СОЗДАНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ НОВЫХ МАТРИКСОВ ИЗ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ

Василец В.Н.^{1, 2}, Заитов Л.М.³, Милентьев А.Ю.⁴, Недосеев С.Л.³, Шварцкопф П.В.⁵, Егорова В.А.⁶, Севастьянов В.И.⁶

¹Институт медико-биологических исследований и технологий, Москва

² Филиал Института энергетических проблем химической физики РАН, Черноголовка

³ РНЦ «Курчатовский институт», Москва

⁴ Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва

⁵ Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

⁶ ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов

им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, Москва

Разработана новая гель-сублимационная методика изготовления пористых биорезорбируемых матриксов из полиоксибутирата/полиоксивалерата. Полученные матриксы имеют полимодальную внутреннюю структуру с размерами пор от ~100 мкм до ~100 нм и пористость в диапазоне 80–90%. Исследовано несколько вариантов обработки внутренней структуры объемных матриксов в электроразрядной плазме: диэлектрический барьерный разряд, несамостоятельный объемный разряд, поддерживаемый электронным пучком; наносекундный диэлектрический барьерный разряд. Биологические испытания матриксов на гемолиз и цитотоксичность показали перспективность применения полученных матриксов для клеточных технологий.

Ключевые слова: клеточные технологии, биорезорбируемые матриксы, полиоксибутират/ полиоксивалерат, гель-сублимационная методика, плазма электрических разрядов, гемолиз, цитотоксичность

DEVELOPMENT AND BIOLOGICAL TESTING OF NEW SCAFFOLDS FROM BIODEGRADABLE MATERIALS

Vasilets V.N.^{1, 2}, Zaitov L.M.³, Milentev A.Y.⁴, Nedoseev S.L.³, Shvartskopf P.V.⁵, Egorova V.A.⁶, Sevastjanov V.I.⁶

¹ Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow

² Institute for Energy Problems of Chemical Physics (Branch), Chernogolovka

³ Russian Research Center «Kurchatov Institute», Moscow

⁴ Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow

⁵ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudniy

⁶ Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

The new gel-sublimation technique for preparation porus biodegradable scaffolds (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) is presented. The scaffolds with multi-mode internal structure have the of porus sizes varied from ~100 microns up to ~100 nanometers and the porosity in a range of 80–90%. A few techniques for modification of 3D scaffolds by gas discharge plasma are developed and optimized: the microsecond dielectric barrier discharge, the semi-self-maintained discharge supported by an electron beam; the nanosecond dielectric barrier discharge. Biological tests including red blood cell hemolysis and cytotoxicity analysis have shown the possibilities of scaffolds applications for cell-based technologies.

Key words: cell technologies, biodegradable scaffolds, poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate), gelsublimation technique, gas discharge plasma, hemolysis, cytotoxicity

Статья поступила в редакцию 03.12.09 г.

Контакты: Василец Виктор Николаевич. Тел. 8-916-873-33-29, e-mail: vnvasilets@yandex.ru

введение

Последние достижения в области молекулярной и клеточной биологии открывают широкие перспективы для создания принципиально новых и эффективных биомедицинских технологий, с помощью которых становится возможным решение многих проблем восстановления поврежденных тканей и органов, лечение ряда тяжелых заболеваний человека. Успешное их внедрение в практику экспериментальной биологии позволило разработать новые методы клеточной и тканевой трансплантации, которые развиваются по трем основным направлениям: клеточная терапия, биоискусственные органы метаболического ряда, биоискусственные органы структурного ряда. На этих направлениях в настоящее время получила широкое развитие стратегия создания гибридных искусственных тканей и органов путем биологического имитирования существующих естественных прототипов с участием клеточных технологий. Одним из необходимых компонентов для реализации этой стратегии являются носители клеток – матриксы, имитирующие естественные внеклеточные матриксы организма.

