*На правах рукописи*

**Минаева Светлана Анатольевна**

# Лазерное формирование и диагностика биоактивных микро- и макроструктур

05.27.03 – Квантовая электроника

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Институте фотонных технологий РАН Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук»

**Научный руководитель:**

доктор физико-математических наук
**Попов** Владимир Карпович
Институт фотонных технологий РАН
Федерального государственного учреждения
«Федеральный научно-исследовательский центр
«Кристаллография и фотоника»
Российской академии наук»

**Официальные оппоненты:**

доктор физико-математических наук, профессор
**Чикишев** Андрей Юрьевич
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова»

кандидат физико-математических наук, в.н.с.
**Климентов** Сергей Михайлович
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Национальный
исследовательский ядерный университет «МИФИ»

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр «Институт общей
физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук»
(ИОФ РАН)

Защита диссертации состоится “ ” _____ 2021 г. в___час. ___ мин. на заседании диссертационного совета Д 002.114.02 на базе ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН в ИПЛИТ РАН - филиале ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН по адресу: 140700, Московская обл., г. Шатура, ул. Святоозерская, д. 1. Круглый зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИПЛИТ РАН - филиале ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН, а также на сайте www.laser.ru

Автореферат разослан “ ” _____2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 002.114.02

кандидат физико-математических наук А. А. Лотин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

На современном этапе развития науки проведение прорывных исследований невозможно без использования передовых методик и высокотехнологичного оборудования. Успехи квантовой электроники привели к созданию в 1960 году первого лазера, положившего начало новым фундаментальным исследованиям в различных областях физики, химии, биологии и медицины. Дальнейшее развитие квантовой электроники и совершенствование лазерной техники обеспечило формирование и развитие совершенно новых научных направлений, таких как, лазерная обработка и модификация перспективных материалов, лазерные методы диагностики вещества, лазерные коммуникационные технологии и др. Сегодня лазеры играют ключевую роль в технологиях аддитивного производства, которые, в свою очередь, являются основой принципиально новых подходов к решению актуальных и социально-значимых задач тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Лазерные технологии аддитивного производства (лазерная стереолитография, селективное лазерное спекание, а также их различные модификации) позволяют формировать на основе трехмерных (3D) компьютерных моделей объемные структуры и изделия сложной архитектоники из различных материалов со столь высокими воспроизводимостью и пространственным разрешением, которые просто нельзя было получить ранее другими способами. Такие изделия на основе биорезорбируемых (постепенно растворяющихся в организме) полимеров гомологического ряда алифатических полиэфиров (полилактиды, полигликолиды и их сополимеры – полилактогликолиды) чрезвычайно востребованы сегодня как в биомедицинских исследованиях, так и в клинической практике. Однако применение для их производства лазерных технологий, основанных на термоиндуцированных процессах, до недавнего времени было ограничено термолабильностью этих полимеров, во многих случаях обусловливающей изменение молекулярно-массового распределения последних, приводящего, в свою очередь, к нестабильности их физико-химических и биохимических характеристик. В 2004 году специалистами Отделения перспективных лазерных технологий ИПЛИТ РАН был предложен и впервые реализован процесс поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС), который позволяет избегать перегрева и объемного плавления полимерных материалов, а значит и сохранять их исходные свойства. Это обеспечило принципиальную возможность не только формировать методом ПСЛС трехмерные структуры (матриксы) для тканеинженерных конструкций (ТИК) из термолабильных биосовместимых и биорезорбируемых материалов, но и сохранять биоактивность инкапсулированных в них молекулярных комплексов и фармацевтических субстанций, необходимых для эффективного восстановления поврежденных фрагментов тканей и органов, а также способных выступать в качестве компонентов лекарственных форм пролонгированного действия.

Все вышеизложенное и послужило основной мотивацией к проведению настоящей диссертационной работы, направленной на дальнейшее исследование процесса ПСЛС, развитие методологии его применения для формирования разнообразных биоактивных микро- и макроструктур, а также разработки новых лазерных методов диагностики последних.

**Степень разработанности темы**

К моменту начала работы над диссертацией (2007 г.) уже была показана принципиальная возможность формирования методом ПСЛС биорезорбируемых 3D структур из термолабильных алифатических полиэфиров без сколько-нибудь существенного изменения их молекулярно-массового распределения, а также сохранения высокой степени (до 80% от исходной) биоактивности, содержащихся в них ферментов рибонуклеазы и каталазы [1–3]. Проявилась необходимость дальнейшего развития и совершенствования этого подхода с целью эффективного формирования биоактивных полимерных матриксов заданной архитектоники, содержащих терапевтически значимые концентрации факторов роста (в частности, стимулирующих остеогенную дифференцировку стволовых клеток), а также антибиотиков, подавляющих негативное развитие постоперационных инфекций, и других фармацевтических субстанций. Тогда же возникла и потребность в разработке новых методик характеризации этих структур и изучении процессов, происходящих с ними в биологических активных средах.

Все эти задачи были успешно решены в ходе выполнения настоящей диссертационной работы с помощью лазерных технологий, что нашло свое отражение и подтверждение в соответствующих публикациях в рецензируемых научных журналах, а также докладах на различных международных и национальных конференциях.

**Цель и задачи**

Основная **цель** диссертационной работы - расширение областей применения устройств и приборов квантовой электроники на основе разработки новых подходов к лазерному формированию термолабильных полимерных биорезорбируемых трехмерных структур, содержащих биоактивные компоненты с помощью метода поверхностно-селективного лазерного спекания и методик их структурной характеризации с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния, а также *in vitro* и *in vivo* исследования их физико-химических и биохимических свойств.

**Задачи:**

- Поиск оптимальных параметров формирования биоактивных полимерных трехмерных структур (матриксов) заданной архитектоники на основе алифатических полиэфиров методом поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС).
- Исследование влияния интенсивности и дозы лазерного воздействия в процессе ПСЛС биорезорбируемых полимерных структур на кинетику высвобождения из них биоактивных компонентов в модельные среды, а также на степень их биоактивности.
- Исследование возможности использования воды и наночастиц золота в качестве сенсибилизаторов нагрева поверхности микрочастиц алифатических полиэфиров для их поверхностно-селективного лазерного спекания.
- Разработка и создание экспериментальной установки ПСЛС для работы с водой в качестве сенсибилизатора лазерного нагрева, а также оптимизация режимов спекания микрочастиц алифатических полиэфиров путем контроля тепловых полей при лазерном нагреве их поверхности.
- Разработка методик анализа пространственного распределения биоактивных компонент в биорезорбируемых полимерных матриксах и исследования кинетики их высвобождения в модельные среды с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния.
- Исследование цитотоксичности полимерных матриксов, сформированных методом ПСЛС, с использованием клеточных культур *in vitro* и их биосовместимости на лабораторных животных *in vivo*.

**Научная новизна**

1. Впервые показано, что методом поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС) можно формировать биорезорбируемые трехмерные матричные структуры из алифатических полиэфиров для тканеинженерных конструкций, содержащие фосфаты кальция, трипсин, гентамицин и метилурацил, сохраняя при этом значительную (до 90% от исходной) степень их биоактивности.
2. Впервые продемонстрирована возможность управления временным профилем высвобождения биоактивных веществ из полимерных структур варьируя параметры ПСЛС последних.
3. Показано, что, наряду с применявшимися ранее наночастицами углерода, в качестве сенсибилизатора поверхностного нагрева полимерных микрочастиц для их поверхностно-селективного лазерного спекания можно эффективно использовать наночастицы золота (золотые нанооболочки на силикатных ядрах).
4. Предложен и разработан новый метод поверхностно-селективного лазерного спекания на основе использования воды в качестве сенсибилизатора нагрева поверхности термолабильных алифатических полиэфиров. Для этого случая проведены исследования пространственно-

временного распределения и временной эволюции лазерно-индуцированных температурных полей на поверхности и в объеме полимерных частиц, а также их порошковых слоев. Развита математическая модель этого процесса и проведена ее экспериментальная верификация.

5. Разработаны методики определения пространственного распределения мелкодисперсных фосфатов кальция, гентамицина и метилурацила в биорезорбируемых полимерных матриксах и изучения кинетики их высвобождения в модельные среды с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния.
6. Впервые методом поверхностно-селективного лазерного спекания сформированы трехмерные структуры из полилактогликолида для тканеинженерных конструкций, содержащие костный морфогенетический белок-2 (BMP-2), с управляемой кинетикой его высвобождения.

**Практическая значимость**

Проведенные в диссертационной работе исследования продемонстрировали возможности поверхностно-селективного лазерного спекания биоактивных матриксов различной архитектоники и функциональности на основе биорезорбируемых алифатических полиэфиров, что дало возможность расширить область применения устройств и приборов квантовой электроники в тканевой инженерии, регенеративной медицине и фармацевтике. Показаны преимущества метода ПСЛС по сравнению с другими лазерными технологиями аддитивного производства и определены границы его применимости для решения конкретных биомедицинских задач. Доказана возможность управления кинетикой высвобождения биоактивных компонентов из биорезорбируемых полимерных матриксов с помощью поверхностно-селективного лазерного воздействия. При этом показано, что в случае использования оптимальных параметров ПСЛС его применение не оказывает негативного воздействия на термолабильные материалы и позволяет формировать биосовместимые матриксы заданной формы и структуры, обеспечивающие высокую клеточную адгезию и пролиферацию, способствуя эффективному формированию биотканей требуемого типа.

**Положения, выносимые на защиту**

1. Метод поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС) существенно расширяет возможности применения устройств и приборов квантовой электроники в биомедицинских исследованиях, позволяя проводить эффективное формирование полимерных матриксов для тканевой инженерии, содержащих биоактивные вещества, сохраняющие при этом значительную (до 90% от исходной) степень своей активности.
2. Варьируя параметры процесса поверхностно-селективного лазерного спекания (интенсивность и скорость сканирования лазерного излучения), можно управлять кинетикой высвобождения биоактивных веществ из матриксов.

3. Спектроскопия комбинационного рассеяния с высоким (до 1 мкм) пространственным разрешением позволяет проводить исследование распределения концентраций фосфатов кальция, гентамицина и метилурацила в полимерных матриксах, сформированных методом ПСЛС, а также проводить анализ кинетики их высвобождения из таких матриксов в модельные среды.
4. Вода, нанесенная на поверхность частиц алифатических полиэфиров, может являться эффективным и биологически безопасным сенсибилизатором их локального нагрева в процессе поверхностно-селективного лазерного спекания.
5. Модель поверхностно-селективного лазерного спекания с использованием воды в качестве сенсибилизатора лазерного нагрева поверхности термолабильных алифатических полиэфиров позволяет проводить расчет пространственного распределения их температуры и оптимизацию режимов спекания их микрочастиц.
6. Метод ПСЛС с использованием воды в качестве сенсибилизатора нагрева поверхности термолабильных алифатических полиэфиров позволяет формировать биосовместимые матриксы, содержащие интактный костный морфогенетический белок-2 с регулируемой кинетикой его высвобождения.

**Личный вклад автора**

В диссертации представлены результаты исследований, выполненных лично автором или при его решающем участии в период с 2007 по 2020 годы. Автор принимала непосредственное участие в разработке методик исследования, подготовке и проведении экспериментов, наработке экспериментальных образцов и их комплексной характеризации, а также анализе полученных результатов и их оформлении в виде научных публикаций.

**Степень достоверности и апробация результатов**

Изложенные в диссертационной работе результаты неоднократно докладывались автором и обсуждались на семинарах в ИФТ РАН ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, а также на конференциях: «Сверхкритические флюиды: фундаментальные основы, технологии, инновации» V, VI (2009, 2011 гг.), Международная конференция “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии” (2007, 2008 гг.), Junior Euromat 2012, IX Школа-семинар молодых ученых России "Проблемы устойчивого развития региона" 2019, TERMIS EU 2019.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в рецензируемых научных журналах, представлены на различных международных и национальных конференциях. По материалам диссертации опубликовано 14 статей в рецензируемых журналах из перечня ВАК и 13 публикаций в сборниках трудов конференции.

**Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и списка литературы. Объем диссертации составляет 158 страницы, 86 рисунков и список литературы, состоящий из 184 источников.

**Краткое содержание работы**

Во **Введении** сформулирована и обоснована актуальность темы диссертационной работы, показано её научно-практическое значение, обсуждены объекты и задачи исследования.

В **Главе 1** проведен анализ научно-технической литературы в области современного и перспективного использования устройств и приборов квантовой электроники для решения проблем восстановления фрагментов тканей и органов человека и животных с помощью тканеинженерных конструкций. Приведены основные определения и сформулированы требования, предъявляемые сегодня к матриксам для ТИК, а также рассмотрены соответствующие материалы для их изготовления. Дан обзор современного состояния научных исследований в области разработки и применения лазерных методов (включая технологии аддитивного производства) формирования и диагностики биоактивных матриксов для тканевой инженерии, а также проведен сравнительный анализ их достоинств и недостатков. Обоснованы и сформулированы основные цели и задачи настоящей работы.

**Глава 2** посвящена описанию процесса формирования биоактивных полимерных трехмерных структур (матриксов), на основе алифатических полиэфиров методом поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС), содержащих биоактивные вещества (БАВ), и результатам исследования их физико-химических и биохимических свойств.

