# РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОВЕРХНОСТНО СЕЛЕКТИВНОГО ЛАЗЕРНОГО СПЕКАНИЯ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ МАТРИЦ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ.

Е.Н. Антонов, В.Н. Баграташвили, В.К. Попов, А.В. Попова, С.А. Бочкова, Л.И. Кротова (ИПЛИТ РАН) Дж. Барри, Р. Ореффо, С.М. Хоудл (Ноттингемский Университет, Великобритания).

Тканевая инженерия в настоящее время является одной из наиболее быстро и динамично развивающихся областей современной биомедицины. Она включает в себя формирование постоянных или временных матричных структур, в которые вводятся органические биоактивные агенты и клеточные культуры, в том числе собственные клетки пациента [1-4]. Матричные структуры-носители являются ключевым элементом для создания современных тканеинженерных конструкций. Материал и структура матриц должны быть оптимизированы в соответствии с требованиями их конкретного использования. Так, при устранении дефектов костной ткани, с размером дефекта превышающего некоторый критический размер, вместо костной ткани формируется соединительная ткань, образуя ложные суставы. Именно в таких случаях и необходимо имплантировать тканеинженерную конструкцию заданной формы, соединяющую края дефекта и индуцирующую процесс остеогенеза. Для этих целей наиболее перспективным считается использование пористых композитных структур, изготовленных на базе биорезорбируемых синтетических полимеров и биоактивной керамики [5].

Для изготовления пористых биосовместимых структур применяются различные методы: вспенивание полимеров газами высокого давления, добавление в материал и последующее выщелачивание солей и др. Тем не менее, традиционные методы обладают целым рядом принципиальных и технических ограничений, которые и привели к необходимости разработки и использования для этих целей методов быстрого прототипирования - послойного формирования трехмерных объектов по компьютерной модели [6]. Среди методов быстрого прототипирования, селективное лазерное спекание (СЛС) наиболее адекватно отвечает многочисленным требованиям, предъявляемым к матрицам для тканевой инженерии [7].

Целью, проводимых на протяжение последних шести лет в ИПЛИТ РАН, исследований являлась разработка трехмерных матричных структур для замены и регенерации костной ткани с использованием метода селективного лазерного спекания.

Трехмерные структуры, сколь угодно сложной архитектоники, формируются методом СЛС путем последовательного спекания слоев порошковых материалов по заданной компьютерной программе. Использование СЛС для формирования тканеинженерных матриц позволяет расширить номенклатуру применяемых материалов по сравнению с другими методами быстрого прототипирования, улучшить пространственное разрешение и воспроизводимость параметров структур. Однако существуют ограничения по биомедицинским применениям СЛС, связанные с нагревом материала лазерным излучением и его возможной термодеструкцией. Термодеструкция полимеров может привести к образованию токсичных компонент, а при добавлении в спекаемые порошки биологически активных веществ может привести к потере их биоактивности.

Для преодоления ограничений, связанных с термодеструкцией высокомолекулярных соединений, нами была предложена и реализована модифицированная версия метода СЛС – поверхностно-селективное лазерное спекание (ПСЛС) [8-10, 7].

В методе ПСЛС лазерное спекание полимерных частиц происходит при поглощении лазерного излучения частицами сенсибилизатора, например, углерода, добавленными в полимерный порошок в небольшом количестве. Предполагается, что частицы порошка полимера и прочих высокомолекулярных соединений не имеют полос поглощения на длине волны используемого лазерного

излучения. Это позволяет синтезировать из любых полимерных частиц трехмерные матрицы с заданной формой и внутренней структурой, сохраняя при этом химический состав исходных полимеров и включенных в них биоактивных соединений.

#### Поверхностно-селективное лазерное спекание

В основе создания трехмерных полимерных матриц методом лазерного спекания микрочастиц лежит послойное лазерное формирование спеченных слоев по заданной программе. Элементарным шагом в этом процессе является связывание (спекание, сварка) между собой двух предварительно не связанных полимерных частиц, вызванное плавлением нагретого лазером материала частиц на границе их соприкосновения.

На Рис.1 показаны возможные схемы лазерного спекания полимерных микрочастиц. Первая схема (Рис.1а) соответствует случаю, когда показатель поглощения лазерного излучения материалом частицы  $k_a$  достаточно велик (1/  $k_a$  много меньше размера полимерной частицы  $d_n$ ). В этом случае (1/  $k_a \ll d_n$ ) имеет место нагрев и плавление лишь передней по отношению к направлению лазерного излучения поверхности частицы. Сплавление соседних по глубине слоев частиц может происходить лишь за счет процесса теплопереноса, однако, при этом всегда будет иметь место нагрев всего объема частицы, а, кроме того, и значительный перегрев передней поверхности частицы.