Главными требованиями к матриксам-носителям являются высокая биосовместимость и способность стимулировать собственные регенерационные процессы поврежденного органа. Конструирование матриксов-носителей на основе объемных пористых материалов из биодеградируемых полимеров, характеризующихся высокой биологической безопасностью, а также возможностью регулировать время биорезорбции имплантата, является одним из новейших направлений в биотехнологии. Разработка полимерных носителей для внедряемых лекарственных препаратов и клеточных культур в виде трехмерных тонко-структурированных полимерных матриксов (губки, пространственные сетки) составляет ключевую проблему для имплантационных хирургических материалов. К числу недавно разработанных полимерных носителей из биорезорбируемого материала можно отнести, например, «ЭластоПОБ», разработанный в АНО «ИМБИИТ» [1-5].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Целью настоящего исследования была разработка гель-сублимационной методики изготовления биорезорбируемых матриксов из сополимера полиоксибутирата с полиоксивалератом, обладающих односвязной полимодальной внутренней структурой с регулируемым размером пор в диапазоне от ~100 мкм до ~100 нм, и пористостью более 90%, а также разработка и оптимизация методов плазмохимического и радиационно-химического воздействия для повышения поверхностной и объемной биосовместимости полученных материалов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Диагностические методы

Для анализа пространственной структуры и поверхностной энергии матриксов были применены методы сканирующей электронной микроскопии, видимой микроскопии и измерения смачиваемости. Для измерения параметров плазмообразующих разрядов использован широкий набор методов плазменной и радиационной диагностики. По результатам измерений вносились оперативные изменения в режимы приготовления и обработки матриксов. Для исследования биологических свойств матриксов были использованы стандартные методы анализа гемолитического действия матриксов при контакте с кровью и токсикологического действия матриксов на клетки мышиных фибробластов линии 3T3.

Методики изготовления матриксов

Известны различные подходы к созданию гетерогенных сред с высокой степенью пористости (80– 90%) из биосовместимых полимеров, в том числе: лиофилизация, высаливание, газовое вспенивание, электроспиннинг [6]. В некоторых экспериментах мы использовали матриксы, полученные методом электроспиннинга [7]. Детальное описание установки для электроспиннинга и параметры процесса формирования матрикса из ПОБ/ПОВ приведены в работе [8].

С целью управления размерами волокон и ячеек, образующих внутреннюю структуру матрикса, их количеством и распределением по объему матрикса нами разработан способ приготовления матриксов, который является развитием метода лиофилизации. Материалом для биоматрикса был выбран сополимер полиоксибутирата с полиоксивалератом, (ПОБ/ПОВ) - не растворимый в воде биорезорбируемый полимер бактериального происхождения. Данный сополимер растворяется с образованием гелей в жидкостях, имеющих низкую температуру замерзания, например, в дихлорэтане (-36,6 °С), хлороформе (-63,5 °C) и т. д. Для лиофильной сублимационной сушки замороженных гелей в твердом состоянии требуются специальные холодильные установки с отрицательной температурой ниже -40 °C, что усложняет и удорожает технологию.

Новая гель-сублимационная методика изготовления пористых полимерных матриксов позволяет управлять полимодальной структурой односвязных пор за счет использования двухкомпонентного растворителя, программируемых режимов замораживания образца, его откачки и регулируемой температуры проведения вакуумной сублимационной сушки.

Применяемая методика отличается от стандартной методики лиофилизации прежде всего тем, что после приготовления геля на основе ПОБ/ПОВ и дихлорэтана в него вводится дополнительная жидкость с высокой температурой затвердевания, например, ледяная уксусная кислота ($t_{nn} = +16,6 \,^{\circ}\text{C}$). Приготовленный таким образом трехкомпонентный раствор заливали в форму из алюминиевой фольги с прокладкой из фторопластовой пленки, и полученную заготовку охлаждали до температуры, при которой вязкость рабочего раствора позволяла снять с заготовки пленку и фольгу и открыть ее поверхность для вакуумной сушки. Рабочий раствор «ПОБ/ПОВ + дихлорэтан + уксусная кислота» не имеет определенной температуры замерзания, поэтому охлаждение вели до температуры в диапазоне -20 ÷ -30 °С в зависимости от соотношения концентраций полимера, дихлорэтана и ледяной уксусной кислоты.

Затем образец помещали в вакуумную камеру на сетку из тонких полимерных нитей. Откачку производили при комнатной температуре стенок вакуумной камеры. Сохранение формы затвердевшего рабочего раствора обеспечивалось его самоохлаждением в процессе вакуумной сублимации.

Процесс вакуумирования камеры вели по программе, определяющей соотношение количества крупноразмерных и микроразмерных пор в заготовке матрикса. Сначала регулированием скорости откачки и напуском внешнего воздуха устанавливали давление ~100 Торр и визуально контролировали процесс испарения дихлорэтана из заготовки. По прекращении испарения дихлорэтана давление в вакуумной камере снижали до ~ 0,01 Торр.