Метод поверхностно-селективного лазерного спекания был предложен и реализован исследователями Отделения перспективных лазерных технологий ИПЛИТ РАН [1–4] с целью изготовления матриксов заданной формы с контролируемой пористостью и временем резорбции из биосовместимых термолабильных полимерных материалов, содержащих БАВ. В основе создания таких структур лежит процесс последовательного послойного лазерного спекания тонких слоев полимерных микрочастиц за счет плавления только их поверхности и близлежащих приповерхностных слоев. Для этого используется лазерное излучение ИК-диапазона с длинами волн 0,97 и 1,94 мкм. В этой области спектра используемые полимерные частицы являются практически прозрачными (коэффициент поглощения $<10^{-1}$ см$^{-1}$). А разогрев их поверхности идет за счет нагрева наночастиц, которые равномерно распределены по поверхности полимерных микрочастиц и интенсивно поглощают лазерное излучение. Таким образом, плавление полимерных микрочастиц начинается во множестве локальных точек на их поверхности, постепенно распространяясь вглубь их объема. При этом максимальная температура достигается

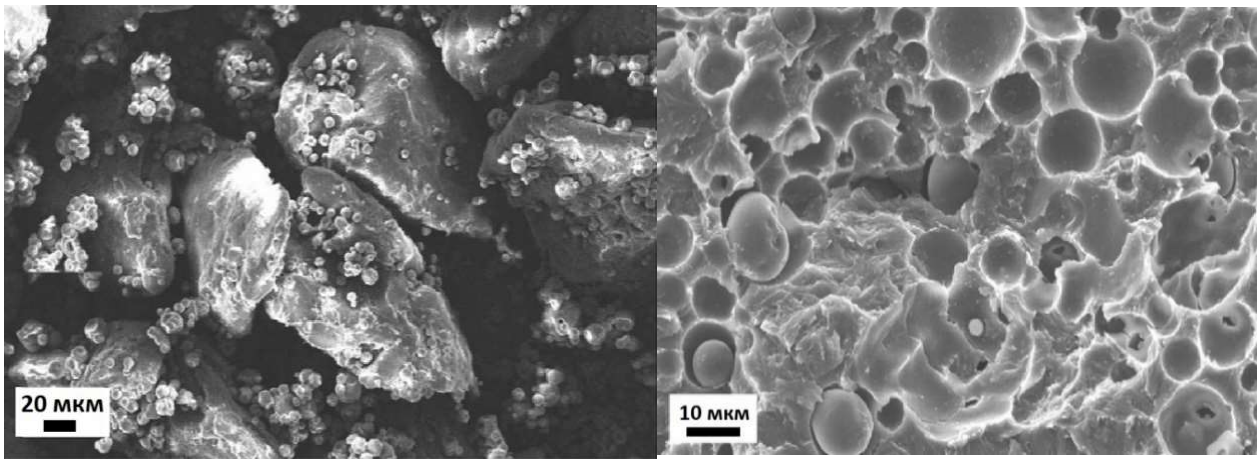
на поверхности частиц, убывая к их центру, а температурные градиенты имеют масштабы размеров частиц полимера, а не толщины характерного слоя полимерного порошка [4]. Таким образом, преимуществом ПСЛС является возможность использования порошков термолабильных биорезорбируемых полимеров, таких как полилактид, полигликолид, поли-ε-капролактон и др., уже сертифицированных для биомедицинских применений, а также их комбинаций с неорганическими и органическими биоактивными веществами для изготовления индивидуальных матриксов для тканевой инженерии.

В наших экспериментах использовалась оригинальная лабораторная установка СЛС-100, разработанная и изготовленная в ИПЛИТ РАН [5,6]. В качестве источника излучения использовался лазер на итербийактивированном волокне с длиной волны излучения $\lambda = 1{,}06$ мкм и выходной мощностью до 10 Вт (НТО «ИРЭ-Полюс», г. Фрязино, Россия), диаметр лазерного пучка 100 мкм. Установка состоит из оптического тракта формирования лазерного излучения с двухкоординатным оптическим сканатором, рабочей камеры спекания, системы приготовления и подачи полимерного порошка, системы термостатирования и компьютера с программным обеспечением для управления элементами установки. После загрузки в систему подачи смеси полимерного порошка требуемой дисперсности (характерный размер частиц ~ 100 мкм) с добавкой сенсибилизатора нагрева (0,1 ÷ 1,0 масс. %), выбора 3D модели изготавливаемого матрикса, а также параметров лазерного излучения и режимов его сканирования, дальнейшее формирование требуемого изделия происходит автоматически. Скорость сканирования лазерного излучения может варьироваться от 0,1 до 20 см/сек. В подавляющем большинстве наших экспериментов в качестве сенсибилизатора нагрева полимерных частиц использовались наночастицы углерода (НЧУ) (характерный размер их агломератов ~ 100 нм), представлявшие собой очищенную печную сажу [4].

Метод ПСЛС дает возможность спекать различные порошковые материалы, состоящие из микрочастиц разных форм и размеров, варьируя как диаметр лазерного пятна на поверхности порошкового слоя, так и скорость его перемещения. Поэтому для проведения сравнительного анализа получаемых результатов необходимо выбрать наиболее характерный параметр соответствующего процесса. Одним из таких параметров в наших экспериментах являлся порог спекания. Он соответствует минимальной мощности лазерного излучения в процессе ПСЛС (при определенной скорости сканирования и размере фокального пятна излучения на поверхности порошка), обеспечивающей структурную целостность и механическую прочность формируемых изделий, достаточные для проведения с ними последующих манипуляций. Поэтому, в диссертационной работе практически все сравнения результатов ПСЛС различных материалов проводились в единицах превышения используемой лазерной энергии над конкретным значением порога спекания.

Направленная биоактивность – это одно из требований, предъявляемых сегодня к матриксам для ТИК. Она может достигаться, в частности, за счет инкапсуляции биоактивных компонент в структуру полимерного матрикса. При этом, в идеале, БАВ должны сохранять свою активность на протяжении всего времени резорбции матрикса в организме, постепенно высвобождаясь из него в окружающие ткани. Однако, как следует из литературного обзора, далеко не все методы формирования таких матриксов позволяют включать в них БАВ на стадии их изготовления. Это обусловлено использованием в этих процессах либо токсичных органических растворителей, либо высоких температур, ведущих к заметному снижению, а часто и к полной потере исходной биоактивности. Метод ПСЛС позволяет избежать влияния первого негативного фактора и существенно минимизировать влияние второго. Однако, это требует детального и комплексного изучения влияния параметров ПСЛС как на сохранение активности БАВ в формируемых полимерных матриксах, так и на кинетику их высвобождения из последних.

В диссертационной работе проведено экспериментальное исследование влияния интенсивности и дозы лазерного воздействия на кинетику высвобождения БАВ из полимерных матриксов. В эксперименте использовалось два биорезорбируемых полимера гомологического ряда алифатических полиэфиров с различной молекулярной массой: (D,L)-полилактид (ПЛ) (Alkermes Inc, США, молекулярная масса $M_w$ = 84 кДа) и поликапролактон (ПКЛ) (Sigma-Aldrich, $M_w$ = 14 кДа). В качестве БАВ были выбраны экстракты лекарственных растений подорожника и календулы (ЭПК) в соотношении 1:1 по массе. Для формирования полимерных микрочастиц содержащих БАВ использовался метод их пластификации и последующего вспенивания в среде сверхкритического диоксида углерода (ск-$CO_2$). На рисунке 1а показана фотография исходной смеси полимерных микрочастиц и частиц ЭПК, а на рисунке 1б внутренняя структура биоактивного композита ПЛ с ЭПК.




а б

Рисунок 1 – смесь исходных компонентов матрикса (а); биоактивный композит, полученный после пластификации и вспенивания ПЛ с ЭПК в ск-$CO_2$ (б).

Контроль состава смеси ЭПК и ПЛ, а также их композитов, полученных методом пластификации и последующего вспенивания в ск-$CO_2$, проводился методом ИК-Фурье спектроскопии с помощью спектрометра Impact 410 (“Nicolet”, США). Регистрировались спектры поглощения исследуемых материалов в диапазоне 2000 ÷ 5000 $см^{-1}$. Спектры смеси ЭПК и ПЛ, а также композитов на ее основе практически идентичны и являются суммой спектров ЭПК и ПЛ. Это свидетельствует о том, что процесс формирования композита путем пластификации и последующего вспенивания в ск-$CO_2$ не изменяет молекулярную структуру исходных веществ.

Процесс формирования экспериментальных образцов матриксов из ПЛ и ПКЛ содержащих ЭПК проходил следующим образом. Композит полимера с ЭПК размалывался с помощью ротационной мельницы, полученные частицы просеивались через сита и отбиралась фракция частиц с размером от 100 до 200 мкм. Затем из этих микрочастиц методом ПСЛС формировались модельные структуры в виде стержней диаметром приблизительно 1 мм и длиной в несколько миллиметров. Мощность лазерного воздействия в процессе ПСЛС превышала порог спекания в 1,5 раза, 3 раза и 6 раз. Скорость сканирования лазерного излучения, составляла 20 см/сек.

Проведено исследование временного профиля высвобождения биоактивных веществ из матриксов, сформированных методом ПСЛС, в физиологический раствор. Для этого от исследуемых образцов отделялись фрагменты весом приблизительно 10 мг, каждый из которых затем помещался в 2 мл физиологического раствора. Растворы с образцами выдерживали при комнатной температуре в условиях медленного (30 об/мин) перемешивания. Через определенные промежутки времени отбирали по одному образцу, центрифугировали его в течение 15 минут при 4500 об./мин для отделения нерастворенного осадка, и затем фильтровали через лабораторный бумажный фильтр. Измерения количества ЭПК в отобранном растворе проводили по его оптической плотности на длине волны 330 нм (спектр поглощения водного раствора ЭПК имеет максимум на этой длине волны).

Для всех исследованных образцов рассчитывалась максимально возможная концентрация ЭПК в растворе, которая принималась за 100%. Результаты исследования временного профиля высвобождения ЭПК из ПЛ приведены на рисунке 2.

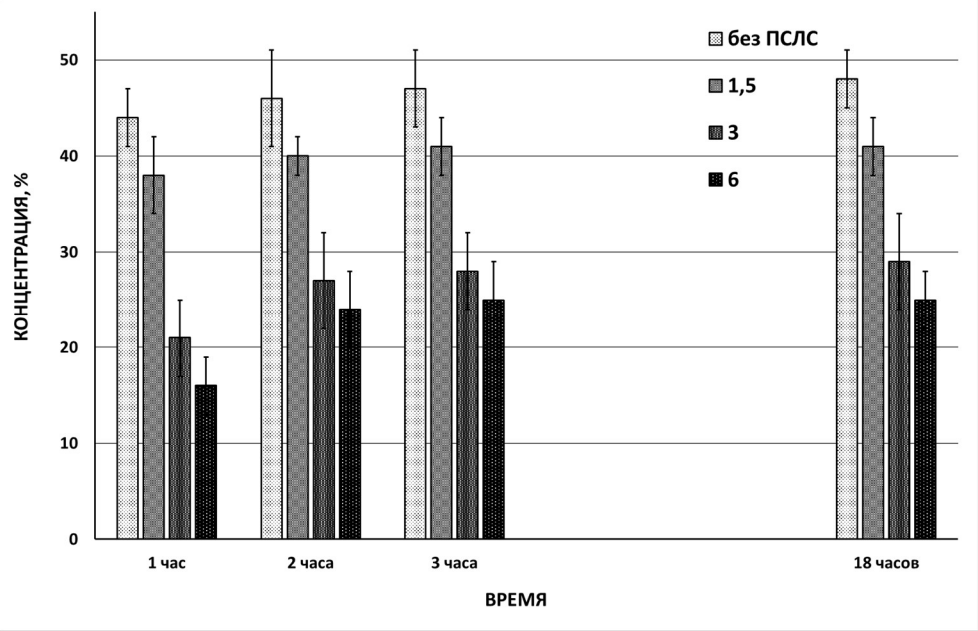



Рисунок 2 - Кинетика высвобождения ЭПК из образцов на основе полилактида, полученных методом ПСЛС при различных превышениях мощности над порогом спекания.

Результаты исследования временного профиля высвобождения ЭПК из ПКЛ приведены на рисунке 3.