Данная схема реализуется в традиционном методе СЛС при использовании для нагрева материала полимера лазеров среднего ИКдиапазона, в частности, СО<sub>2</sub> лазеров на длине волны 10,6 мкм. Процесс спекания частиц сопровождается значительным (выше температуры плавления-размягчения) нагревом или даже перегревом полимера, что, очевидно, неприемлемо, если принять во внимания термическую лабильность материала полимера, и, уж тем более, инкорпорированного в него биологически активного соединения.



Рис. 1. Схемы лазерного спекания полимерных микрочастиц. а - поглощение излучения происходит на самих полимерных частицах, б – поглощают частицы сенсибилизатора.

Рис.1.6 соответствует предложенному и реализованному нами методу поверхностно-селективного лазерного спекания. Лазерное излучение слабо поглощается полимерными частицами ( $1/k_a >> d_n$ ), а ввод энергии излучения в систему осуществляется за счет добавления в полимерный порошок сенсибилизатора, а именно, углеродных частиц, сильно поглощающих лазерное излучение. Размер углеродных

частиц много меньше размера полимерных частиц ( $d_n << d_c$ ). Концентрация углеродных частиц  $N_c$  много больше концентрации полимерных частиц  $N_n$  (т. е. каждая полимерная частица может быть покрыта несколькими углеродными частицами), а объемная концентрация углеродных частиц  $V_c << V_n$  концентрации полимерных частиц. Сильно поглощающие лазерное излучение углеродные частицы нагревают находящиеся с ними в тепловом контакте, не поглощающие лазерное излучение полимерные частицы, вызывая локальное расплавление приповерхностного слоя. Если поглощающая частица находится в контакте одновременно с двумя частицами полимера, то это как раз и может вызвать их спекание. При этом зона высокой температуры локализована лишь в небольшом объеме вблизи поверхности микрочастицы (Рис.1.б). Это позволяет осуществлять процесс спекания полимерных частиц, не вызывая повышения температуры во всем объеме частицы. Процесс оптимизации технологии ПСЛС состоит: 1). в подборе оптимальных соотношений размеров и концентраций частиц полимера и сенсибилизатора и, если необходимо, других наполнителей; 2). в выборе метода приготовления исходных материалов для спекания; 3). в выборе оптимальных параметров лазерного облучения (длины волны лазерного излучения, размера лазерного пятна, скорости и режима сканирования).

Рассмотренная выше схема ПСЛС первоначально была реализована с использованием экспериментальной установки прямого лазерного рисования, которая позволяла перемещать пучок лазерного излучения по траектории, задаваемой компьютерной программой. Источником излучения являлся волоконный лазер с длиной волны излучения λ=0,97 мкм, мощностью до 20 Вт (НТО "ИРЭ-Полюс", Фрязино). В качестве базового материала использовался биорезорбируемый поли(D,L)лактид (ПЛА) с молекулярной массой М<sub>w</sub> ≈ 90 кДа.

В порошок ПЛА в качестве сенсибилизатора добавлялись наночастицы углерода, размер которых был много меньше размеров частиц полимера, в количестве 0,1 вес.%. Частицы полимера не имели полосы поглощения на длине волны лазерного излучения, и излучение поглощалось только частицами углерода, находящихся на поверхности полимерных частиц. Тем самым достигался селективный поверхностный нагрев и спекание поверхностных слоев частиц полимера.

Были исследованы зависимости параметров формируемых структур от параметров лазерного излучения, размеров частиц и их пористости. Было показано, что при оптимизации параметров частиц и излучения размеры спеченных нитей не превышают 100 мкм. Следует отметить, что в методе укладки нитей из расплава – Fused Deposition Modeling (FDM), одного из основных методов быстрого прототипирования, используемого для формирования матриц носителей для тканевой инженерии, наилучшее пространственное разрешение составляло ~ 250 мкм [11].