Необходимость управления вакуумированием обусловлена следующими обстоятельствами. Прочность охлажденного рабочего раствора определяется остовом из кристаллов ледяной уксусной кислоты, между которыми расположен гель «ПОБ/ ПОВ + дихлорэтан». Кристаллы ледяной уксусной кислоты и мицеллы геля взаимодействуют друг с другом, задавая грубую и тонкую структуру пор будущего матрикса. При вакуумировании, прежде всего, испаряется жидкая фаза, основу которой составляет дихлорэтан. При этом внутри каркаса из твердой уксусной кислоты могут образовываться относительно крупные капли геля, влияющие, при их испарении в вакуум, на образование крупных пор в будущем матриксе. В этот период сублимационной сушки давление в камере составляет от ~100 до ~10 Торр.

После испарения легколетучей фазы затвердевшего рабочего раствора начинает испаряться жесткий остов твердой ледяной уксусной кислоты, с которым теперь связаны мицеллы – нити ПОБ/ПОВ. Интенсивность испарения при этом поддерживалась на таком уровне, чтобы жесткость заготовки сохранялась. На этой фазе вакуум в камере постепенно достигал предельного значения ~0,01 Торр. Длительность этой фазы 2–4 часа. В ходе второй фазы сублимационной сушки происходила некоторая усадка заготовки. Примерный ход температуры образца от времени для одного из вариантов гельсублимационной сушки показан на рис. 1.



Рис. 1. График зависимости температуры от времени при вакуумной сублимационной сушке образца (гельсублимационный метод с самоохлаждением)

Дальнейшая работа над полученным пористым полупродуктом сводилась к его механической обработке: резке на куски заданного размера и формы, обработке поверхностей для получения необходимой поверхностной структуры матрикса. Фотография одного из вариантов матрикса, полученного по этой методике, и микрофотографии его тонкой внутренней структуры, полученные на сканирующем электронном микроскопе, показаны на рис. 2 и 3.

ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ПОРИСТЫХ МАТРИКСОВ

Исследуемый полимер является гидрофобным, то есть обладает низкой поверхностной энергией. Гидрофобность является нежелательным фактором, снижающим жизнеспособность клеток, инфильтрованных в матрикс. Для преодоления этой проблемы поверхность полимера обрабатывают в плазме кислородсодержащих газов. Образование полярных кислородсодержащих групп приводит к увеличению полярной составляющей свободной энергии и, следовательно, к повышению гидрофильности поверхности матрикса.

Для обработки однородных поверхностей полимерных пленок используются разряды, создающие пространственно распределенную плазму с высокоэнергичными электронами и температурами ион-



Рис. 2. Микроструктура ПОБ/ПОВ матрикса, полученного по гель-сублимационной методике (сканирующий электронный микроскоп)



Рис. 3. Образец ПОБ/ПОВ матрикса, полученного по гель-сублимационной методике

ной и нейтральной компонент, близкими к комнатной. В таких процессах необходимо предотвратить процесс контракции плазмы, то есть уменьшение ее радиуса до миллиметровых и субмиллиметровых размеров, характерных для искровых разрядов. В искровых разрядах концентрация энергии недопустимо велика, что может привести к нарушению однородности пленки или тонкой структуры пористого матрикса в процессе обработки.