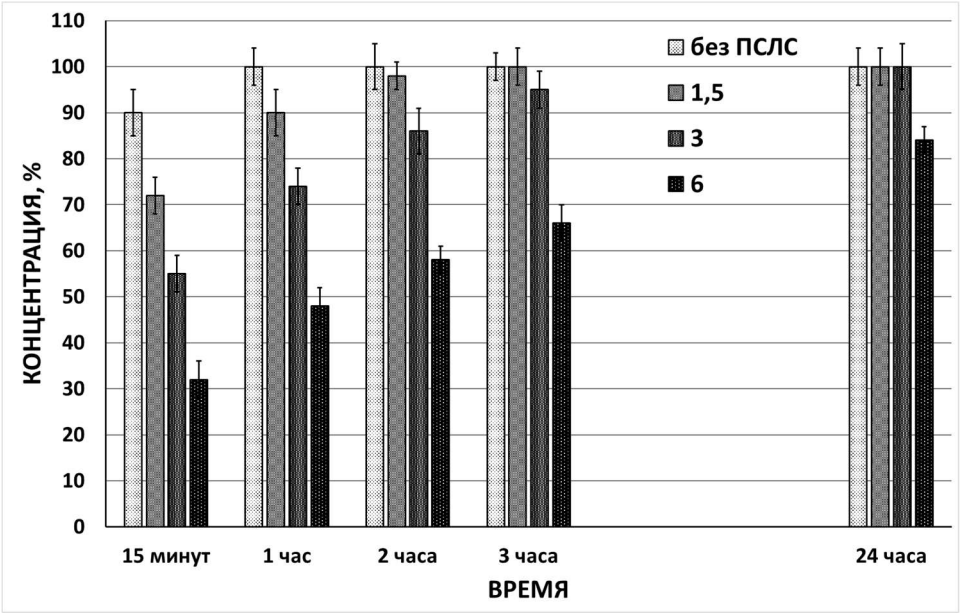



Рисунок 3 - Кинетика высвобождения ЭПК из образцов на основе поликапролактона, полученных методом ПСЛС при различных превышениях мощности над порогом спекания.

Для всех исследованных образцов наблюдается постепенное высвобождение ЭПК в течение всего времени наблюдения (рисунки 2 и 3). При этом скорость высвобождения зависит от дозы лазерного воздействия, использованной в процессе их формирования методом ПСЛС. Видно, что из частиц порошка, не подвергавшихся лазерному воздействию (контрольный образец), ЭПК высвобождается заметно быстрее по сравнению с изготовленными из этого порошка полимерными матриксами. Причем, чем больше интенсивность лазерного воздействия, тем меньше скорость высвобождения ЭПК из сформированных структур. Таким образом, варьируя

параметры процесса ПСЛС (интенсивность и/или скорость сканирования лазерного излучения), можно управлять кинетикой высвобождения биоактивных веществ из полиэфирных матриксов.

В диссертационной работе проведено исследование влияния дозы лазерного воздействия в процессе формирования матриксов методом ПСЛС на активность находящихся них БАВ на примере трипсина (эндогенный протеолитический фермент класса гидролаз). Изготовление микрочастиц из ПЛ, содержащих трипсин, проводилось следующим образом. Порошок ПЛ с размером частиц от 100 до 200 мкм смешивался с порошком трипсина в соотношении по массе 10:1. Получившуюся смесь помещали в реактор высокого давления и проводили процесс ее пластификации с последующим вспениванием в ск-$CO_2$. Затем полученный композит размалывали в ротационной мельнице, полученные частицы просеивались через сита и отбирали фракцию частиц с размером от 100 до 200 мкм. Из этих микрочастиц методом ПСЛС формировали модельные структуры в виде стержней, аналогичные структурам с ЭПК, при мощностях лазерного воздействия в 1,5 раза, 3 раза и 6 раз превышающих пороговую мощность спекания.

Активность трипсина определялась спектрофотометрическим методом с использованием реагентов TAME (p-toluene-sulfonyl-L-argininemethylester), Bz-Arg-pNA (n-nitroanilinesubstrate), аналогично методу, описанному в [7]. Оптическая плотность исследуемого раствора измерялась спектрофотометрически по его поглощению на длине волны 410 нм. Общее время наблюдения составляло 4 минуты. В качестве контроля использовался исходный трипсин, его активность измерялась так же, как и для экспериментальных образцов и была принята за 100%. Результаты измерения активности трипсина представлены на рисунке 4.

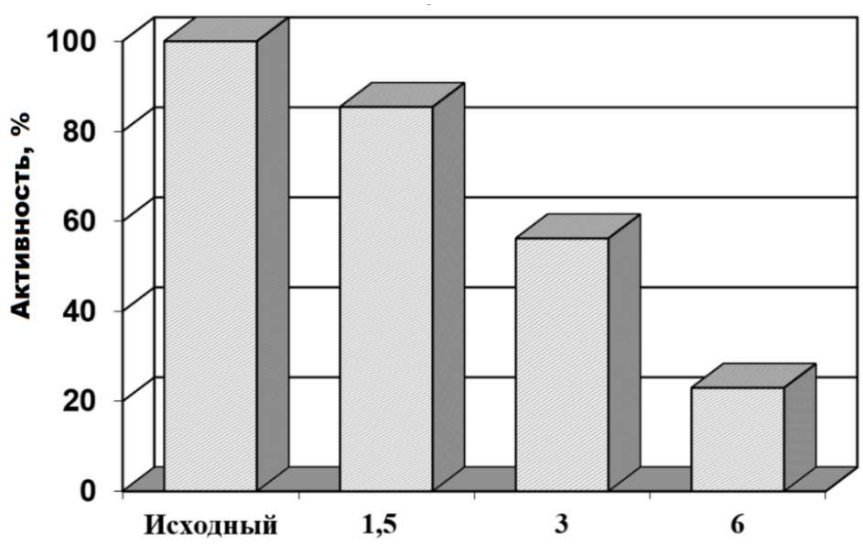



Рисунок 4 - Активность трипсина в зависимости от мощности лазерного воздействия в процессе ПСЛС (цифры по оси абсцисс указывают во сколько раз превышен порог спекания).

Как видно из гистограммы (рисунок 4) активность фермента уменьшается с ростом интенсивности лазерного излучения в процессе ПСЛС за счет его термического воздействия. В то же время трипсин сохраняет значительную часть (до 90% от исходной) своей биоактивности после

лазерного воздействия с интенсивностью в 1,5 раза превышающей пороговую. Даже при 3-х кратном превышении над порогом спекания, активность трипсина остается на уровне около 56% от исходной. Эти результаты достаточно хорошо коррелируют с данными работы [8], в которой при аналогичных условиях измеренная активность рибонуклеазы составляла 69,1%. Таким образом, метод поверхностно-селективного лазерного спекания позволяет проводить эффективное формирование полимерных матриксов для тканевой инженерии, содержащих БАВ, сохраняющие при этом значительную степень их биоактивности.

Поскольку конечной целью создания полимерных матриксов является их имплантация в живой организм, они не должны оказывать негативного воздействия на клетки окружающих их тканей. Поэтому необходимо проведение исследования того, как сформированные методом ПСЛС матриксы будут влиять на жизнеспособность клеток. При этом, поверхность матрикса и его трехмерная структура должны способствовать прикреплению клеток и их распластыванию по поверхности, а далее проникновению их внутрь матрикса, обеспечивая высокую первичную клеточную адгезию и их последующую эффективную пролиферацию. В диссертационной работе проведен анализ биосовместимости *in vitro* и *in vivo* для матриксов, сформированных методом ПСЛС.

Модельные матриксы для проведения исследований *in vitro* и *in vivo* формировали из ПЛ (Alkermes Inc, США, $M_w$ = 84 кДа) методом ПСЛС в форме дисков диаметром 12 мм и высотой 4 мм с трехмерной ячеистой структурой (размеры сторон квадратной ячейки составляли ≈ 0,6 мм). Фотографии полученных матриксов приведены на рисунке 5. Ширина спеченных треков для этих матриксов составляла около 0,8 мм. Скорость сканирования лазерного излучения в процессе ПСЛС формирования матриксов составляла 20 см/сек.

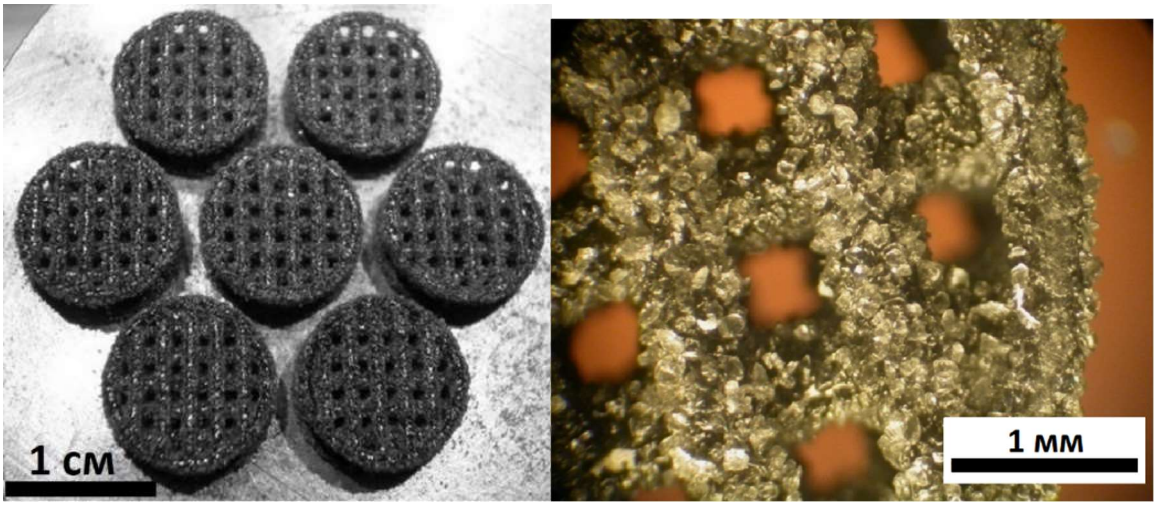



Рисунок 5 - ПЛ матриксы для проведения тестов *in vitro* и *in vivo.*

Для исследования поведения клеток на поверхности полимерных матриксов в диссертационной работе использовали культуру мультипотентных мезенхимальных стромальных

клеток (ММСК) костного мозга человека. Фракция ММСК была выделена согласно стандартному протоколу [9]. Цитотоксичность сформированных методом ПСЛС из ПЛ матриксов оценивали с помощью МТТ-теста. ММСК высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 5÷10 тысяч клеток на лунку. Через сутки после прикрепления клеток, в лунки к ним помещали матриксы, далее одну часть матриксов извлекли через 1 сутки после помещения в лунки, а другую часть через 7 суток. При этом в контрольные лунки матриксы на помещались. Для оценки клеточной адгезии и плотности заселения матриксов из ПЛ ММСК применяли сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) и световую микроскопию с использованием витального флуоресцентного маркера PKH26.

Гистограмма с результатами МТТ-теста приведена на рисунке 6. Анализ результатов МТТ-теста, показал, что матриксы из ПЛ, сформированные методом ПСЛС, не обладают токсическим действием в отношении ММСК. Об этом свидетельствует отсутствие статистически достоверных различий между опытными группами клеток, находившихся в лунках с матриксами, и контролем – клеток, находившихся в аналогичных условиях, но без матриксов (рисунок 6).

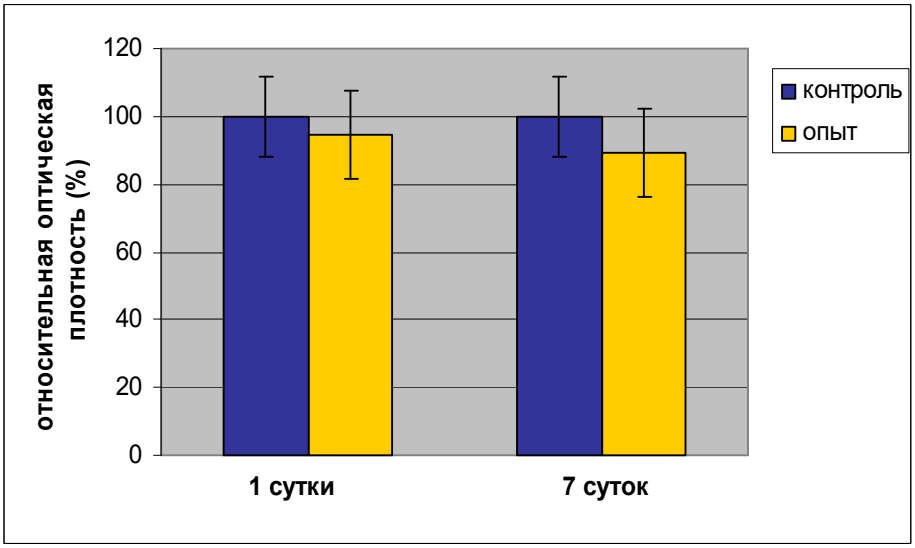



Рисунок 6 - Результаты МТТ-теста.

На микрофотографиях СЭМ, приведенных на рисунке 7, видно, что клетки на третьи сутки культивирования на матриксах из ПЛ, распластаны по их поверхности и плотно прилегают к ней. Каждая клетка располагается, в основном, на отдельной частице полимера. В отдельных случаях клетки образуют структуры, прикрепленные к соседним частицам. По поверхности матрикса клетки распределены достаточно равномерно.

