктов распада, минимизируя риск длительных воспалительных реакций и способствуя заживлению раны без образования грубых рубцов.

Индоцианин зеленый — флуоресцентный краситель с высоким коэффициентом поглощения в ближней инфракрасной области спектра (около 800 nm), совпадающей с выбранной длиной волны лазера. Поглощая лазерное излучение, индоцианин зеленый преобразует световую энергию в тепловую, обеспечивая локальный контролируемый нагрев области применения припоя. Это приводит к денатурации альбумина без перегрева окружающих тканей, снижая риск термического повреждения здоровых участков благодаря точности и селективности воздействия индоцианина зеленого.

Одностенные углеродные нанотрубки придают припою дополнительную механическую прочность и эластичность, что особенно важно для мягких тканей, подверженных динамическим нагрузкам. Армирование припоя нанотрубками обеспечивает долговечность и стабильность соединения, снижая риск расхождения краев раны.

Приготовление биополимерного припоя состояло из трех этапов. На первом этапе была подготовлена однородная суспензия одностенных углеродных нанотрубок в концентрации 0.1 wt.% в дистиллированной воде с использованием погружного ультразвукового гомогенизатора (Qsonica Sonicator Q700, Qsonica, Ньютаун, США) при мощности 40 W в течение 45 min. Затем в водную суспензию наночастиц при непрерывном механическом перемешивании добавлялись краситель — индоцианин зеленый в концентрации 0.1 wt.% и белок — бычий сывороточный альбумин в концентрации 25 wt.%. После этого биополимерный припой помещался в ультразвуковую ванну (ООО „САПФИР+“, Москва, Россия), наполненную льдом, на 30 min до полного растворения белка.

1.2. Лазерная система для восстановления мягких тканей

Лазерное система для восстановления мягких тканей состояла из трех модулей: оптоэлектронного, температурного и модуля управления, заключенных в единый корпус и хирургического оконечного устройства (лазерного карандаша), соединяющегося с корпусом посредством оптоволокна (рис. 1).

В основе оптоэлектронного модуля лежал полупроводниковый лазер на основе диода GaAs, осуществляющий генерацию непрерывного лазерного излучения с параметрами: длина волны — 810 nm, максимальная выходная мощность лазерного излучения — 5 W.

Рис. 1. Апробации лазерного восстановления мягких тканей *in vivo*: разметка рассечений (a), нанесение биополимерного припоя (b), воздействие на зону рассечения лазерным излучением (c).

Для формирования плоскопараллельного лазерного пучка использовался коллиматор фокусным расстоянием $f = 10.99$ mm. Диаметр воздействующего лазерного луча составил ~ 2 mm. Хирургическая зона подсвечивалась пилотным лазером красного света с длиной волны 650 nm.

Температурный модуль обеспечивал измерение и контроль температуры в области формирования лазерного соединения. Считывание температуры с поверхности рассечения осуществлялось бесконтактно с помощью инфракрасного датчика температуры. Угол поля зрения датчика составляет примерно 35° по горизонтали и 25° по вертикали, позволяя определять температуру на площади и выделяя самую нагретую область. Поддержание заданной температуры осуществлялось с помощью обратной связи по температуре, реализованной посредством пропорционально-интегрально-дифференциального (ПИД) регулятора. ПИД регулятор постепенно снижает ток, подаваемый источником питания на лазерный диод, по мере достижения заданной температуры. Погрешность измерения температуры составила 0.5 °C, что является приемлемой точностью для работы с биологическими тканями.

Для точности измерения датчик температуры располагается строго над лазерным лучом в хирургическом оконечном устройстве. Хирургическое оконечное устройство соединяется с корпусом посредством оптоволокна диаметром 600 μm.

Управление лазерным комплексом осуществляется с помощью программного обеспечения, установленного на персональном компьютере, подключаемом с помощью Bluetooth.

1.3. Процедура лазерного восстановления мягких тканей

Лазерная пайка была использована для восстановления целостности кожи лабораторных животных — кроликов породы шиншилла. Эксперимент *in vivo* проводился по строгому протоколу в Первом Московском государственном медицинском университете им. И.М. Сеченова под руководством Комитета по этике. Кролики данной породы являются наиболее распространенным объектом для проведения операций по регенерации тканей. В связи с этим опубликовано большое число работ по особенностям физиологии, анатомии до- и послеоперационном уходе за кроликами. Площадь операционной поверхности позволяет провести весь запланированный объем хирургических процедур. Лазерное восстановление биологических тканей проводилось на 28 животных, по 4 особи на каждые сутки выведения (1, 3, 5, 10, 30, 60, 90). Также на 7 животных формировались традиционные швы с помощью иглы и нити в качестве контроля. Это значение является минимальным достаточным значением для получения статистически значимых результатов, позволяя исключить случайные факторы и получить надежные данные. Пол животного значения не имел.

На спине каждого лабораторного животного формировались 3 линейных разреза длиной 1 cm и 2 U-образных разреза длиной 7 cm. Животным выбривалась шерсть на холке и делались отметки для определения местоположения рассечений. Непосредственно перед проведением процедуры кроликам внутримышечно вводился ZOLETIL 100 (VIRBAC, Карро, Франция). Дозировка для кратковременной общей анестезии при малых хирургических вмешательствах составляла 10 mg/kg. При внутримышечном введении потеря выпрямительных рефлексов происходила через 3–6 min после введения. Кожу рассекали хирургическим скальпелем. Для контрольных швов использовался один из самых распространенных шовных материалов Prolene 5.0 (Ethicon Inc., Bridgewater, США).