С использованием тепловизора IRTIS 2000М были осуществлены измерения температурных полей, формируемых при различных условиях спекании порошков биорезорбируемых полимеров. Сделанные на основе проведенных измерений оценки показали, что для частиц полимера с размером 100 мкм, при превышении порога спекания в 2-3 раза увеличение температуры центральной области частиц не превышает 10°C [7]. Исследования показали, что разрабатываемая нами схема СЛС, с введением в полимерный порошок поглощающих центров, позволяет путем выбора параметров ввода энергии изменять температуру, скорость ее нарастания и объем области нагрева в частицах. Динамика процесса лазерного спекания частиц ПЛА с добавками наночастиц углерода в качестве сенсибилизатора исследовалась с помощью цифровой видеокамеры (SONY TVR17), встроенной в оптическую систему микроскопа Micros (MC300, Австрия). Было продемонстрировано, что возможны режимы спекания, при которых основной объем частиц не плавится, а процесс плавления затрагивает только поверхностные участки полимера, на которых находятся поглощающие частицы углерода.

Были получены количественные данные по параметрам взаимодействия лазерного излучения с порошками, имеющими различную плотность и структуру полимерных частиц, разработана модель нагрева отдельных частиц порошка и сделаны оценки для градиентов

температур в зависимости от условий поглощения энергии лазерного излучения. Были показано, что методика ПСЛС делает и более эффективным энерговклад в порошок по сравнению с объемным поглощением при прочих равных условиях. Полученные данные легли в основу технических требований на разработку системы селективного лазерного спекания, специализированной для спекания порошков на полимерной основе.

На основании результатов и данных полученных при изучения процесса ПСЛС и самих спекаемых структур в ИПЛИТ РАН была разработана, сконструирована и изготовлена автоматизированная установка СЛС-100 (Рис.2), предназначенная, как для дальнейшего изучения процессов поверхностно селективного лазерного спекания, так и для формирования реальных индивидуальных имплантатов с высокой производительностью.

В состав установки селективного лазерного спекания входят.

- Оптический тракт формирования лазерного излучения, включая двухкоординатный оптический сканатор (Рис.3).
- Рабочая камера для спекания.
- Система приготовления и подачи порошка.
- Система термостатирования
- Программное обеспечение для управления элементами установки.

Максимальные размеры изготавливаемых 3D объектов составляют 100х100х50мм<sup>3</sup> при точности воспроизведения не хуже ± 100мкм.

Источником излучения в СЛС-100 являлся специально разработанный одномодовый волоконный лазер с длиной волны излучения λ=1,06 мкм, мощностью до 10 Вт (НТО "ИРЭ-Полюс", Фрязино). Разработанная система фокусировки и сканирования лазерного излучения позволяла получать на поверхности спекаемого порошка пучок, диаметром 100 мкм. Скорость сканирования пучка излучения варьируется от миллиметров до нескольких метров в секунду. СЛС-100 полностью автоматизирована и позволяет формировать трехмерные изделия по компьютерной модели.



К матричным структурам, применяемым в тканевой инженерии, предъявляются высокие и разнообразные требования. Матрицы должны быть трехмерными, задавать форму возобновляемой ткани и обладать высокой пористостью со связанной сетью пор. Материал и поверхность матриц должны способствовать клеточной адгезии, пролиферации, и дифференцировке. Матрицы должны обладать определенной прочностью, как в момент имплантации, так и в процессе последующей адаптации внутри организма [12, 13]. Для матриц, используемых для формирования тканей с различными типами клеток, существует свой, оптимальный масштаб пористой структуры. Для костной ткани оптимальные размеры пор лежат в диапазоне 100 -800 мкм [14]. С учетом вышеизложенных требований нами разрабатывались и формировались матрицы с трехмерной ячеистой структурой, размер ячеек которых составлял ~ 500 – 600 мкм (Рис.4).



Рис. 4. Матрицы - носители, сформированные методом ПСЛС. (Увеличение: x2 (a); x15 (б); x25 (в)).

Трехмерные компьютерные модели костей реальных пациентов, полученные методами рентгеновской томографии, разбивались на слои, каждый из которых отображался stl – файлом. По полученным файлам на установке СЛС-100 формировались реальные биомодели. Из порошков полилактида со средним размером частиц 50 мкм были изготовлены демонстрационные биомодели челюсти, черепа и фрагмента позвоночника в масштабе уменьшенным в 5-10 раз по сравнению с исходным. При этом было реализовано пространственное разрешение 150 мкм (Рис.5)



Рис. 5. Компьютерная модель челюсти и биомодели челюсти, черепа и фрагмента позвоночника, изготовленные методом ПСЛС.

### Влияние ПСЛС на активность веществ, импрегнированных в материал матрицы

Трехмерные пористые структуры, базирующиеся на биодеградируемых полимерах в комбинации с лекарствами и биологически активными веществами (БАВ), активно разрабатываются в последнее десятилетие. В процессе контролируемого выхода лекарства, биодеградируемый полимер может полностью резорбироваться организмом. Преимущество данной системы в том, что пролонгированное воздействие медикамента на пациента может быть достигнуто его однократным введением внутрь организма без последующего оперативного извлечения имплантированной матрицы.