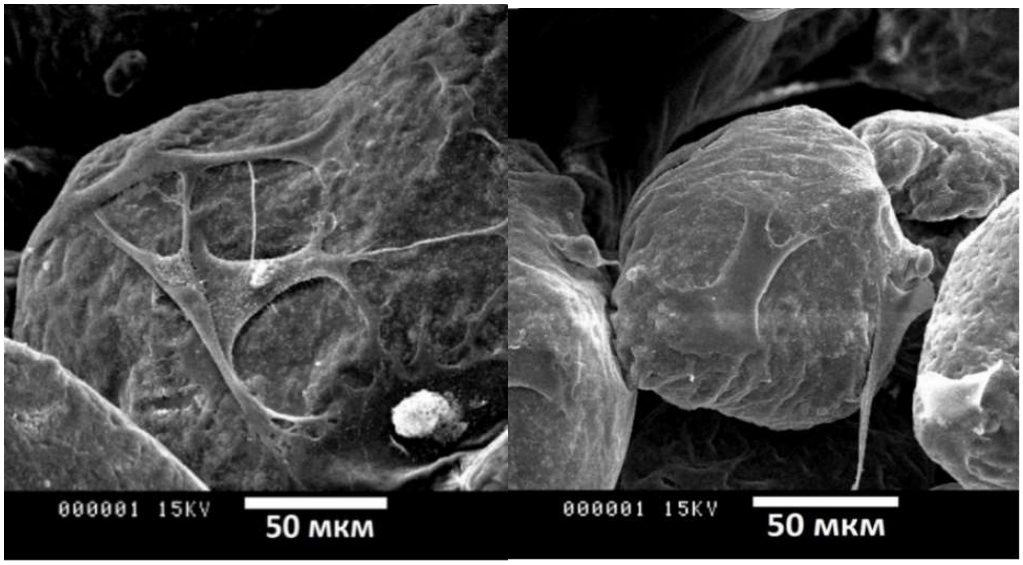



Рисунок 7 - ММСК на поверхности полилактидных матриксов.

На основании результатов проведенных МТТ теста (рисунок 6) и исследований поведения ММСК на поверхности полимерных матриксов (рисунок 7), однозначно следует вывод о том, что матриксы, изготовленные из полилактида методом ПСЛС и имеющие трехмерную пористую структуру с порами размером 0,6 х 0,6 мм$^2$, не обладают цитотоксическим действием и обеспечивают эффективную клеточную адгезию и пролиферацию.

В диссертационной работе проведено исследование матриксов из ПЛ, изготовленных методом ПСЛС, *in vivo*. Матриксы из ПЛ для этих исследований были изготовлены также, как это описано ранее для соответствующих исследований *in vitro* (рисунок 5). На их основе созданы тканеинженерные конструкции, которые представляли собой пористый полилактидные структуры, заселенный аллогенными ММСК костного мозга, культивированными от 1 до 3 пассажей. На каждом матриксе было иммобилизовано от 200 до 300 тысяч клеток, которые инкубировали на нем в течение 7 суток.

В экспериментах использовали половозрелых самцов беспородных крыс, весом 180 - 200 г. Для изучения графтинга (приживления), неоангиогенеза и прорастания ТИК тканями реципиента ТИК вводили подкожно в области спины крысы. Для этого шерсть на спине животного состригали и делали два разреза, один в области холки, другой на расстоянии 4 см от первого разреза. Тупым способом разводили фасции и погружали ТИК в оба сформированных ложа, после чего рану ушивали.

Выведение животных из эксперимента проводили на 30 и 90 сутки наблюдения путем передозировки эфирного наркоза. Выделенные образцы ткани фиксировали в 10% нейтральном формалине. Заливку фрагментов полученных тканей в парафин и изготовление серийных срезов проводили по общепринятой методике. Срезы окрашивали по Маллори и гематоксилином-эозином, далее препараты исследовали с помощью микроскопа (Axioplan-2, Zeiss).

После трансплантации ТИК на основе полилактидных носителей и ММСК под кожу крысам в окружающих их тканях не было выявлено каких-либо патологических изменений, выраженной воспалительной инфильтрации, неопластических изменений и др. Общее состояние животных на протяжении всего эксперимента сохранялось удовлетворительным. Вокруг и внутри трансплантированной ткани образовалась грануляционная ткань с большим количеством кровеносных сосудов и активно пролиферирующими незрелыми клеточными элементами. При трансплантации ТИК на основе ПЛ носителей и ММСК костного мозга в область дефекта ткани или органа создаются необходимые условия для органотипической регенерации, а именно высокий уровень кровоснабжения и концентрации незрелых клеток предшественников, которые под паракринным влиянием микроокружения обеспечат формирование утраченных тканей.

В **Главе 3** диссертационной работы изучена возможность использования наночастиц золота и воды в качестве сенсибилизаторов лазерного нагрева поверхности полимерных микрочастиц в процессе поверхностно-селективного лазерного спекания.

Как выяснилось в ходе наших исследований, использование наночастиц углерода (НЧУ) в качестве сенсибилизатора в методе ПСЛС, вообще говоря, имеет определенные недостатки. Так, например, при подкожной имплантации ТИК, изготовленных с их применением, соответствующая область приобретает темный оттенок, что, в принципе, может рассматриваться как косметический дефект. В исследованиях *in vitro* и *in vivo*, проведенных в настоящей диссертационной работе, а также в работах [4,8], убедительно показано, что НЧУ в количествах используемых для формирования полиэфирных матриксов являются биосовместимыми и нетоксичными, их добавление не оказывает отрицательного влияния на рост живых клеток и биотканей. Однако, учитывая большое разнообразие используемых сегодня углеродных наночастиц как по их размеру, форме, заряду, так и по методам их производства и функционализации, а также их общую тенденцию к агрегации [10], вопрос потенциальной токсичности НЧУ в биомедицинских исследованиях все ещё не решён до конца. В связи с этим нами проведено исследование возможности использования наночастиц золота и воды в качестве сенсибилизаторов лазерного нагрева поверхности полиэфирных микрочастиц.

Золотые наночастицы обладают высокой химической и физической стабильностью. Их поверхность может быть легко функционализирована различными органическими и биологическими молекулами [11]. Они биосовместимы и имеют низкую цитотоксичность [12]. Спектры поглощения и рассеяния металлических наночастиц, как правило, характеризуются резонансными полосами поглощения в УФ и видимом диапазоне. Природа этих полос связана с коллективным поведением электронов проводимости в поле световой волны [13]. Положение полосы поверхностного плазмонного резонанса золотых наночастиц, равно как и другие их физические свойства, в значительной степени определяются их размерами и морфологией [12]. Изменяя характеристики наночастиц, можно управлять частотой и шириной полосы плазмонного

резонанса. Тем самым появляется возможность создания у наночастиц полосы поглощения, попадающей на длину волны лазерного излучения, используемого для ПСЛС, при отсутствии какой-либо выраженной окраски в видимой области.

В наших исследованиях использовались золотые нанооболочки (ЗН) на силикатных ядрах, синтезированные в лаборатория нанобиотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов) [14] в виде водной суспензии, содержащей не менее $10^{10}$ ЗН в миллилитре. Средний диаметр силикатного ядра составлял 140 нм, а средняя толщина золотой оболочки 20 нм. Микрофотография ЗН и спектр их поглощения приведены на рисунке 8.

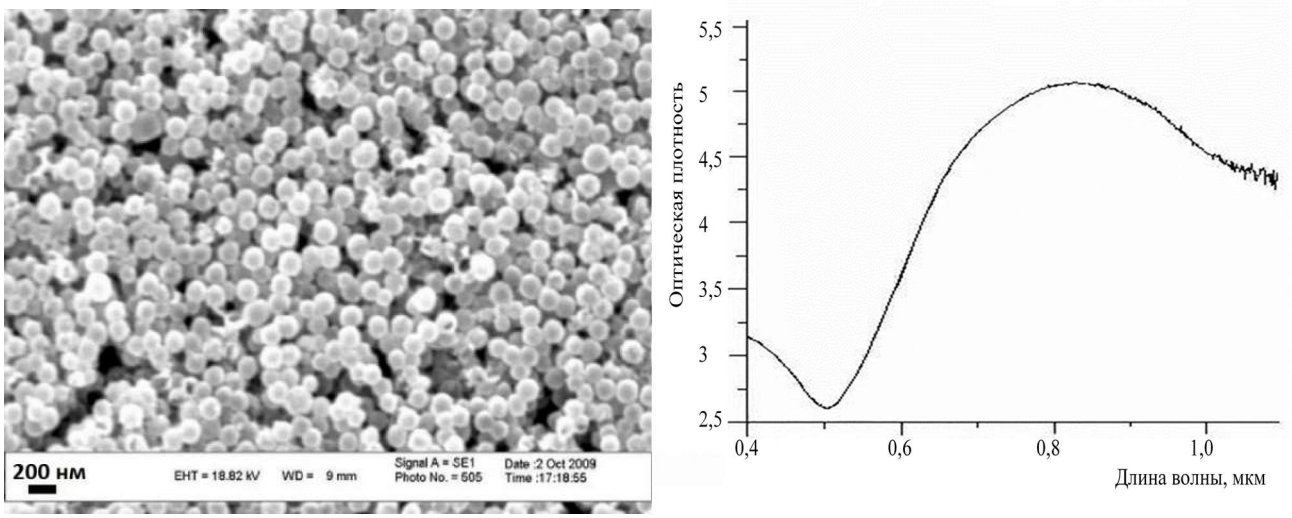



Рисунок 8 - Микрофотография золотых нанооболочек и спектр их поглощения.

В наших экспериментах концентрация ЗН составляла $2 \cdot 10^{10}$ на 1 грамм частиц полимера. Как правило, использовалось 3-х кратное превышение над порогом спекания. Размер пучка лазерного излучения в плоскости спекания составлял около 130 мкм. Микрофотографии спеченных структур приведены на рисунке 9.

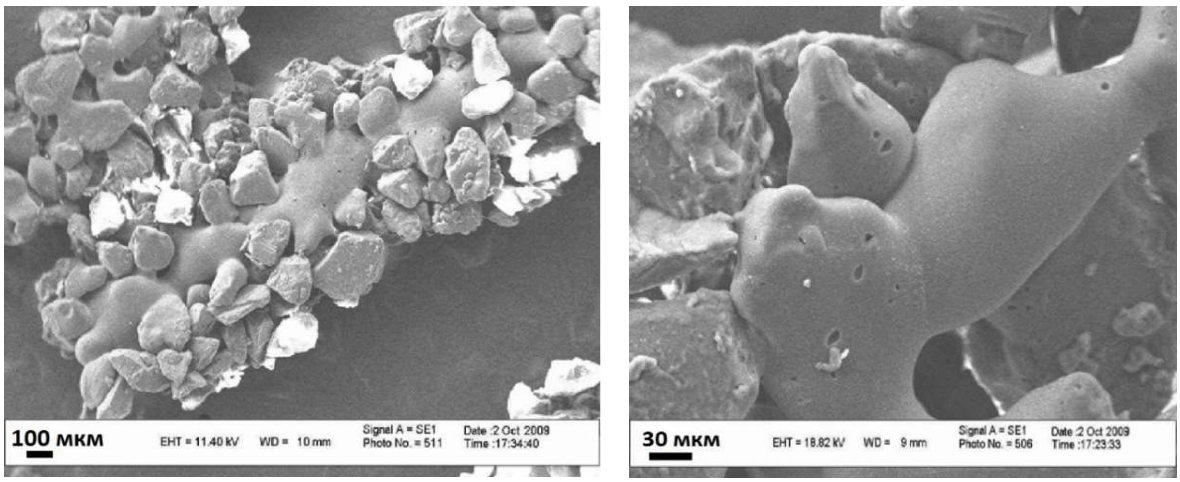



Рисунок 9 – Полиэфирные структуры, сформированные методом ПСЛС с использованием золотых нанооболочек в качестве сенсибилизатора лазерного нагрева.

В отличие от образцов, сформированных методом ПСЛС с использованием углеродных сенсибилизаторов нагрева, ПЛ матриксы с золотыми частицами визуально представляют собой довольно светлые (практически прозрачные) структуры, с легким синеватым оттенком, который обусловлен тем, что часть полосы плазмонного резонанса золотых нанооболочек находится в видимой области спектра (рисунок 10).

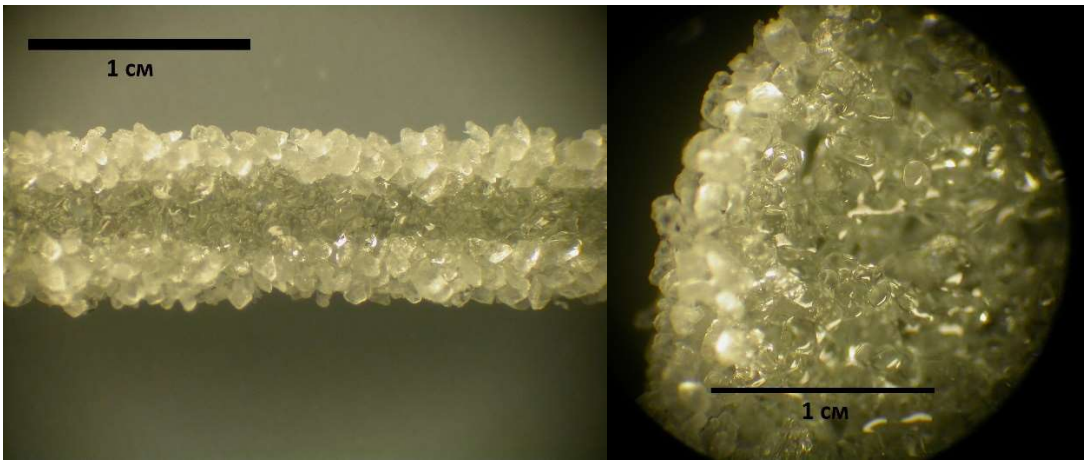



Рисунок 10 – Полиэфирные структуры, сформированные методом ПСЛС с использованием золотых нанооболочек в качестве сенсибилизатора лазерного нагрева.