Для формирования лазерных швов на область раны наносили припой объемом 10 μl и воздействовали разработанной лазерной системой методом постепенного сканирования области шва. Скорость формирования лазерного шва — 1 cm/min. Температура лазерного воздействия составила 50 °C. Мощность лазерного излучения варьировалась до 2 W. Процесс восстановления кожи представлен на рис. 1.

1.4. Установка для лазерной спекл-контрастной визуализации

Лазерная спекл-контрастная визуализация основана на анализе временных флуктуаций спекл-паттернов, возникающих при освещении биологических тканей когерентным лазерным излучением. Спекл-паттерн представляет

собой случайную интерференционную картину, возникающую вследствие обратного рассеяния когерентного света на микронеоднородностях внутри объекта, таких, как эритроциты в кровеносных сосудах. В статичных средах спекл-картина остается неизменной во времени. Однако движение рассеивающих частиц, например, эритроцитов, приводит к изменению фаз рассеянных волн и, как следствие, к флуктуациям интенсивности спекл-паттерна. Анализируя степень размытия спекл-картины на серии изображений или на изображении с определенной экспозицией, можно количественно оценить скорость движения частиц внутри ткани [18].

Для реализации метода лазерной спекл-контрастной визуализация была разработана экспериментальная установка. В качестве источника излучения использовался лазерный диод с длиной волны 802 nm. Для обеспечения равномерного освещения исследуемой области лазерное излучение рассеивается с помощью светорассеивателя. В качестве приемника излучения выступала монохромная цифровая камера CS505MU (DCC3260M, 2448 × 2048 пикселей с размером пикселя 3.45, Thorlabs, Inc., Ньютон, США). Для каждой исследуемой зоны в каждый отдельный день было записано по 150 кадров. Такое количество кадров требовалось для последующего усреднения спекл-картин по нескольким кадрам для снижения шума, а также для исключения потенциально возможных артефактов в ходе записи, вызванных резкими движениями, дыханием и т. д. Время экспозиции камеры во всех экспериментах было установлено равным 10 ms. Данный параметр был выбран исходя из компромисса между чувствительностью к быстрым флуктуациям спекл-паттерна и уровнем шума изображения. Перед объективом камеры устанавливался пленочный поляризатор, ориентированный перпендикулярно оси поляризации падающего излучения. Это позволило отсеять зеркально отраженное от поверхности объекта излучение, сохранившее поляризацию, и пропустить деполяризованный свет, рассеянный внутри ткани, который несет информацию о движении эритроцитов. Для уменьшения влияния фонового освещения и повышения отношения сигнал/шум перед камерой устанавливался полосовой оптический фильтр FB800-10 (Thorlabs, Inc., Ньютон, США) с центральной длиной волны 800 nm и полушириной 10 nm.

При облучении биологической ткани лазерным излучением происходит рассеяние света на движущихся эритроцитах внутри сосудов. В результате интерференции рассеянных волн формируется динамическая спекл-картина, регистрируемая камерой. Параметр спекл-контраста определялся по формуле

$$K = \frac{\sigma}{\langle I \rangle}, \qquad (1)$$

где σ — стандартное отклонение интенсивности, $\langle I \rangle$ — среднее значение интенсивности, определявшееся в скользящем окне 5×5 пикселей. Для снижения шума итоговая спекл-картина получалась путем усреднения 20 последовательных кадров. Изображения с камеры сохранялись при помощи программы ThorCam и обрабатывались при помощи приложения, самостоятельно разработанного в среде Octave. Для предотвращения артефактов, связанных с дыханием и другими движениями животного, область вокруг исследуемых швов аккуратно фиксировалась металлическим кольцом. Усилие при этом выбиралось минимальным, чтобы максимально снизить возможное влияние на кровоток в исследуемой области. Схема установки представлена на рис. 2.

1.5. Гистологические исследования результатов лазерного восстановления

Участки кожи из области разреза и последующего лазерного восстановления мягких тканей, а также лимфоузлы забирались у всех лабораторных животных и фиксировались методом погружения в нейтральный забуференный формалин (Биовитрум, Москва, Россия) в течение 24 h. Образцы промывались, обезвоживались, заливались в парафин и делались срезы толщиной 5 μm на ротационном микротоме Thermo Scientific Microm HM 325 (Thermo Scientific, Уолтем, Германия). Срезы размещались на адгезивных силановых стеклах и проводилась окраска препаратов гематоксилином и эозином, а также выполнялась иммуногистохимическая (ИГХ) реакция на белок Ki-67c подкрашиванием гематоксилином [19].

Для проведения ИГХ реакции осуществлялась демаскировка антигенов в ацетатном буфере в течение получаса при температуре 98 °C. Далее проводилась блокировка эндогенной пероксидазы и инкубация срезов в бычьем сывороточном альбумине в термостате при температуре 37 °C на протяжении 20 min. Использовались первичные рекомбинантные мышиные моноклональные антитела anti-Ki-67 (инкубация 3 h при температуре 37 °C) в разведении 1 : 300, и вторичные моноклональные рекомбинантные антитела козы к иммуноглобулинам мыши (инкубация 1 h при температуре 37 °C). Вторичные антитела были коньюгированы с пероксидазой хрена. В качестве хромогена использовали диаминобензидин (ДАБ). Докраска производилась с использованием гематоксилина Каращи. Срезы заключались в монтирующую среду. Изображения были получены с использованием микроскопа Zeiss AxioImager A1, камера Axiocam 305 color (Zeiss, Германия).