К пространственно распределенным разрядам относится, например, диэлектрический барьерный разряд атмосферного давления (ДБР). Обрабатываемая полимерная пленка вводится в межэлектродный зазор разряда. В плазме ДБР присутствуют разнообразные активные частицы, которые могут реагировать с поверхностью полимера. Глубины проникновения всех активных частиц в материал не превышают нескольких микрометров. Толщина модифицируемого слоя может изменяться от нескольких микрон до сотых долей микрона. Применение в качестве плазмообразующих газов воздуха O₂, N₂, CO₂, NH₂ приводит к улучшению гидрофильности [9, 10]. Применение фтор-, водород- и кремнийсодержащих газов и паров (SF₆, C₂F₄, CH₄, силоксаны) приводит к плазмохимической полимеризации и образованию на поверхности новых полимерных структур. Поверхность приобретает либо гидрофобные свойства (в случае обработки во фторсодержащих газах) [11, 12], либо гидрофильные свойства (в случае обработки в полимеризующихся кислородсодержащих газах) [13]. В данной работе ДБР в воздухе [14] применяли для обработки матриксов, полученных различными методами. Разряд зажигали от высоковольтного источника переменного напряжения. Высоковольтный электрод был покрыт слоем диэлектрика (кварц), в то время как другой, заземленный электрод, представлял собой медную пластинку. Высоковольтный источник обеспечивал импульсное напряжение с частотой следования импульсов 1 кГц, амплитудой 15 кВ и длительностью импульса 5 мкс. Зазор между электродами составлял 2 мм. В этот зазор и помещали обрабатываемый образец матрикса толщиной 0,3-1 мм. Обработку производили в воздухе при атмосферном давлении в диапазоне времени от 10 с до 10 мин.

В случае пористого объемного матрикса плазменная обработка поверхности волокон, образующих его внутреннюю структуру, как правило, затруднена. Причина состоит в том, что характеристическая длина каналов в матриксе составляет несколько миллиметров, а поперечные размеры канала – несколько микрон. Газоразрядная плазма, эффективная при обработке открытых поверхностей полимеров, не проникает в такие каналы. Однако в газоразрядном промежутке ДБР генерируется высокая концентрация химически активных молекул озона [14], которые при этом оказываются достаточно долгоживущими частицами, для того чтобы проникать в поры обрабатываемого материала и вызывать гидрофилизацию внутренней поверхности матрикса. Измерения гидрофильности матрикса до

и после обработки в плазме ДБР методом погружения показали правильность данного подхода.

При другом подходе химически активная плазма создается в разрядах, проникающих внутрь объема пористого матрикса. В данной работе применяли два таких разряда. В первом разряде полимерный пористый матрикс помещали между электродами, которые создавали в нем электрическое поле с напряженностью ниже пробойной, а для инициирования несамостоятельного объемного разряда в пористом матриксе использовали пучок электронов высокой энергии (1–5 МэВ), пронизывающий материал матрикса по всей толщине [15].

Электроны в пористом, гетерогенном веществе матрикса производят следующие действия.

- В объеме газовой фазы, заполняющей пространство между волокнами и обладающей сравнительно малой плотностью, электронный пучок тормозится сравнительно слабо, но при этом он производит объемную первичную ионизацию газа, заполняющего ячейки. Если при этом на матрикс наложено электрическое поле достаточной напряженности, то во внутренней структуре матрикса возникает объемный, пространственно однородный несамостоятельный электрический разряд. Разряд существует, пока пространственную трехмерную сетку матрикса пронизывает электронный пучок. При этом разряд пространственно однороден, не образует узких токовых каналов. Образующаяся газоразрядная плазма действует на поверхность твердотельной сетки внутри матрикса, осуществляя ее модифицирование в заданном направлении, например, увеличивая гидрофильность или повышая биосовместимость матрикса с соответствующими биологическими объектами. Электроны газоразрядной плазмы не проникают вглубь полимера и не изменяют его объемных характеристик. Но они изменяют молекулярную структуру поверхности волокон, образующих матрикс.
- В объеме полимерных волокон, твердой фазы, плотность которой на три порядка больше плотности газовой фазы, электроны пучка тормозятся существенно сильнее, производя в веществе полимера различные радиационно-химические процессы, которые могут привести к изменению молекулярного состава и структуры полимера. Полная поглощенная полимером радиационная доза от электронного пучка не должна достигать предела, при котором в веществе полимера, образующего матрикс, наступают необратимые изменения физико-химических и биохимических характеристик. Это ограничивает допустимую дозу значением ~10–20 кГр. Названное значение дозы известно из опыта радиационной стерили-

зации биомедицинскх препаратов и материалов, в том числе, и для ПОБ/ПОВ.

Проведенное нами исследование смачиваемости в воде исходных и обработанных в плазменнопучковом разряде матриксов ПОБ/ПОВ, полученных гель-сублимационным методом, показало, что такая обработка обеспечивает полную объемную смачиваемость первоначально гидрофобных матриксов. В этих экспериментах энергия электронов пучка была 3,5 МэВ, импульсный ток пучка был около 30 мА, дежурное напряжение между электродами 8 кВ, импульсный ток несамостоятельного разряда в воздухе ~1,3 А, длительность импульса 3 мкс.