При лазерном спекании порошков существует большая вероятность термического разложения, как самого полимера, так и, включенных в него, биоактивных компонент. В методе ПСЛС по сравнению с классическим методом селективного спекания значительно уменьшены градиенты температур и, соответственно, возможность термодеструкции молекул полимеров и биоактивных агентов. Однако вероятность перегрева и частичной деструкции БАВ остается. Принципиальная возможность сохранения активности БАВ, инкапсулированных в ПЛА и подвергнутых термическому воздействию в процессе ПСЛС, впервые была нами продемонстрирована на примере рибонуклеазы А [10]. Затем влияние величины мощности лазерного излучения на активность ферментов при ПСЛС было исследовано нами при спекании порошков ПЛА с включенным в полимер 10 % кристаллического трипсина [17, 18].

Приготовление порошков полимеров с включенными в них БАВ осуществлялось с использованием метода пластификации полимера сверхкритическим диоксидом углерода. Порошок кристаллического трипсина (Самсон-Мед, Санкт-Петербург) в количестве 10 весовых % смешивался с порошком ПЛА (Poly (D,L)-lactic acid Alkermes Inc, USA; Mw -84 kDa,). Смесь порошков помещались в камеру высокого давления. В камеру подавался CO<sub>2</sub>, и система выдерживалась в течение 1 часа при давлении 100 бар и температуре 40°С. После сброса давления CO<sub>2</sub> в камере формировался полимерный композит с однородно включенными в него частицами трипсина. Композит затем размалывался ротационной мельницей с использованием сухого льда до получения порошка с размером частиц порядка 200 мкм. Затем, полученные порошки спекались методом ПСЛС при различных энергиях лазерного излучения на установке СЛС-100.



Активность трипсина до и после лазерного спекания тестировалась с помощью хромогенного субстрата р-нитроанилида бензоиларгинина (Bz-Arg-pNA) в Трис•НСІ буфере. Проводилось измерение оптической плотности супернатанта при длине волны 410 нм. Результаты по измерению активности трипсина приведены на Рис.6. Активность исходного трипсина принималась за 100%. Активность фермента уменьшается с увеличением вложенной лазерной энергии, но остается достаточно высокой. Так, даже при 3-х кратном превышении энергии лазерного излучения над энергией порога спекания, активность трипсина оставалась на уровне 56% от исходной.

Рис.6. Зависимость активности трипсина от превышения порога спекания.

Проведенные исследования показали, что изменением режимов ПСЛС можно управлять скоростью выхода БАВ из полимера и их активностью. Таким образом, структуры с включенными БАВ, сформированные методом ПСЛС, при имплантации в организм могут обеспечить пролонгированное действие препаратов на окружающие ткани.

## Биологическое тестирование in vitro

Тестирование с клеточными культурами используется для определения токсичности, биологической совместимости и биологической активности материалов и структур. С этой целью нами проводились исследования по росту различных клеточных культур на поверхности ПЛА матриц, сформированных ПСЛС [19]. Рис.7.а демонстрирует культуры 3T3 фибробластов, выращенных на поверхности 3х мерных пористых матриц из ПЛА, синтезированных методом ПСЛС. Фибробласты хорошо пролиферируют на поверхности, спеченных образцов, что подтверждает их полную биосовместимость. Способность поверхности матриц к хорошей адгезии пролиферации клеток демонстрирует также Рис.7.6, где показаны культуры ovine meniscal хондроцитов, покрывающих через 24 часа после высевания более 50% поверхности матрицы.



Рис.7. Рост фибробластов (а) и хондроцитов (б) на ПЛА матрицах.

Также исследовался рост миобластов линии C2C12 на поверхности ПЛА матриц в присутствии и в отсутствии фактора роста, костного морфогенетического протеина rhBMP-2 (500нг/мл) [20]. Наблюдалась дифференциация миобластов в остеобласты в присутствии фактора роста (Рис.8). Время тестирования составляло 7 суток.



Рис.8. Миобласты линии С2С12 на матрицах, спеченных из ПЛА в присутствии фактора роста ВМР-2, дифференцируют в остеобласты.

Тем самым было показано, что на поверхности матриц клетки обладают высокой активностью, и поверхность PLA не препятствует эффективной дифференциации миобластов в остеобласты.