Пространственные параметры рубца подсчитывались в специализированном программном обеспечении для микроскопии ZEN (Zeiss, Йена, Германия) методом морфометрии после калибровки с помощью микрометрического стекла. Подсчет Ki-67 + -клеток по отношению к общему количеству клеток проводился в программе QuPath (Queen's University, Белфаст, Великобритания) с применением скрипта сегментации ядер StarDist с автоматической кластеризацией по цвету.

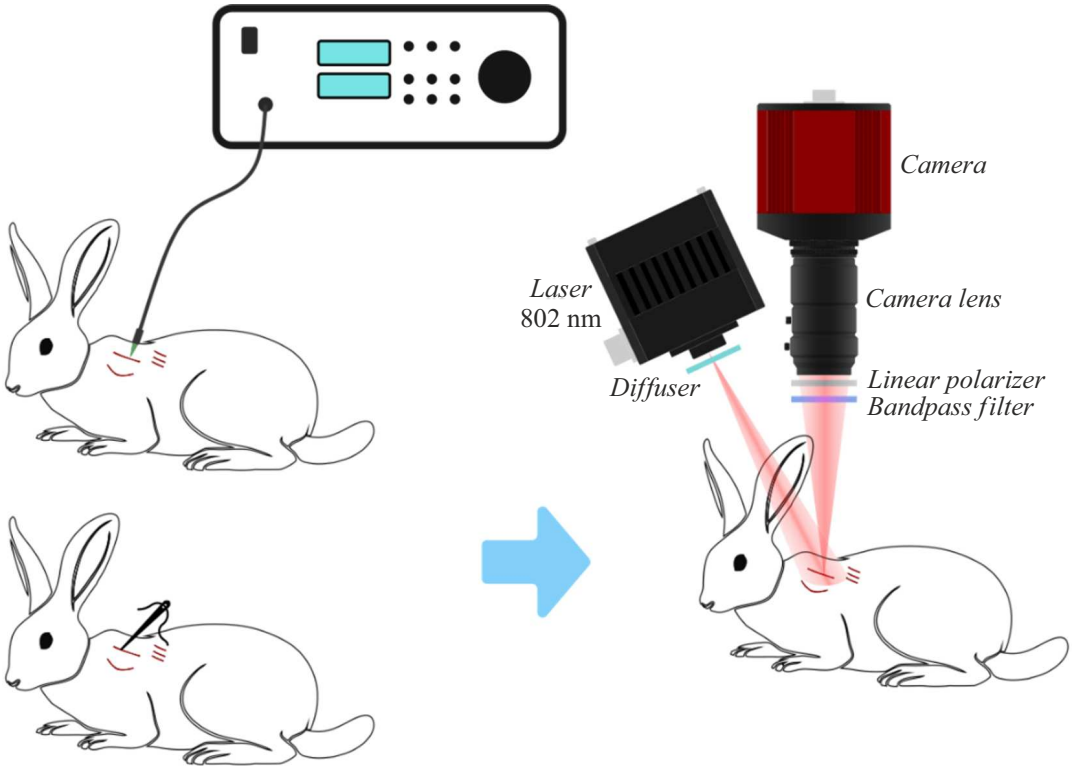

Рис. 2. Схема проведения эксперимента по сравнению кровотока лазерных и традиционных швов методом лазерной спекл-контрастной визуализации.

2. Экспериментальные результаты и обсуждения

2.1. Сравнение кровотока после шовного и лазерного методов восстановления биотканей

На рис. 3 представлено сравнение спекл-картин в области швов, наложенных с использованием традиционных методов (иглы и нити) и лазерного восстановления. Анализ данных по дням позволяет сделать выводы об особенностях каждого метода.

На начальном этапе (день 0) наблюдается значительное нарушение перфузии в околошовной области при использовании традиционных методов для обоих типов рассечений. Области, окрашенные в синий цвет, указывают на снижение сосудистой микроциркуляции, что может быть связано с травматизацией мягких тканей во время наложения швов. В случае лазерного восстановления, несмотря на хирургическое вмешательство, кровоток представляется более равномерным.

На первый день после операции наблюдается улучшение перфузии при использовании традиционных швов; однако остаются участки с недостаточной микроциркуляцией, особенно в области шва. Напротив, лазерное восстановление демонстрирует почти полное восстановление кровотока, особенно в области линейного шва (1 cm), где наблюдается более равномерное распределение гемодинамических параметров.

На третий день продолжается улучшение перфузии при использовании традиционных швов, хотя некоторые участки все еще показывают значительные нарушения микроциркуляции. В случае лазерного восстановления практически не наблюдается областей с нарушениями кровотока, что указывает на высокую эффективность этого метода в контексте ангиогенеза и реваскуляризации. На 5-й день наблюдается аналогичная картина.

На десятый день после операции в группе традиционных швов наблюдается уменьшение периферической перфузии вокруг шва. Это может быть связано с локальной реакцией тканей на наличие инородного материала (ниток), что приводит к васкулярному ответу непосредственно в области шва и снижению гемодинамических параметров в окружающих тканях. Такой эффект может указывать на развитие фиброза или рубцевания, где ткани становятся менее эластичными и менее восприимчивыми к нормальному кровообращению.