В другом методе в зазоре между электродами зажигается импульсный диэлектрический барьерный разряд (ИДБР) с частотой импульсов ~1 кГц и с длительностью импульса ~ 10-40 наносекунд. При такой длительности разряда искровые каналы не успевают формироваться как в газовой фазе, так и в пористом матриксе [16]. Можно предположить, что пробой в наносекундном диапазоне происходит однородно во всем объеме диэлектрической пористой среды матрикса, что позволяет обрабатывать внутренние полости пористых образцов. Для обработки образцов большой толщины используется вакуумная камера, в которой поддерживается давление ниже атмосферного. В наших условиях имелась возможность варьирования следующих параметров – время обработки: 1 с – 1 час, давление: 0,05-3 атм, вид газа: воздух, азот, углекислый газ, аргон, гелий, длительность импульсов 20-40 нс, частота следования: 100 Гц – 1,5 кГц. Амплитуда импульса тока в ИДБР составляла 23 А, амплитуда импульса напряжения 9 кВ. Зазор между электродами составлял 0-1 см. Наносекундный ИДБР обладал однородной пространственной структурой.

РЕЗУЛЬТАТЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

Матриксы из ПОБ/ПОВ, сформированные методом электроспиннинга и гель-сублимационным методом, как исходные, так и обработанные в плазме ДБР и ИДБР, подвергались испытаниям на гемолиз и цитотоксичность по стандартным методикам [17].

На рис. 4 приведены результаты исследования гемолитического действия для матриксов ПОБ/ПОВ, полученных методом электроспиннинга и обработанных в диэлектрическом барьерном разряде в течение 15, 30 и 60 с. Там же приведены результаты для образцов, полученных методом гель-сублимационной сушки и обработанных в наносекундном барьерном диэлектрическом разряде в течение 60 с. Гемолиз проводился с использованием человеческой крови. Для всех исследуемых образцов величина гемолиза была меньше 2%, что свидетельству-



Рис. 4. Результаты исследований гемолитического действия для образцов, полученных методом электроспиннинга (а) и гель-сублимационным методом (б), исходных и обработанных в ДБР в течение различного времени



Рис. 5. Результаты исследований цитотоксичности для образцов, полученных методами электроспиннинга (а) и гельсублимации (б) и обработанных в ДБР в течение различного времени

ет о пригодности малых времен обработки (<1 мин) для модифицирования образцов.

Для тех же образцов были проведены испытания на цитотоксичность, результаты которых приведены на рис. 5. Можно констатировать практически полное отсутствие цитотоксичности для всех исследуемых образцов, как обработанных, так и не обработанных. Плазменная обработка, как следует из полученных данных, в среднем приводит к некоторому увеличению доли пролиферирующих клеток, т. е. к уменьшению цитотоксичности по отношению к клеткам фибробластов. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что, по-видимому, время обработки в плазме, равное 60 с, является оптимальным по совокупности критериев: гидрофильность, цитотоксичность и пролиферация.

выводы

С использованием метода электроспиннинга и гель-сублимационного метода приготовлены лабораторные образцы объемных матриксов из биорезорбируемого полимера, ПОБ/ПОВ. В гельсублимационном методе при соответствующем соотношении концентраций полимера и растворителей и оптимизированных режимах замораживания и сублимации заготовок получены матриксы, имеющие уникальную полимодальную внутреннюю структуру с размерами в диапазоне от ~100 мкм до ~100 нм. Пористость полученных матриксов находится в диапазоне 80–90%.

Исследовано несколько вариантов обработки объемных матриксов в электроразрядной плазме: диэлектрический барьерный разряд, несамостоятельный объемный разряд, поддерживаемый электронным пучком; наносекундный диэлектрический барьерный разряд. Все примененные разряды обеспечивают объемную смачиваемость пористых матриксов. Биологические испытания, проведенные для исходных матриксов, полученных методом электроспиннинга и гель-сублимационным методом и обработанных в плазме ДБР и ИДБР, показали отсутствие токсичности и хорошую совместимость матриксов с клетками мышиных фибробластов линии 3T3.