Таким образом, выбранные нами ЗН обладают следующими преимуществами по отношению к ранее использованным НЧУ: они имеют поглощение на требуемой длине волны и не имеют выраженной окраски в видимой области спектра. При этом экспериментально показано, что золотые нанооболочки являются хорошей альтернативой наночастицам углерода для нагрева поверхности микрочастиц алифатических полиэфиров при их ПСЛС.

Привлекательность использования в качестве сенсибилизатора воды заключается в ее доступности, нетоксичности и биосовместимости. Реализовать эту идею стало возможным благодаря разработке эффективных, недорогих и надежных устройств квантовой электроники на основе лазерных волокон, активированном ионами тулия (Tm), способных генерировать излучение в диапазоне 1,8 - 2,0 мкм [15]. В этом диапазоне, в частности, на длине волны 1,94 мкм коэффициент поглощения воды составляет ≈ 114 $см^{-1}$ [16]. Кроме того, при использовании воды в процессе ПСЛС полиэфирных микрочастиц может происходить уменьшение перегрева их объема за счет кипения воды на их поверхности с одновременным снижением вероятности их термодеструкции.

В наших экспериментах коэффициент поглощения излучения на длине волны 1,96 мкм полилактогликолида (ПЛГ), также используемого для формирования биоактивных структур методом ПСЛС, определялся двумя способами. В первом случае измерения проводились с помощью волоконного лазерного скальпеля ЛС-1,9-«ИРЭ-Полюс» (НТО «ИРЭ-Полюс», Фрязино, Россия) и измерителя мощности (Coherent, Inc., США) согласно оценке изменения мощности лазерного излучения, прошедшего через пленку ПЛГ толщиной 1 мм. Во втором случае

проводилось измерение оптической плотности поглощения той же пленки в ИК спектре с помощью ИК-Фурье спектрометра Impact 410 (“Nicolet”, США). Измеренные двумя способами значения коэффициента поглощения полимера составляли 0,25 ± 0,1 $см^{-1}$ и 0,3 ± 0,05 $см^{-1}$, соответственно. Таким образом, коэффициент поглощения воды на длине волны излучения лазера (1,96 мкм) примерно в 400 раз больше, чем коэффициент поглощения полимера.

Полилактид и полилактогликолид, а также их сополимеры, использовавшиеся в этой работе, являются гидрофобными. Для применения воды в качестве сенсибилизатора лазерного нагрева полимерных частиц необходимо, чтобы она смачивала их поверхность, образуя тонкий слой и не испарялась при этом за время подготовки и проведения ПСЛС. Для гидрофилизации поверхности полиэфирных частиц нами предложено предварительно наносить на них тонкое (порядка нескольких микрон) покрытие из биосовместимых гидрофильных веществ, хорошо удерживающих влагу. В качестве таких веществ были выбраны гиалуроновая кислота (ГК) (несульфированный гликонозаминогликан, входящий в состав соединительной, эпителиальной и нервной тканей, являющийся одним из основных компонентов внеклеточного матрикса) и альгинат натрия (АН) (природный полисахарид, получаемый из бурых морских водорослей).

Нанесение гидрофильных покрытий на частицы полимера осуществлялось следующим образом. Полимерный порошок с размером частиц от 100 до 200 мкм перемешивался в чашке Петри с 1% водным раствором гидрофильного вещества до получения равномерной густой суспензии. Затем суспензия равномерно распределялась по дну чашки Петри и высушивалась в течение 12 часов при температуре 37°С. После высыхания полимерные частицы размешивались в ступке и просеивались через сито с ячейками 200 мкм.

Эксперименты по исследованию процесса смачивания и высыхания сформированных таким образом гидрофильных покрытий показали, что и альгинат натрия, и гиалуроновая кислота обеспечивают хорошую смачиваемость поверхности полиэфирного порошка и удерживают воду на его поверхности в течение времени необходимого и достаточного для формирования одного слоя трехмерной полимерной структуры методом ПСЛС. Таким образом, оба покрытия, в принципе, могут быть использованы для ПСЛС с водой в качестве сенсибилизатора лазерного нагрева.

Для проведения этих исследований нами разработана и создана соответствующая экспериментальная установка ПСЛС [17]. Для спекания в ней используется непрерывное инфракрасное излучение тулиевого волоконного лазера с длиной волны 1,94 мкм (TLM-3, НТО «ИРЭ-Полюс», Фрязино, Россия), которое перемещалось по поверхности образцов с помощью гальваносканера LScanXY (Атеко-ТМ, Россия). Процесс нанесения водного аэрозоля на поверхность частиц порошка производился с помощью ультразвукового увлажнителя воздуха (Stadler Form Jack J-020, Швейцария). Установка оснащена тепловизионной камерой FLIR (A600-series, США) с макрообъективом.

В диссертационной работе исследован процесс ПСЛС мелкодисперсных (характерный размер частиц 50÷100 мкм) порошков полилактогликолида марки PDLG7507 (Purac, Biochem BV, Нидерланды) с использованием воды в качестве сенсибилизатора лазерного нагрева их поверхности. С помощью тепловизионной камеры исследовалось пространственно-временное распределение температурных полей на поверхности слоя полимерного порошка в процессе ПСЛС в зависимости от параметров лазерного воздействия и условий смачивания.

Результаты проведенных экспериментов показали, что максимальная температура в зоне лазерного воздействия ожидаемо растет с уменьшением скорости сканирования. Причем, для полимерных микрочастиц с гидрофильным покрытием этот рост более значительный по сравнению с частицами без покрытия. Увлажнение частиц полимера обеспечивает более эффективное поглощение лазерной энергии и более высокую температуру нагрева поверхности микрочастиц по сравнению с температурой внутри их объема. Полученные данные позволили развить тепловую модель этого процесса, с помощью которой произведен анализ распределения температуры на поверхности и внутри объема частиц полимера.

В нашей модели зависимость изменения распределения температуры в полимерной частице от времени представлена в следующем виде:

$$T(x,t) = T_1(x,t) + T_p(x,t) + T_0,$$

где $T_0$ – начальная (комнатная) температура, $T_p(x,t)$ – нагрев полимера за счёт его объёмного поглощения лазерного излучения, $T_1(x,t)$ – нагрев полимера за счёт теплопередачи от нагретого тонкого водяного слоя.

Проведя необходимые вычисления с учетом малого поглощения излучения полимером, получаем, что оценка температуры объёмного нагрева может проводиться по формуле:

$$T_p(t) = \frac{P\mu_a}{\pi r_0^2}\frac{1}{\rho C_P}t \qquad (1)$$

где $\mu_a$ - коэффициент поглощения полимера, $\rho$ - плотность полимера, $C_p$ - удельная теплоёмкость полимера, P - мощность лазерного излучения.

Так, например, для времени лазерного воздействия = 20 мс (что соответствует скорости сканирования лазерного луча 20 мм/с) мощностью 3 Вт получаем увеличение температуры полимерного слоя на 14°C.

Для оценки составляющей $T_1$, вызванной нагревом тонкого слоя воды, необходимо учитывать процесс теплопередачи. В этом случае мы использовали: 1 - одномерную модель (полубесконечная среда полимера, на поверхности этой среды имеется тонкая плёнка воды толщиной h); и 2 - сферически симметричную модель (отдельная частица полимера, на поверхности которой имеется слой воды толщиной h).

Для одномерной модели изменение температуры описывается следующим уравнением:

$$\frac{\partial T(x,t)}{\partial t} = \chi \frac{\partial^2 (T(x,t))}{\partial x^2} \qquad (2)$$

с граничным условием: $\frac{\partial T}{\partial x} = \frac{Q(t)}{c\rho\chi}$

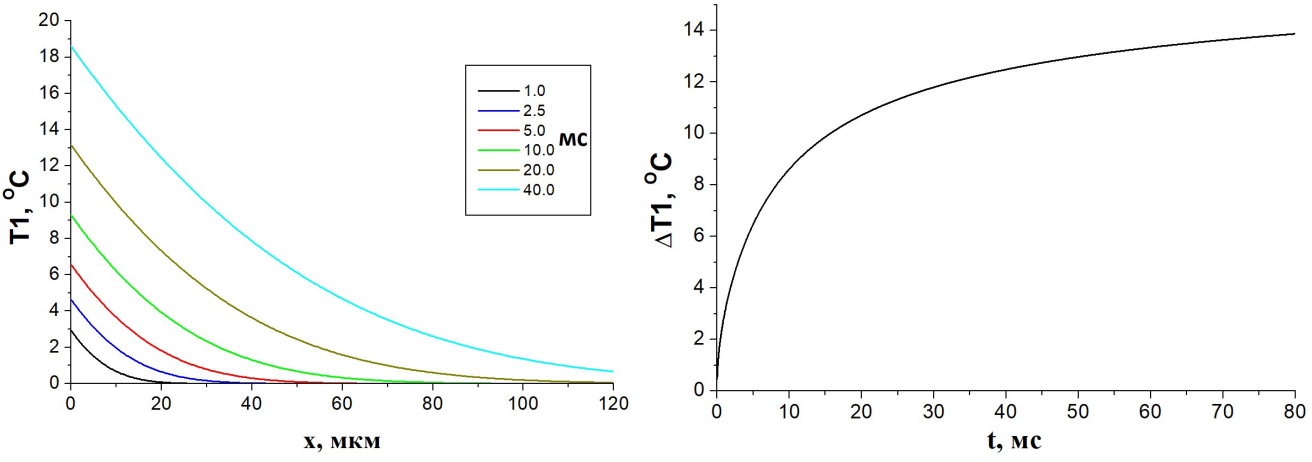
где $Q(t) = P\mu 1_a h/\pi r_0^2$ - плотность потока тепловой энергии от нагретого тонкого слоя воды, $\chi$ - коэффициент температуропроводности, $\mu 1_a$- коэффициент поглощения воды.

Решение такой задачи можно представить в виде выражения:

$$T1(x,t) = \frac{Q(t)}{\rho C}\left(\frac{2\sqrt{\chi t}}{\sqrt{\pi}} e^{-\frac{x^2}{4\chi t}} - x * \mathrm{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{\chi t}}\right)\right) \qquad (3)$$

где $\mathrm{erfc}(z) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_z^\infty e^{-y^2} dy$ - функция ошибок.

На рисунке 11а представлена рассчитанная нами зависимость изменения температуры $T_1$ внутри полимерной частицы от расстояния от ее поверхности для различных моментов времени после начала лазерного воздействия мощностью P = 3 Вт при толщине слоя воды 0,3 мкм. На рисунке 11б приведена зависимость разности температуры на поверхности полимера, покрытого тонким слоем воды, и температурой его объема на глубине 50 мкм, соответствующей центру полимерной частицы.




а б

Рисунок 11 – Временная зависимость температуры внутри полимерной частицы от расстояния от ее поверхности (а); зависимость разности температуры на поверхности полимера, покрытого тонким слоем воды и температурой его объема на глубине 50 мкм (б).

Для второй (сферически симметричной) модели уравнение, описывающие динамику изменения температуры, имеет вид:

$$\frac{\partial T1}{\partial t} = \frac{\chi}{r} \frac{\partial^2 (rT1)}{\partial r^2} \qquad (4)$$

с граничным условием: $\frac{\partial T1}{\partial r} = \frac{Q(t)}{c\rho\chi}$

Решение этого уравнения может быть представлено в виде:

$$T(t,r) = \frac{Q_0}{2\chi\rho Ca}\left(6\chi t + r^2\right) \qquad (5)$$

При этом разность температуры в центре частицы и на её поверхности будет равна:

$$\Delta T = \frac{Qa}{2\chi\rho C} = \frac{\mu l_a Pah}{2\pi\chi\rho C r_0^{\,2}} \qquad (6)$$

Подставив необходимые значения (a = 50 мкм) получаем $\Delta T \approx 9°C$.

Таким образом, обе модели дали примерно одинаковую разность значений температуры поверхности полимерной частицы и температуры внутри её объема на глубине 50 мкм. Следует отметить, что для селективного лазерного спекания наиболее выгодной является большая разность температур ΔT. Это, с одной стороны, позволяет достигать температуры размягчения (или расплава) поверхности частиц необходимой для их спекания, а с другой - не перегревать при этом основной объём полимера внутри частицы. Наша модель показала, что оптимальный режим ПСЛС может быть реализован при условии достижения заметной ($10^oC$ и более) разницы значений температуры на поверхности частиц, обеспечивающей их эффективное спекание, и температуры их внутреннего объема, не приводящей к термоиндуцированной деструкции полиэфиров.