Полученные результаты подтверждаются сравнительным анализом динамики изменений кровотока в группах с традиционными и лазерными швами в области формирования шва, а также в окружающих нетравмированных тканях, с использованием среднего значения спекл-контраста. Для U-образных швов было выбрано 6 областей, а для линейных — 9 (рис. 4, 5). Так как параметр

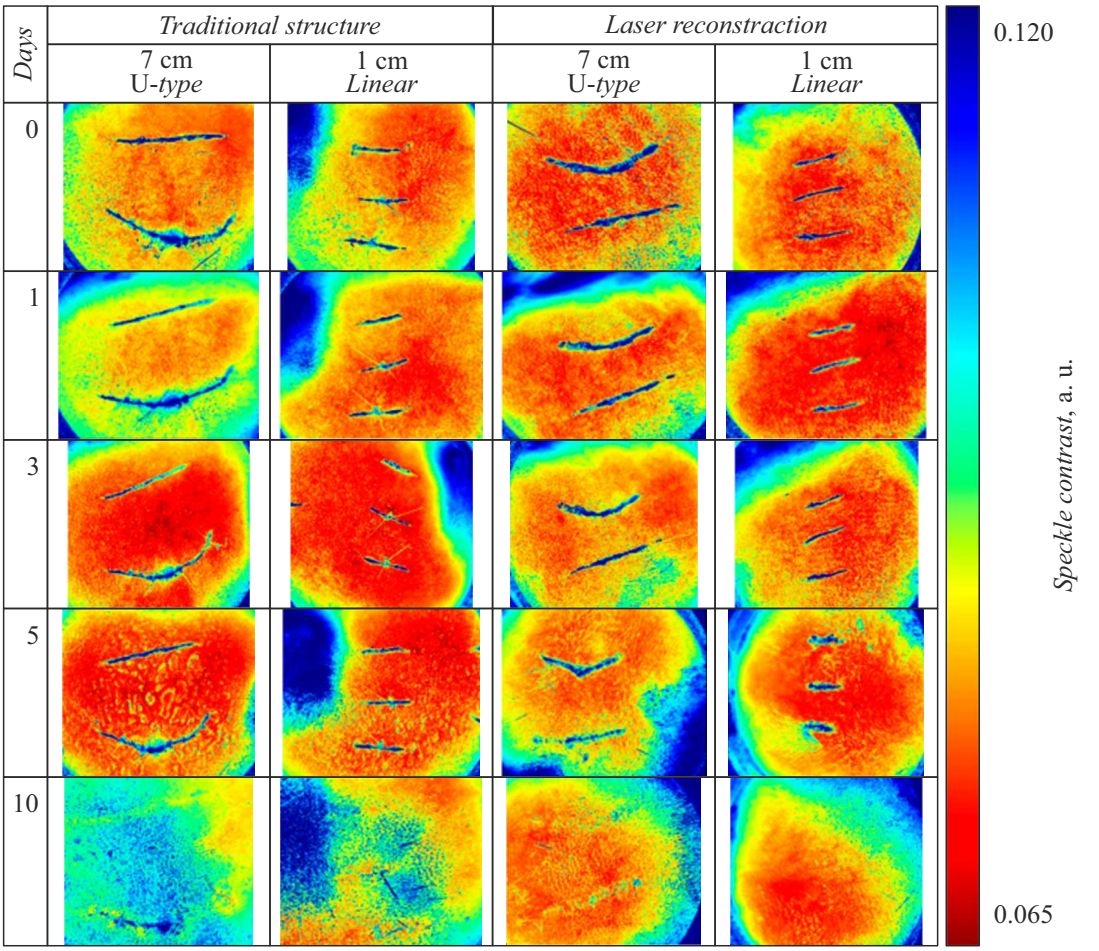

Рис. 3. Сравнение визуализации кровотока в швах, сформированных традиционным (шовным) методом и лазерным методами: непосредственно во время операции и через 1, 3, 5 и 10 дней после операции.

спекл-контраста обратно пропорционален скорости кровотока, большее значение спек-контраста соответствует снижению перфузии. На десятые сутки после операции в результате активного процесса регенерации геометрия шва не подлежала отслеживанию.

2.2. Оценка динамики заживления лазерных швов

Динамика регенерации биотканей после лазерного восстановления рассечений исследовалась на срезах, окрашенных гематоксилином (рис. 6). Всего исследовалось две группы лазерных соединений, сформированных на каждом лабораторном животном: U-образные швы длиной 7 cm и линейные швы длиной 1 cm.

На первые сутки после операции в обеих группах лазерных швов наблюдается гипертрофически-нормотрофический тип рубца. В этот период отмечается пик стадии воспаления. В результате травмы затронуты эпидермис, базальные мембраны, а также сосочковый и сетчатый слои дермы, что сопровождается повреждением волосяных фолликулов. Микроскопическое исследование показывает наличие грануляционной ткани, которая является характерным признаком активного заживления. Умеренная лимфоцитарная инфильтрация свидетельствует о продолжающемся воспалительном процессе. Также отмечаются полнокровные и расширенные капилляры, что указывает на повышенный кровоток в области шва и активное восстановление сосудистой сети. Активное разрастание соединительной ткани в сосочковом и особенно в сетчатом слое дермы подчеркивает процесс репарации, направленный на восстановление поврежденных тканей.