Разработанные и изготовленные лабораторные образцы матриксов, исследования их структуры, морфологии и биологических свойств показали, что матриксы, изготовленные методами гель-сублимации и электроспиннинга и обработанные в электрических барьерных и электронно-пучковом разрядах, являются технологичным и перспективным материалом для их использования в качестве имплантируемых носителей клеток.

Работа выполнена при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям, Госконтракт 02.512.11.2236.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Севастьянов В.И., Егорова В.А., Немец Е.А., Перова Н.В., Онищенко Н.А. Медико-биологические свойства биодеградируемого материала «Эласто-ПОБ» // Вестник трансплантол. и искусств. органов. 2004. № 2. С. 47–52.
- 2. Марковцева М.Г., Немец Е.А., Севастьянов В.И. Пористые трехмерные носители для культивирования и трансплантации клеток на основе сополимера гидроксибутирата с гидроксивалератом // Вестник трансплантол. и искусств. органов. 2006. № 4. С. 83–88.
- Потапов И.В., Ильинский И.М., Куренкова Л.Г. и др. Пленочные системы «ЭластоПОБ» с иммобилизованными стромальными клетками костного мозга оптимизируют условия регенерации поврежденных тканей // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2005. № 3. С. 151–115.
- 4. Севастьянов В.И., Егорова В.А., Немец Е.А., Перова Н.В., Онищенко Н.А. Биодеградируемый материал «ЭластоПОБ» для клеточной трансплантации // Перспективные материалы. 2004. № 3. С. 35–41.
- Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. Полиоксиалканоаты – биоразрушаемые полимеры для медицины. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2003. 330 с.
- Peters M.C., Mooney D.J. Synthetic extracellular matrices for cell transplantation, Porous materials for tissue engineering, eds.: Dean-Mo Liu, Vivek Dixit, Materials Science Forum. 1997. Vol. 250. P. 43–52.

- Li W.J., Laurencin C.T., Caterson E.J., Tuan R.S., Ko F.K. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering // J. Biomed. Mater. Res. 2002. Vol. 60. P. 613–621.
- Василец В.Н., Казбанов И.В., Ефимов А.Е., Севастьянов В.И. Разработка новых методов формирования имплантационных материалов с использованием технологий электроспиннинга и биопринтирования // Вестник трансплантол. и искусств. органов. 2009. Т. 2. С. 47–53.
- Gerenser L.J. X-Ray photoemission study of plasma modified polyethylene surfaces // J. Adhesion Sci. Techn. 1987. Vol. 1. P. 303–318.
- Lub J., Vroonhoven F.C., Bruninx E., Benninghoven A. Surface modification of polystyrene by nitrogen plasma // Polymer. 1989. Vol. 30. P. 35–40.
- 11. Strobel M., Corn S., Lyons C.S., Corba J.A. Enhancement of adhesion to polypropylene films by CF_4 and CF_3H plasma treatment // J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 1985. Vol. 23. P. 1125–1128.
- d'Agostino R., Cramarossa F., Colaprico V., d'Ettole R. Mechanisms of etching and polymerization in radiofrequency discharges of CF₄-H₂, CF₄-C₂F₄, C₂F₆-H₂, C₃F₈-H₂ // J. Appl. Phys. 1983. Vol. 54. P. 1284– 1295.
- 13. *Favia P., Lopez L. C., Sardella E. et al.* Low temperature plasma processes for biomedical applications and membrane processing // Desalination. 2006. Vol. 199. Issue: 1–3. P. 268–270.
- Fridman G., Brooks Ari D., Balasubramanian M. et al. Comparison of Direct and Indirect Effects of Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma on Bacteria, Plasma Processes and Polymers. 2007. Vol. 4. P. 370–375.
- 15. Долгачев Г.И., Масленников Д.Д., Мижирицкий В.И., Недосеев С.Л. и др. Экспериментальная установка «ЭХО» для модифицирования гетерогенных органических сред совместным действием электрического разряда и электронного пучка. Вопросы атомной науки и техники // Термоядерный синтез. 2008. Вып. 1. С. 57–68.
- Ayan H., Fridman G., Gutsol A.F. et al. Nanosecond Pulsed Uniform Dielectric Barrier Discharge, IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE. 2008. Vol. 36. № 2. P.504–508.
- Биосовместимость / Под ред. В.И. Севастьянова, М.: ГУП «Информационный центр ВНИИгеосистем», 1999. С. 27.