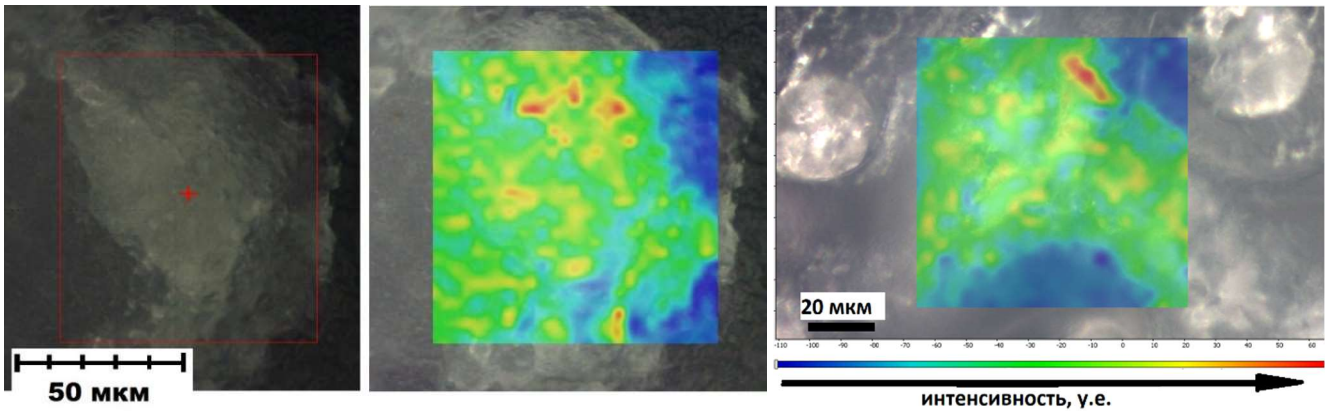
**Глава 4** посвящена разработке методик анализа пространственного распределения биоактивных компонентов в биорезорбируемых матриксах из алифатических полиэфиров и исследования кинетики высвобождения БАВ из таких матриксов в модельные среды с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния (КР).

Для исследования распределения биоактивных компонентов в матриксах и кинетики высвобождения БАВ из этих матриксов в модельные среды необходимо иметь универсальные методики, позволяющие проводить необходимые измерения в режиме реального времени, не оказывая деструктивного воздействия на исследуемые вещества и структуры. В диссертационной работе в качестве наиболее подходящего для этих задач инструмента была выбрана спектроскопия комбинационного рассеяния. Спектроскопия КР обладает рядом существенных достоинств: наборы спектральных полос КР являются специфической характеристикой вещества, по которой оно может быть однозначно идентифицировано; измерение интегральной интенсивности этих полос позволяет проводить количественный анализ; это неразрушающий, бесконтактный и не требующий сложной подготовки проб способ, который можно использовать для исследования практически любого вещества в любом агрегатном состоянии.

В диссертационной работе для исследования распределения биоактивных компонентов в матриксах на основе алифатических полиэфиров в качестве модельных веществ были выбраны два фосфата кальция: карбонизированный гидроксиапатит (КГА) и трикальцийфосфат (ТКФ), синтезированные в лаборатории керамических композиционных материалов Института

металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН [18], [19]. Матриксы изготавливали из полилактида марки PDL04 (Purac, Нидерланды) и мелкодисперсных фосфатов кальция методом пластификации и последующего вспенивания в ск-$CO_2$. Готовые матриксы представляли собой пористые цилиндры диаметром и высотой 5 мм. Эти цилиндры разрезались и помещались в спектрометр для изучения распределения фосфатов кальция по поверхности среза. Использовался дисперсионный спектрометр комбинационного рассеяния Almega XR (Thermo Fisher Scientific, США). Спектрометр имеет два возбуждающих лазера: полупроводниковый лазер с длиной волны излучения 785 нм и максимальной мощностью 30 мВт и лазер на АИГ:Nd с преобразованием во вторую гармонику с длиной волны 532 нм и максимальной мощностью 15 мВт. Спектральные карты КР получены при следующих параметрах: длина волны возбуждающего лазера - 532 нм; спектральный диапазон от 300 до 2000 $см^{-1}$; время регистрации спектров составляло 75 секунд. Для построения спектральных карт использовалась интенсивная характеристическая полоса фосфатов кальция с максимумом в области 960 $см^{-1}$, обусловленная симметричными колебаниями фосфатной группы.

На исследуемом срезе ПЛ матрикса с КГА выбирался определенный участок (рисунок 12а), по данным КР которого и строилась спектральная карта пространственного распределения КГА. На рисунке 12б приведена такая карта размером 78х87 $мкм^2$ с пространственным разрешением 3 мкм. Для матрикса из ПЛ с ТКФ показана аналогичная карта размером 88х88 $мкм^2$ с разрешением 10 мкм (рисунок 12в). Эти карты (в совокупности с картами КР других срезов исследованных образцов) наглядно демонстрируют факт достаточно однородного распределения концентрации фосфатов кальция в объеме ПЛ матриксов. Разработанная нами методика также может успешно применяться и для исследования пространственного распределения других БАВ в полиэфирных матриксах.




а б в

Рисунок 12 - Микрофотография исследуемого участка среза ПЛ матрикса (а) и карта распределения КГА в нем (б). Аналогичная карта распределения ТКФ (в).

В диссертационной работе разработана методика анализа кинетики высвобождения биоактивных компонентов из матриксов на основе алифатических полиэфиров в модельные среды

с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния. В качестве БАВ в экспериментах использовались: гентамицин (антибиотик широкого спектра действия из группы аминогликозидов) и метилурацил (диоксометилтетрагидропиримидин, обладающий регенерирующим, антикатаболическим и анаболическим действием). Матриксы изготавливали из полилактогликолида марки PDLG 7502 (Purac, Нидерланды) с включением в их состав гентамицина или метилурацила методом пластификации и последующего вспенивания исходных смесей в ск-$CO_2$. Готовые матриксы представляли собой пористые цилиндры диаметром и высотой 5 мм.

Концентрация БАВ в модельной среде определялась по интенсивности выбранной характеристической полосы в спектре КР конкретного БАВ. Предварительно регистрировались спектры КР растворов с известными концентрациями метилурацила и гентамицина и строились калибровочные графики с целью определения их концентрации в исследуемом буферном растворе. Пример спектров КР калибровочных растворов гентамицина и их калибровочный график приведены на рисунке 13.

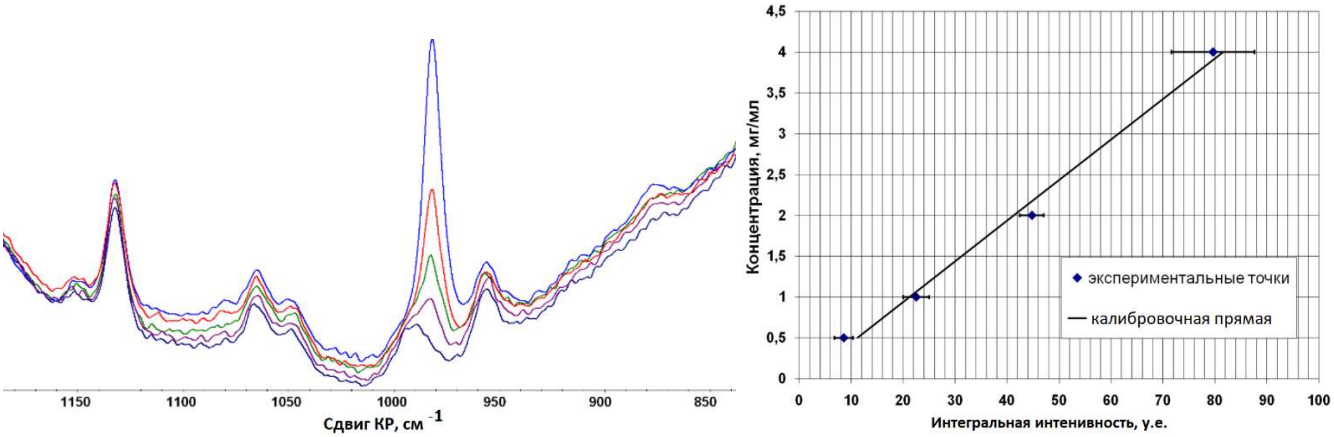



Рисунок 13 – Спектры КР калибровочных растворов гентамицина и калибровочный график для определения его концентрации.

Максимальная концентрация, образующаяся в растворе при условии растворения всего расчетного количества гентамицина или метилурацила принималась за 100%. На рисунке 14 представлена временная зависимость высвобождения гентамицина из матриксов в фосфатно-солевой буфер.

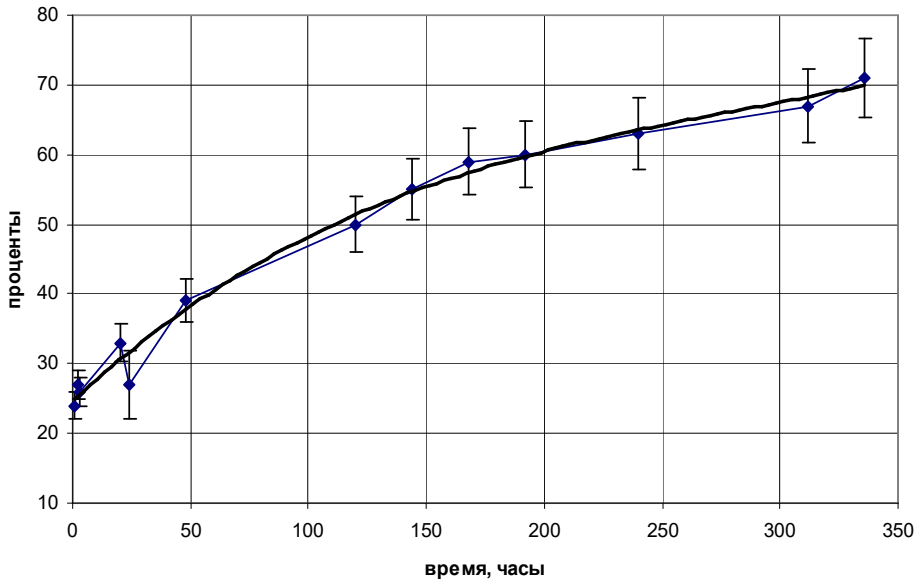



Рисунок 14 - Зависимость концентрации гентамицина высвободившегося из ПЛГ матрикса в буферный раствор от времени.

Из графика (рисунок 14) видно, что за первые 24 часа после иммерсии ПЛГ матриксов с гентамицином в фосфатно-солевой буфер высвобождается приблизительно 30% от его максимальной (расчетной) концентрации, а за первые двое суток около 40% гентамицина. Через 120 часов из матрикса выходит уже около 50% гентамицина, а далее выход становится близким к линейному.

На рисунке 15 представлена временная зависимость высвобождения МУ из ПЛГ матриксов в фосфатно-солевой буферный раствор.

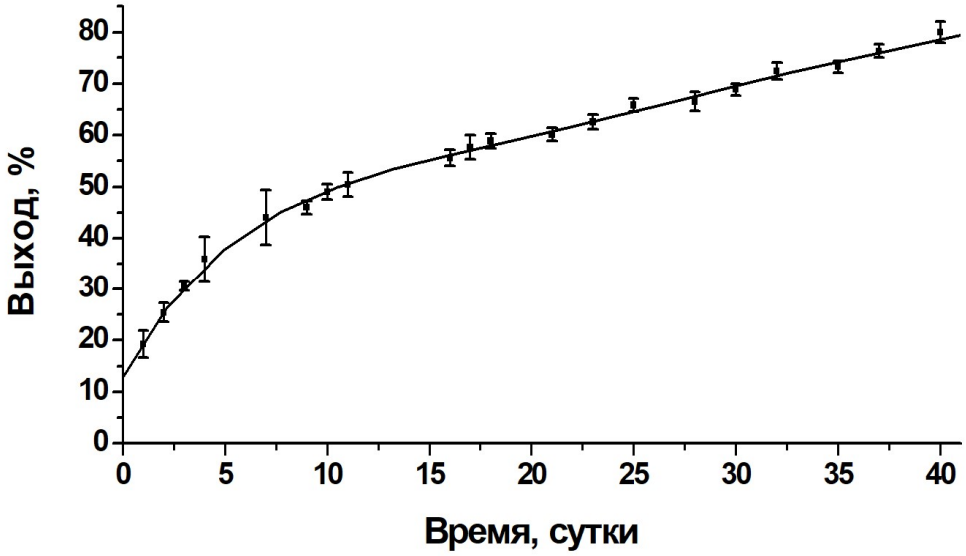



Рисунок 15 – Зависимость концентрации метилурацила высвободившегося из ПГЛ матрикса в буферный раствор от времени.

Из графика (рисунок 15) видно, что за первые сутки пребывания матриксов в буферном растворе из них выходит около 20% метилурацила. В последующие трое суток суточный выход

составлял приблизительно по 5%. Затем скорость высвобождения метилурацила плавно уменьшалась, и после 10 суток выходила на постоянную величину (порядка 1% в сутки). К сороковым суткам (окончание эксперимента) интегральная величина выхода метилурацила из полимерных матриксов составила около 80%.

Таким образом разработанными методиками лазерной диагностики на основе спектроскопии КР успешно проанализировано пространственное распределение микрочастиц фосфатов кальция в полиэфирных матриксах и изучена кинетика высвобождения гентамицина и метилурацила из таких структур в фосфатно-солевой буферный раствор.