На третий день после операции в группе с линейными лазерными швами наблюдается начало стадии пролиферации, что является важным этапом заживления. В этот период происходит полноценное формирование грануляционной ткани, которая служит основой для дальнейшего восстановления поврежденных структур. Лимфоцитарная инфильтрация сохраняется, что указывает на продолжающийся воспалительный процесс. Однако на этом этапе уже фиксируется значительное накопление фибробластов, что свидетельствует о начале активной фиброплазии — процесса, связанного с образовани-

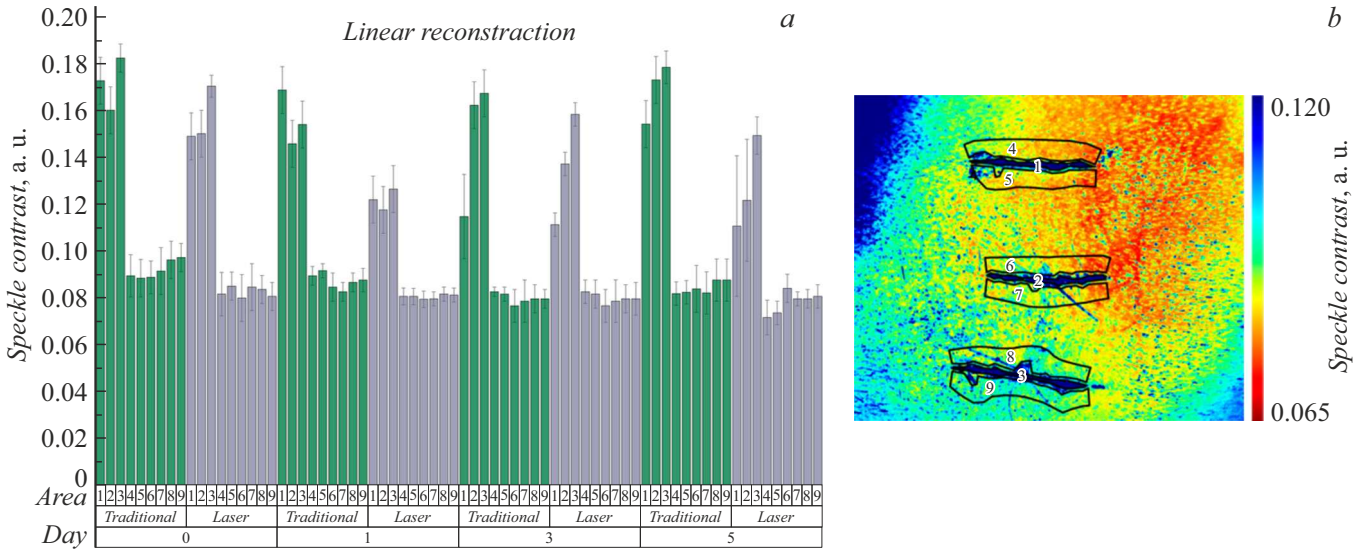

Рис. 4. Динамика восстановления кровотока в традиционных и лазерных швах линейного типа (*a*); *b* — выделены области, соответствующие областям на графиках (на примере традиционного шва).

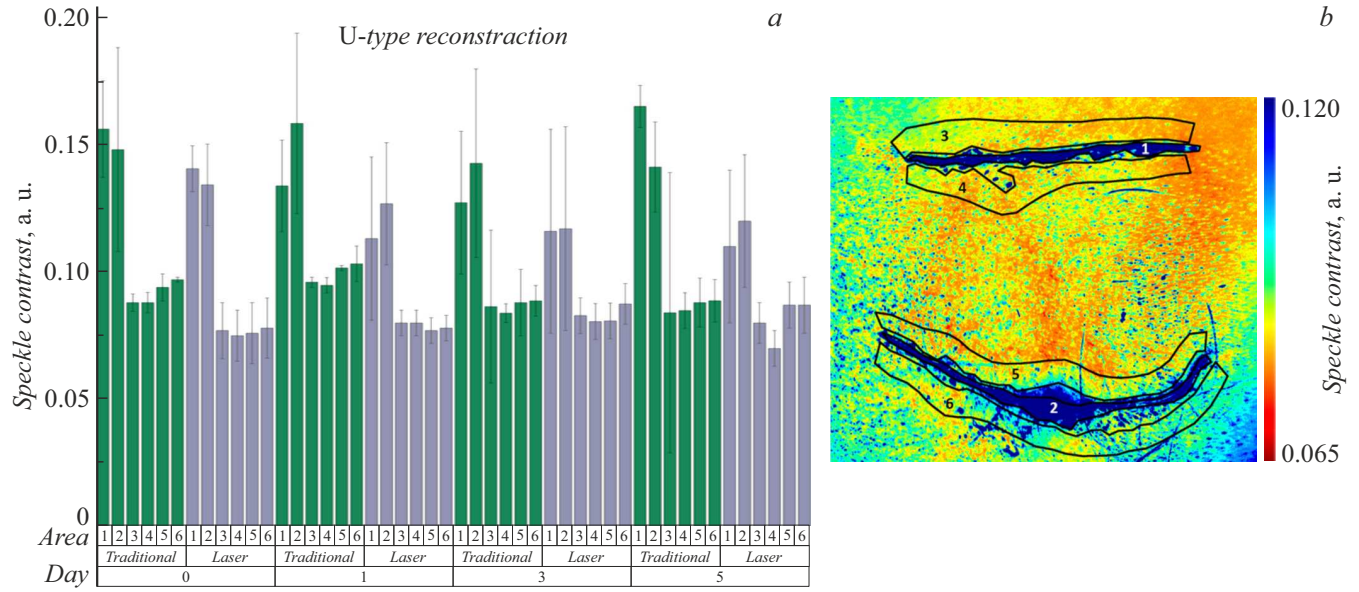

Рис. 5. Динамика восстановления кровотока в традиционных и лазерных швах U-образного типа (*a*); *b* — выделены области, соответствующие областям на графиках (на примере традиционного шва).

ем соединительной ткани и восстановлением кожных структур. Важным аспектом является восстановление кожных придатков, что указывает на активную миграцию кератиноцитов к месту повреждения. Эти клетки играют ключевую роль в регенерации эпидермиса и восстановлении защитной функции кожи. Организация базальных мембран также начинает происходить, что является необходимым условием для нормального функционирования кожи. Полнокровие капилляров в области шва свидетельствует о повышенной васкуляризации и активном кровоснабжении, что способствует доставке необходимых питательных веществ и кислорода к заживающим тканям. В группе с U-образными лазерными швами также наблюдается стадия пролиферации, при которой происходит полноценное формирование грануляционной ткани. Лимфоцитарная инфильтрация остается выраженной, и фиксируется накопление фибробластов, что указывает на активные процессы заживления.

На пятый день после операции в обеих группах наблюдается завершение стадии пролиферации и переход к стадии эпителизации. В этот период происходит значительное сокращение раны, что свидетельствует о высоком уровне активности процессов заживления. Замещение грануляционной ткани эпителием указывает

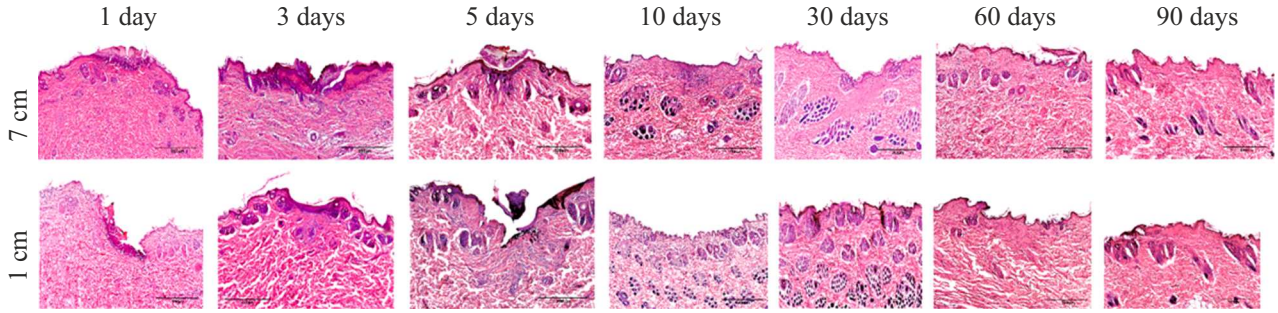

Рис. 6. Динамика процесса рубцевания поврежденного участка кожи в группе 7 cm (U-образный лазерный шов) и 1 cm (линейный лазерный шов) на 1, 3, 7, 10, 30, 60 и 90 сутки после операции.

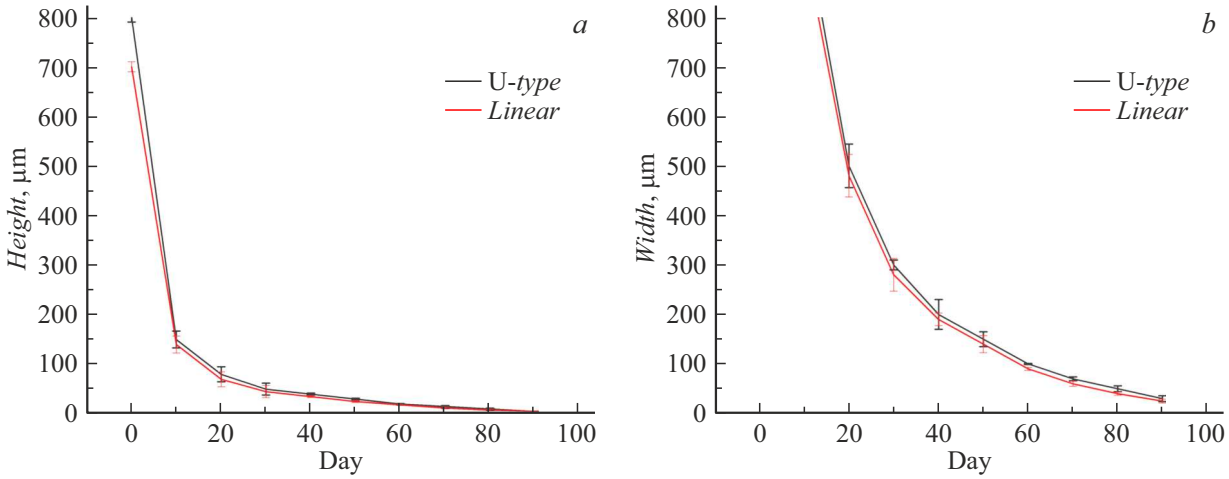

Рис. 7. Динамика заживления рубца: высота рубца (*a*); ширина рубца (*b*).