В **Главе 5** описаны процесс формирования биоактивных матриксов из алифатических полиэфиров, содержащих костный морфогенетический белок (bone morphogenetic protein 2) (BMP-2) методом ПСЛС с использованием воды в качестве сенсибилизатора лазерного нагрева, а также результаты анализа их цитосовместимости. Наряду с этим приведены результаты сравнительного исследования кинетики высвобождения BMP-2 в физиологический раствор из матриксов, сформированных методом пластификации ПЛГ с его последующим вспениванием в ск-$CO_2$ как с использованием, так и без их последующей обработки методом ПСЛС.

В экспериментах использовался стерильный раствор BMP-2 с концентрацией 10 мкг/мл (Acron Biotech, USA, cat. AK8356) и полилактогликолид марки Purasorb PDLG 7507 (Corbion Purac, Нидерланды). Изготовление матриксов из ПЛГ с BMP-2 проводилось следующим образом. Сначала приготавливалась суспензия водного раствора BMP-2 и микрочастиц ПЛГ (на 1 г полимера 3,57 мкг BMP-2), которая высушивалась в холодильнике при температуре 4°C в течение суток. Полученный материал растирался в ступке и загружался в ячейки пресс-формы, изготовленной из фторопласта, диаметр и высота ячеек составляли 5 мм. Матриксы формировались методом пластификации ПЛГ и его последующего вспенивания в ск-$CO_2$. Извлеченные из пресс-форм ПЛГ матриксы имели форму цилиндров с диаметром и высотой 5 мм. Затем полученные образцы разрезались на диски толщиной 0,3 мм и 1 мм. Диски толщиной 1 мм непосредственно использовались в экспериментах для изучения их цитосовместимости и кинетики высвобождения из них BMP-2 в физиологический раствор.

Часть полиэфирных дисков толщиной 0,3 мм подвергались обработке методом ПСЛС. Предварительное увлажнение длилось 30 секунд, лазерное воздействие проводилось при скорости сканирования лазерного пятна 20 мм/сек и мощности лазерного излучения 3 Вт. Спекание проводилось по траектории в виде ортогональной сетки с плотностью заполнения 1 штрих/мм. Такая плотность штриховки обеспечивала равномерное оплавление поверхности по всей площади образца.

Кинетика высвобождения BMP-2 из матриксов в физиологический раствор исследовалась методом иммуноферментного анализа с использованием стандартного набора реагентов для определения концентрации BMP-2 (ELISA, R&D, США). Оценка цитосовместимости

производилась с помощью МТТ-теста на клеточных культурах ММСК из подкожной жировой клетчатки, которые были получены и охарактеризованы ранее по стандартным протоколам в лаборатории генетики стволовых клеток ФГБНУ «Медико-генетический научный центр».

Результаты МТТ-теста показали, что выживаемость клеток на поверхности всех матриксов из ПЛГ с BMP-2 сравнима с контролем (клетки в отсутствии матрикса) и близка к 100%. В течение 3 суток наблюдения клетки на поверхности матриксов распластывались, приобретая вытянутую или полигональную форму (рисунок 16). Таким образом, все исследованные матриксы на основе ПЛГ с BMP-2, как исходные, так и подвергавшиеся лазерной обработке, продемонстрировали высокий уровень своей цитосовместимости.

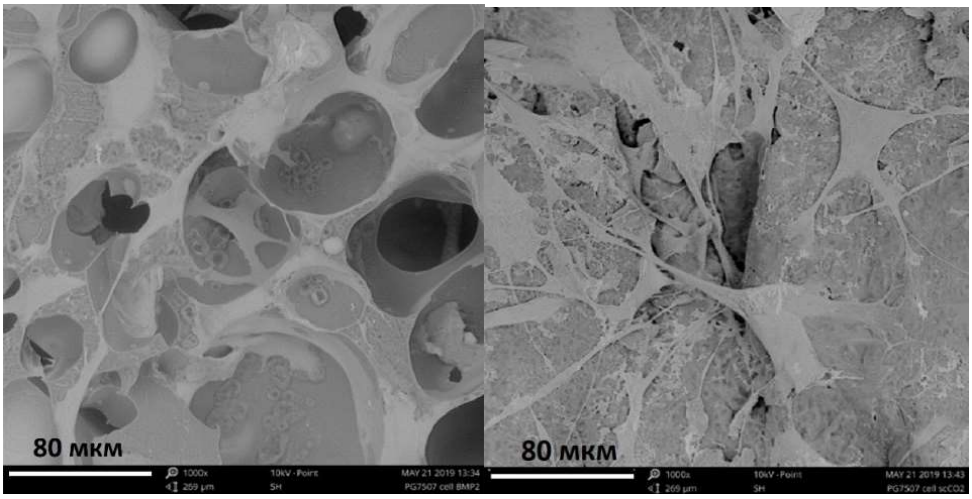
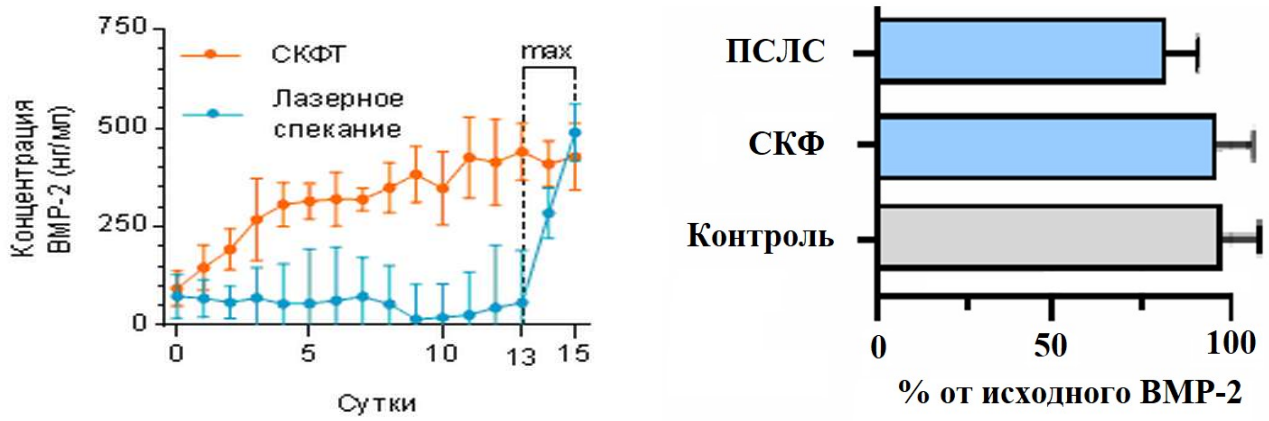



Рисунок 16 - Микрофотографии ММСК на матриксах из ПЛГ с BMP-2.

Результаты экспериментов по высвобождению BMP-2 из матриксов на основе ПЛГ, как подвергавшихся лазерной постобработке, так и без нее приведены на рисунке 17.




а б

Рисунок 17 – Кинетика высвобождения BMP-2 (а). Количество BMP-2 высвободившегося из ПЛГ матриксов (б).

Матриксы, сформированные методом пластификации ПЛГ с его последующим вспениванием в ск-$CO_2$, обеспечивали плавное высвобождение BMP-2 на протяжении 15 суток

(рисунок 17 а). За это время из матриц высвобождалось практически 100 % инкапсулированного белка (рисунок 17 б). Матриксы, подвергавшиеся последующей обработке методом ПСЛС их поверхностей, исходно демонстрировали незначительную концентрацию BMP-2 в растворе в течение 12 суток, а затем происходило резкое высвобождения с 13 по 15 сутки (рисунок 17 а). За время эксперимента из этих образцов выходило до 80% инкапсулированного в них белка (рисунок 17 б). Полученные результаты свидетельствуют о том, что лазерное воздействие в процессе ПСЛС способствует более длительному удержанию BMP-2 в структуре ПЛГ матрикса. Это связано с уменьшением пористости исходной структуры матрикса за счет оплавления ее поверхности, обеспечивая требуемую задержку высвобождения BMP-2 на время развития и завершения фазы постоперационного воспаления (обычно порядка двух недель). Таким образом, пористые ПЛГ матриксы, полученные с помощью комбинации сверхкритических флюидных технологий и ПСЛС, являются перспективными моделями матриц-носителей для доставки различных факторов роста или других лекарственных препаратов в составе костно-пластических материалов.

**Заключение и выводы**

Диссертационная работа направлена на расширение областей применения устройств и приборов квантовой электроники на основе развития новых подходов к лазерному формированию термолабильных полимерных биорезорбируемых трехмерных матриксов, содержащих биоактивные компоненты с помощью метода поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС). В ней разработаны новые методики структурной характеризации этих матриксов с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния. Проведены *in vitro* и *in vivo* исследование физико-химических и биохимических свойств таких матриксов. Все поставленные в диссертационной работе задачи успешно решены в полном объеме.

Результаты экспериментального исследования влияния дозы лазерного воздействия в процессе формирования матриксов методом ПСЛС на кинетику высвобождения БАВ из этих полимерных матриксов позволяют сделать **вывод**, что, варьируя параметры процесса ПСЛС (интенсивность и скорость сканирования лазерного излучения) можно управлять кинетикой высвобождения биоактивных веществ из биорезорбируемых полиэфирных структур.

На основе анализа результатов проведенного исследования влияния дозы лазерного воздействия в процессе ПСЛС формирования матриксов на активность находящихся них БАВ на примере трипсина можно сделать **вывод**, что метод поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС) позволяет проводить эффективное формирование полимерных матриксов для тканевой инженерии, содержащих биоактивные вещества, сохраняющие при этом значительную (до 90% от исходной) степень своей биоактивности.

Из результатов проведенного исследования цитотоксичности и адгезионных свойств сформированных методом ПСЛС полимерных матриксов с использованием клеточных культур *in vitro* и исследования биосовместимости этих матриксов с использованием лабораторных животных *in vivo,* следует **вывод**, что сформированные методом ПСЛС полилактидные матриксы не обладают токсическим действием в отношении ММСК, также *in vivo* вокруг и внутри трансплантированной ТИК на основе этих матриксов образовалась грануляционная ткань с большим количеством кровеносных сосудов и активно пролиферирующими незрелыми клеточными элементами.

По результатам исследования возможности использования воды и наночастиц золота в качестве сенсибилизаторов нагрева поверхности микрочастиц алифатических полиэфиров для их ПСЛС сделаны следующие **выводы**: 1) золотые нанооболочки и вода могут быть хорошей альтернативой наночастицам углерода в качестве сенсибилизаторов лазерного нагрева поверхности микрочастиц алифатических полиэфиров для их поверхностно-селективного лазерного спекания; 2) вода, нанесенная на поверхность алифатических полиэфиров, может являться эффективным и биологически безопасным сенсибилизатором локального нагрева в процессе ПСЛС при использовании лазерного излучения ИК диапазона (1,94 мкм).

Разработанные методики лазерной диагностики с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния позволили успешно проанализировать пространственное распределения фосфатов кальция в полимерных матриксах, а также изучить кинетику высвобождения гентамицина и метилурацила из полимерных матриксов в физиологический раствор. Таким образом, методики с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния позволяют проводить исследование распределения концентраций БАВ в полимерных матриксах, сформированных методом ПСЛС, а также проводить анализ кинетики высвобождения БАВ из таких матриксов в модельные среды.