на успешное восстановление кожных структур. Формирование базальной мембраны является важным этапом, обеспечивающим нормальное функционирование и защитные свойства кожи. Активное развитие кожных придатков, включая окончание формирования волосяных фолликулов, свидетельствует о восстановлении функциональности кожи. Наличие активации роста волос на этом этапе подтверждает восстановление нормального цикла роста волос и восстановления дермальных структур. Процесс кератинизации также активно протекает, что указывает на формирование защитного барьера на поверхности кожи. Миграция меланоцитов, отвечающих за пигментацию, дополнительно подчеркивает активные процессы регенерации. При этом отмечается уменьшение лимфоцитарной инфильтрации, что свидетельствует о снижении воспалительного процесса и переходе к более стабильному состоянию тканей.

На десятый день обе группы демонстрируют завершение процессов эпителизации и сокращения раны, что свидетельствует о высоком уровне заживления. Тем не менее группа лазерных линейных швов показывает более выраженные признаки восстановления с умеренной лимфоцитарной инфильтрацией и активным кровоснабжением, тогда как группа с U-образными швами характеризуется остаточными эффектами воздействия и редким наличием фибробластов и лимфоцитов. Формирование эпидермиса и волосяных фолликулов завершено, что подтверждает успешное восстановление поверхностных кожных структур. На 60-й день наблюдается нормализация структуры эпидермиса. Через 90 дней отклонений от здоровой ткани не наблюдается.

На рис. 7 отображена динамика сокращения размеров рубцов по длине и ширине на протяжении 90 дней.

2.3. Иммуногистохимический анализ

Проведенные иммуногистохимические реакции на белок Ki-67 показали выраженную пролиферативную активность на ранних сроках в эпидермисе у краев раневой поверхности, их количество было максимальным в первые дни разрешения воспаления, потом постепенно снижалось в процессе заживления (рис. 8).

2.4. Токсикологический анализ лимфатических узлов

Гистологическое исследование лимфатических узлов было проведено для изучения токсичности компонентов

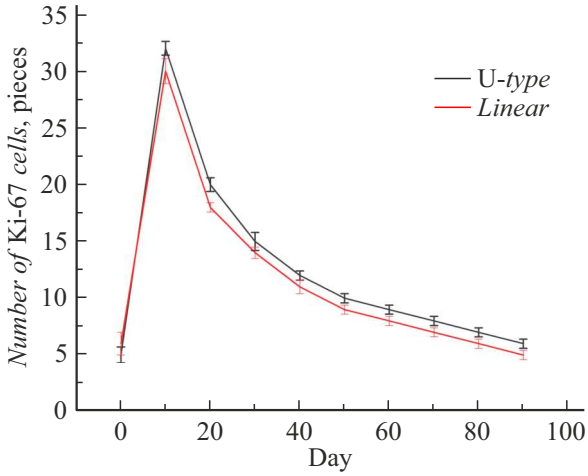

Рис. 8. Динамика пролиферации лазерных швов (по количеству Ki67-позитивных клеток) в месте раневой поверхности.

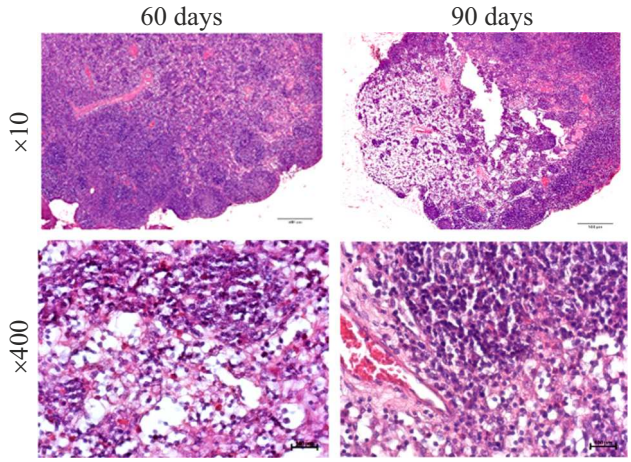

Рис. 9. Микрофотографии лимфатических узлов на 60-й (×10, ×400) и 90-й (×10, ×400) день исследования.

припоя, поскольку изменения в структуре лимфатических узлов и их функциях могут свидетельствовать о реакции организма на наночастицы. Коме того, лимфатические узлы являются наиболее распространенной областью накопления наночастиц.

В результате исследования замечено, что лимфатические узлы морфологически не показывают никаких отклонений и изменений тканей после экспериментального воздействия. Отсутствуют признаки артефактных частиц и активности макрофагов (рис. 9).

Заключение

Проведенное исследование продемонстрировало высокую эффективность разработанной технологии лазерного восстановления мягких тканей *in vivo* на лабораторных кроликах. Применение лазерного биополимерного припоя, основанного на бычьем сывороточном альбумине, одностенных углеродных нанотрубках и хромофоре индоцианине зеленом, в сочетании с лазерным облучением с длиной волны 810 nm, обеспечило ускоренное и равномерное восстановление микроциркуляции кровотока в зоне формирования лазерного шва. Результаты, полученные методом лазерной спекл-контрастной визуализации, показали, что лазерный метод восстановления превосходит традиционные методы наложения швов, особенно на третьи и пятые сутки после операции, демонстрируя более высокую эффективность заживления. Гистологические и иммуногистохимические исследования подтвердили ускоренное наступление пролиферативной фазы и эпителизацию раневой поверхности, что свидетельствует о качественном процессе регенерации тканей без образования грубого рубца. Отсутствие морфологических изменений и признаков токсичности в лимфатических узлах, прилегающих к зоне лазерного воздействия, указывает на безопасность разработанной технологии и отсутствие негативного влияния на окружающие ткани и органы.