Впервые сформированы полилактогликолидные матриксы, содержащие костный морфогенетический белок-2 (BMP-2), методом пластификации с последующим вспениванием в среде сверхкритического диоксида углерода и последующей лазерной обработкой в режиме ПСЛС, которые могут быть использованы для тканеинженерных конструкций. Полученные матриксы имеют высокий уровень цитосовместимости и управляемую кинетику высвобождения (BMP-2), определяемую выбранным режимом лазерного воздействия.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации**


1. Антонов Е.Н., Баграташвили В.Н., Бородина Т.Н., Бочкова С.А., Марквичева Е.А., Попов В.К., Попова А.В., Румш Л.Д., Фельдман Б.М. Влияние селективного лазерного спекания на активность трипсина, инкапсулированного в полилактид // Альманах Клинической Медицины. - 2008. - Vol. 17 - № 2. - С. 30–32.
2. Бочкова С.А., Антонов Е.Н., Марквичева Е.А., Попов В.К., Попова А.В., Румш Л.Д., Фельдман Б.М. Влияние условий формирования композитов на базе биорезорбируемых полимеров на динамику выхода биологически активных веществ // Вестник новых медицинских технологий. - 2009. - Vol. 16 - № 1. - С. 278–279.
3. Марквичева Е.А., Бородина Т.Н., Антонов Е.Н., Бочкова С.А., Попов В.К., Фельдман Б.М., Ворожцов Г.Н., Румш Л.Д. Включение биоактивных молекул в биодеградируемые микрочастицы с использованием метода сверхкритического диоксида углерода // Вестник новых медицинских технологий. - 2009. - Vol. 16 - № 1. - С. 278–279.
4. Бухарова Т.Б., Антонов Е.Н., Попов В.К., Фатхудинов Т.Х., Попова А.В., Волков А.В., Бочкова С.А., Баграташвили В.Н., Гольдштейн Д.В. Биосовместимость тканеинженерных конструкций на основе пористых полилактидных носителей, полученных методом селективного лазерного спекания, и мультипотентных стромальных клеток костного мозга // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2010. - № 1. - С. 40–46.
5. Антонов Е.Н., Бочкова С.А., Попова А.В. Формирование биоактивного материала для селективного лазерного спекания из смеси порошков наногидроксиапатита и полилактида в сверхкритическом диоксиде углерода // Сверхкритические флюиды теория и практика. - 2011. - Vol. 6 - № 4. - С. 13–20.
6. Антонов Е.Н., Вахрушев И.В., Минаева С.А., Попов В.К. Исследование кинетики высвобождения гентамицина из биорезорбируемых полимерных матриц методом спектроскопии комбинационного рассеяния // Перспективные материалы. - 2012. - Vol. 6. - С. 44–48.
7. Богородский С.Э., Кротова Л.И., Курсаков С.В., Минаева С.А., Попов В.К., Севастьянов В.И. Сверхкритическая флюидная инкапсуляция ацизола в микрочастицы алифатических полиэфиров // Сверхкритические флюиды теория и практика. - 2014. - Vol. 9 - № 2. - Р. 64–73.
8. Волков А.В., Антонов Е.Н., Васильев А.В., Бухарова Т.Б., Эщмотова Г.К., Попов В.К., Вихрова Е.Б., Минаева С.А., Капанадзе Г.Д., Фатхудинова Н.Л., Ревякин А.О., Гольдштейн Д.В. Влияние противовоспалительных препаратов на мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // Биомедицина. - 2014. - Vol. 4. - С. 17–24.
9. Антонов Е.Н., Бутнару Д.В., Винаров А.З., Истранова Е.В., Минаева С.А., Попов В.К. Кинетика высвобождения метилурацила из биорезорбируемых полимерных носителей // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2015. - Vol. 78 - № 3. - С. 36–39.
10. Antonov E.N., Krotova L.I., Minaev N. V, Minaeva S.A., Mironov A. V, Popov V.K., Bagratashvili V.N. Surface-selective laser sintering of thermolabile polymer particles using water as heating sensitizer // Quantum Electron. - 2015. - Vol. 45 - № 11. - С. 1023–1028.
11. Васильев А.В., Бухарова Т.Б., Кузнецова В.С., Загоскин Ю.Д., Минаева С.А., Григорьев Т.Е., Антонов Е.Н., Осидак Е.О., Галицына Е.В., Бабиченко И.И., Домогатский С.П., Попов В.К., Чвалун С.Н., Гольдштейн Д.В., Кулаков А.А. Сравнение кинетики высвобождения импрегнированного морфогенетического белка-2 из биополимерных матриксов // Перспективные материалы. - 2019. - № 4. - С. 13–27.
12. Antonov E.N., Dunaev A.G., Konovalov A.N., Minaeva S.A., Popov V.K. Temperature field distribution in polymer particles during surface-selective laser sintering // Laser Phys. IOP Publishing, - 2020. - Vol. 30 - № 5. - С. 55601.
13. Минаев Н.В., Антонов Е.Н., Минаева С.А., Чурбанов, С.Н. Установка для исследования процессов поверхностно-селективного лазерного спекания порошковых биосовместимых материалов //Приборы и техника эксперимента. – 2019. – №. 1. – С. 150-152.
14. Minaev N.V., Demina T.S., Minaeva S.A., Dulyasova A.A., Minaeva E.D., Gonchukov S.A., Akopova T.A., Timashev P.S. The evolution of surface-selective laser sintering: modifying and

forming 3D structures for tissue engineering // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. - 2020. - Vol. 84 - № 11. - P. 1315–1320.

**Публикации в материалах конференций**

1. Бочкова С.А., Антонов Е.Н., Баграташвили В.Н., Ворожцов Г.Н., Лихарева В.В., Марквичева Е.А., Попов В.К., Попова А.В., Румш Л.Д. Выход биологически активных веществ, включенных в полимерные матрицы, сформированные методом селективного лазерного спекания // Труды VII Межвузовской научной школы молодых специалистов “Концентрированные потоки энергии в космической технике, электронике, экологии и медицине.” - 2007. - С. 185–188.
2. Баграташвили В.Н., Антонов Е.Н., Бочкова С.А., Кротова Л.И., Попов В.К. Синтез биорезорбируемых пористых полимерных материалов для замены и регенерации твердых тканей // Труды Всероссийской конференции “Фундаментальные науки - медицине.” - 2007. - С. 98–99.
3. Антонов Е.Н., Баграташвили В.Н., Бочкова С.А., Марквичева Е.А., Попов В.К., Попова А.В., Ворожцов Г.Н., Фельдман Б.М., Румш Л.Д. Использование сверхкритической двуокиси углерода для включения биологически активных веществ в полимерные матрицы // Труды XY Международной конференции “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии.” - 2007. - С. 310–312.
4. Антонов Е.Н., Баграташвили В.Н., Бочкова С.А., Богородский С.Э., Бородина Т.Н., Марквичева Е.А., Попов В.К., Попова А.В., Румш Л.Д. Новые подходы к инкапсуляции биоактивных компонент в полимерные матрицы // Труды III Международной конференции по коллоидной химии и физико-химической механике. Москва, - 2008. - С. 53.
5. Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Bochkova S.A., Borodina T., Markvicheva E.A., Popov V.K., Popova A. V., Rumsh L.D. Activity of trypsin encapsulated into polylactic acid by supercritical carbon dioxide: effect of selective laser sintering // Proceedings of 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology in Barcelona. - 2008.
6. Popova A.V., Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Bochkova S.A., Bogorodskiy S.E., Markvicheva E.A., Popov V.K., Rumsh L.D. Fabrication of polymer scaffolds incapsulated with bioactive species by surface selective laser sintering and supercritical carbon dioxide techniques. // Proceedings of 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology in Barcelona. - 2008.
7. Бочкова С.А., Антонов Е.Н., Баграташвили В.Н., Бородина Т.Н., Марквичева Е.А., Попов В.К., Попова А.В., Румш Л.Д., Фельдман Б.М. Влияние селективного лазерного спекания на биологически активные вещества, включенные в биорезорбируемые полимеры // Труды XYI Международной конференции “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии” - 2008 - С. 57-58.
8. Popov V.K., Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Bochkova S.A., Bukharova T.B., Fatkhudinov T.K., Markvicheva E.A., Popova A.V., Rumsh L.D., Volkov A.V. Surface selective laser processing: a new methodology to work with thermoliable polymer particles // Regen. Med. - 2009. - Vol. 4 - № 6S. - P. S253–S254.
9. Бочкова С.А., Антонов Е.Н., Попов В.К., Попова А.В. Исследование динамики выхода биоактивных веществ, включенный в биорезорбируемые полимеры с использованием сверхкритического $CO_2$ // Тезисы докладов V Международная научно-практическая конференция «Сверхкритические флюиды: фундаментальные основы, технологии, инновации» - 2009 г. - С. 64.
10. Бочкова С.А., Антонов Е.Н., Попов В.К. Формирование биоактивного композита из смеси наногидроксиапатита и полилактида в сверхкритической двуокиси углерода // Тезисы докладов VI Научно-практическая конференция «Сверхкритические флюиды (СКФ): фундаментальные основы, технологии, инновации». - 2011. - С. 150–151.
11. Minaeva S.A., Antonov E.N., Vasilyev A.V., Bukharova T.B., Popov V.K. BMP-2 release from PLGA scaffolds fabricated by supercritical carbon dioxide and surface-selective laser sintering // TERMIS EU 2019 conference book. eCM Meeting Abstracts Collection 3. – 2019 – P. 1134

12. Минаева С.А., Антонов Е.Н., Бухарова Т.Б., Васильев А.В., Галицына Е.В., Попов В.К. Биосовместимый полимерный материал с BMP-2 для регенерации костной ткани // Сборник материалов IX школы-семинара молодых ученых России "Проблемы устойчивого развития региона" - 2019 - С. 243-244.
13. Minaeva S.A., Antonov E.N., Vasilyev A.V., Bukharova T.B., Galitsina E.V., Popov V.K. Bioresorbable polymer matrices impregnated with BMP-2 // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science – 2019 – V. 320 - N 1 P. 012053

**Список цитируемой литературы**


1. Антонов Е.Н., Багараташвили В.Н., Коновалов А.Н., Попов В.К., Уитакер М., Хоудл С.М. Изменение активности рибонуклеазы, импрегнированной в полилактид, под воздействием процесса селективного лазерного спекания // Успехи Современного Естествознания. - 2004. - Vol. 1 - № 6. - P. 97–99.
2. Popov V.K., Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Kononov N.N., Howdle S.M. Selective Laser Sintering of 3-D Biodegradable Scaffolds for Tissue Engineering // Proc. MRS Fall Meeting 2003, Boston, USA, December, EXS-1. - 2004. - P. F5.4.1-3.
3. Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Whitaker M.J., Barry J.J.A., Shakesheff K.M., Konovalov A.N., Popov V.K., Howdle S.M. Three-dimentional bioactive and biodegradable scaffolds fabricated by selective laser sintering // Adv. Mater. - 2005. - Vol. 17 - № 3. - P. 327–330.
4. Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Howdle S.M., Konovalov A.N., Popov V.K., Panchenko V.Y. Fabrication of polymer scaffolds for tissue engineering using surface selective laser sintering // Laser Phys. - 2006. - Vol. 16 - № 5. - P. 774–787.
5. Антонов Е.Н., Евсеев А.В., Попов В.К. Установка по селективному лазерному спеканию, Патент РФ на полезную модель (№ 2010122007) RUS 100948 28.05.2010. - 2010.
6. Багараташвили, В. Н. Антонов, Е. Н. Попов, В. К. Юсупов В.И. Установка для формирования биосовместимых структур Патент РФ на полезную модель (№ 2013157052) RUS 150514. - 2013.
7. Bedi G.S. The Effects of Autonomic Drugs on the Concentration of Kallikrein-like Proteases and Cysteine-proteinase Inhibitor (Cystatin) in Rat Whole Saliva // J. Dent. Res. - 1991. - Vol. 70 - № 5. - P. 924–930.
8. Antonov E.N., V. N. Bagratashvili, M. J. Whitaker, J. J. A. Barry, K. M. Shakesheff, A. N. Konovalov, V. K. Popov, S. M. Howdle. Three-Dimensional Bioactive and Biodegradable Scaffolds Fabricated by Surface-Selective Laser Sintering // Adv. Mater. - 2005. - Vol. 17 - № 3. - P. 327–330.
9. Colter D.C., Sekiya I., Prockop D.J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells // Proc. Natl. Acad. Sci. - 2001. - Vol. 98 - № 14. - P. 7841–7845.
10. Reznickova A., Novotna Z., Kvitek O., Kolska Z., Svorcik V. Gold, silver and carbon nanoparticles grafted on activated polymers for biomedical applications // J. Nanosci. Nanotechnol. - 2015. - Vol. 15 - № 12. - P. 10053–10073.
11. Amendola V., Pilot R., Frasconi M., Maragò O.M., Iatì M.A. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review // J. Phys. Condens. Matter. - 2017. - Vol. 29 - № 20.
12. Elahi N., Kamali M., Baghersad M.H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review // Talanta. Elsevier B.V., - 2018. - Vol. 184. - P. 537–556.
13. Хлебцов Н.Г. Оптика и биофотоника наночастиц с плазмонным резонансом // Квантовая электроника. - 2008. - Vol. 38 - № 6. - P. 504–529.
14. Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Panfilova E. V., Pylaev T.E., Bibikova O.A., Staroverov S.A., Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Khlebtsov N.G. New types of nanomaterials: Powders of gold nanospheres, nanorods, nanostars, and gold-silver nanocages // Nanotechnologies Russ. Springer, - 2013. - Vol. 8 - № 3–4. - P. 209–219.

15. Гапонцев В.П., Минаев В.П., Савин В.И., Самарцев И.Э. Медицинские аппараты на основе мощных полупроводниковых и волоконных лазеров // Квантовая электроника. - 2002. - Vol. 32 - № 11. - P. 1003–1006.
16. Irvine W.M., Pollack J.B. Infrared optical properties of water and ice spheres // Icarus. Academic Press, - 1968. - Vol. 8 - № 1–3. - P. 324–360.
17. Минаев Н.В., Антонов Е.Н., Минаева С.А., Чурбанов С.Н. Установка Для Исследования Процессов Поверхностно-Селективного Лазерного Спекания Порошковых Биосовместимых Материалов // Приборы И Техника Эксперимента. - 2019. - № 1. - P. 150–152.
18. Гольдберг М.А., Фомин А.С., Петракова Н.В., Федотов А.Ю., Шворнева Л.И., Смирнов В.В., Попова А.В., Баринов С.М. ТРАНСФОРМАЦИЯ ГИПСА В ФОСФАТЫ КАЛЬЦИЯ // Доклады Академии наук. Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", - 2012. - Vol. 444 - № 3. - P. 275.
19. Баринов С.М., Смирнов В.В., Гольдберг М.А., Чиссов В.И., Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А. Композиционный материал на основе гидроксиапатита и карбоната кальция для заполнения костных дефектов при реконструктивно-пластических операциях. - 2011.