Таким образом, лазерное восстановление мягких тканей с использованием разработанного биополимерного припоя и контролируемого лазерного облучения является перспективным направлением в хирургии, обеспечивая ускоренное заживление ран, минимизацию рубцевания и сохранение нормальной микроциркуляции.

Финансирование работы

Работа по лазерному восстановлению мягких тканей и гистологические исследования выполнены в рамках государственного задания Минобрнауки России (Проект FSMR-2024-0003). Исследования кровотока методом лазерной спекл-контрастной визуализации выполнены при поддержке гранта РНФ (проект № 22-65-00096).

Соблюдение этических стандартов

Эксперимент *in vivo* проводился по строгому протоколу Этического Комитета Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

[1] H.V. Vinters, K.A. Galil, M.J. Lundie. Neuroradiology, **27**, 279 (1985). DOI: 10.1007/BF00339559
[2] P. Ferreira, H. Gil, P. Alves. *An overview in surgical adhesives.* In *Recent Advances in Adhesions Research (Nova Science Publishers*, Inc., Hauppauge, NY., 2013), p. 59–85.
[3] R. Urie, T. Flake, K. Rege. *Laser Tissue Welding.* In *Wound Healing and Surgical Repair Bioengineering In Wound Healing: A Systems Approach*, 303-324 (2017). DOI: 10.1142/9789813144583_0011

[4] K.M. McNally, S.B. Sorg, A.J. Welch, J.M. Dawes, E.R. Owen. Phys. Med. Biol., **44** (4), 983 (1999). DOI: 10.1088/0031-9155/44/4/013
[5] L.W. Murray, L. Su, G.E. Kopchok, R.A. White. Lasers in Surgery and Medicine, **9** (5), 490 (1989). DOI: 10.1002/lsm.1900090512
[6] B.B. Scott, M.A. Randolph, F.P.S. Guastaldi, R.C. Wu, R.W. Redmond. Surg. Innov., **30** (2), 143 (2023). DOI: 10.1177/15533506221104382
[7] C. Li, K. Wang, Opt. Laser Technol., **138**, 106862 (2021). DOI: 10.1016/j.optlastec.2020.106862
[8] J. Dong, H. Breitenborn, R. Piccoli, L.V. Besteiro, P. You, D. Caraffini, Z.M. Wang, A.O. Govorov. Biomed. Opt. Express, **11** (4), 2254 (2020). DOI: 10.1364/BOE.389561
[9] Y.A. Mistry, S.S. Natarajan, S.A. Ahuja. Ann. Maxillofac. Surg., **8** (1), 35 (2018). DOI: 10.4103/ams.ams_147_17
[10] J.W. Oliver, R.L. Vincelette, G.D. Noojin, C.D. Clark III, C.A. Harbert, K.J. Schuster, A.D. Shingledecker, S.S. Kumru, J. Maughan, N. Kitzis, G.D. Buffington, D.J. Stolarski, R.J. Thomas. J. Biomed. Opt., **18** (12), 125002 (2013). DOI: 10.1117/1.JBO.18.12.125002
[11] J.N. Bixler, B.H. Hokr, M.L. Denton, G.D. Noojin, A.D. Shingledecker, H.T. Beier, R.J. Thomas, B.A. Rockwell, V.V. Yakovlev. J. Biomed. Opt., **19** (7), 070501 (2014). DOI: 10.1117/1.JBO.19.7.070501
[12] P. Vescovi, E. Merigo, C. Fornaini, J.-P. Rocca, S. Nammour. Medicina Oral, Patol. Oral Cir. Bucal, **17** (4), e697 (2012). DOI: 10.1109/IWBP.2011.5954804
[13] B. Hiebl, L. Ascher, K. Luetzow, K. Kratz, C. Gruber, C. Mrowietz, Clin. Hemorheol. Microcirc., **69** (1-2), 317 (2018). DOI: 10.3233/CH-189108
[14] M.B. Reinhart, C.R. Huntington, L.J. Blair, B.T. Heniford, V.A. Augenstein, Surg. Innov., **23** (2), 166 (2015). DOI: 10.1177/1553350615604053
[15] A.Yu. Gerasimenko, E.A. Morozova, D.I. Ryabkin, A. Fayzullin, S.V. Tarasenko, V.V. Molodykh, E.S. Pyankov, M.S. Savelyev, E.A. Sorokina, A.Y. Rogalsky, A. Shekhter, D.V. Telyshev. Bioengineering, **9** (6), 238 (2022). DOI: 10.3390/bioengineering9060238
[16] А.Ю. Герасименко, Д.И. Рябкин. Конденсированные среды и межфазные границы, **21** (2), 191 (2019).
[17] A. Gerasimenko, N. Zhurbina, U. Kurilova, A. Polokhin, D. Ryabkin, M. Savelyev, V. Podgaetsky. SPIE, **10675**, 111 (2018). DOI: 10.1117/12.2306792
[18] G. Piavchenko, I. Kozlov, V. Dremin, D. Stavtsev, E. Seryogina, K. Kandurova. J. Biophotonics, **14** (12), e202100216 (2021). DOI: 10.1002/jbio.202100216
[19] A.-A. Grosset, K. Loayza-Vega, É. Adam-Granger, M. Birlea, B. Gilks, B. Nguyen, G. Soucy, D. Tran-Thanh, R. Albadine, D. Trudel, Appl. Immunohistochem. Molecular Morphology, **27** (7), 558 (2019). DOI: 10.1097/PAI.0000000000000727