### Биологическое тестирование матриц *in vivo* с использованием стволовых клеток

Важным направлением современной тканевой инженерии является использование биологически совместимых или собственных клеток пациента, размноженных *in vitro*, для ускорения формирования ткани. Нами была исследована способность матриц ПЛА и эмбриональных клеток человека, обеспечивать основу для дифференциации и минерализации in vivo [21]. Эксперименты проводились на мышах иммунодефицитной линии (женские особи MF-1 nu/nu Harlan, Loughborough, UK). Матрицы, размером 5x5x3 мм, были изготовлены из порошка ПЛА методом ПСЛС. Клетки, стимулированные базальной или остеогенной средой, были высеяны из суспензии, содержащей 10<sup>7</sup> клеток на миллилитр среды в ПЛА-матрицы. В бедренных костях мышей формировался дефект кости больше критического размера - удалялось 5мм костной ткани. Группам животных в дефект помещались матрицы, часть из которых была засеяна клетками костного мозга взрослого человека и зародышевыми клетками берцовой кости человека. Через 4 недели в подкожных имплантатах наблюдалось ярко выраженное сосудообразование, рост кровеносных сосудов внутри и вокруг ПЛА-матриц (Рис.9).

Рентгенографические анализы (Рис.10) показали, что в контрольной группе, без матрицы, в дефекте кости, по прошествии четырехнедельного периода, восстановления ткани не наблюдалось (Рис.10.А). Костные формирования наблюдались в группах с имплантированной ПЛА-матрицей (Рис.10.В, С и D). Наиболее заметное костеобразование и замещение дефекта наблюдалось в группах с матрицами, предварительно засеянными клеточными культурами (Рис.10.С, D). Значительная минерализация возникала в группе с матрицей, засеянной зародышевыми клетками берцовой кости человека (Рис.10.D).



Рис.9. Васкуляризация вокруг и внутри ПЛА матриц с эмбриональными клетками человека, стимулированные базальной (А) и остеогенной средой (В).



Рис.10 Рентгенограммы дефекта бедренной кости мыши спустя 4 недели после операции: А - контрольная группа, В- группа с имплантированной матрицей, С- группы с имплантированной матрицей, засеянной клетками костного мозга взрослого человека, D- группы с имплантированной зародышевыми клетками берцовой кости человека.

Проведенные исследования показали, что материал матриц не препятствует активному росту костной ткани, а их особый дизайн облегчает проникновение клеток в центральный район дефекта. Матрицы, сформированные методом ПСЛС, ускоряют восстановление целостности кости с дефектом больше критического размера. Наибольший эффект восстановления достигается при предварительном засевании матриц стволовыми клетками.

### В результате проведенных работ:

- Разработан метод поверхностно-селективного лазерного спекания для формирования матриц для тканевой инженерии.
- Разработана и изготовлена автоматизированная установка селективного лазерного спекания СЛС-100.
- Реализован синтез пористых матриц на базе биорезорбируемых полимеров.
- Исследован процесс осаждения на поверхность матриц остеоиндуктивных неорганических соединений.

- разработаны методы включения биологически активных веществ (протеинов, лекарств) в полимеры и проведены исследования по динамике выхода этих веществ и их активности.
- проведено исследование биологической активности ПЛА матриц *in vivo* с использованием стволовых клеток.

Результаты проведенных исследований показали, что метод поверхностно селективного лазерного спекания обладает универсальностью и имеет ряд преимуществ перед другими методами быстрого прототипирования при формировании объектов биомедицинского назначения. Матрицы, сформированные этим методом, обладают биологической совместимостью и управляемой биологической активностью и могут успешно использоваться для направленной регенерации костной ткани.

### Литература.

- 1. R.Langer, J.P.Vacanti, Tissue engineering. Science 1993, 260, 920-926
- 2. M.Sittinger, J.Bujia, et al., 1996, Biomaterials, 17, 237–242.
- 3. J.S. Temenoff, A.G.Mikos, Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage, 2000, Biomaterials, 21, 431-440.
- 4. W.Sun, P.Lal, Recent development on computer aided tissue engineering, 2002, Computer Methods and Programs in Biomedicine, 67, 85-103.
- 5. K. Rezwan, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini, 2006, 27, 3413–3431.
- 6. K.F. Leong, C.M. Cheah, C. K. Chua, Biomaterials, 2003, 24, 2363-2378.
- 7. E. N. Antonov, V. N. Bagratashvili, et al, Laser Physics, 2006, 16, 774 787.
- 8. Е.Н.Антонов, В.Н.Баграташвили, А.Н.Коновалов, В.К.Попов, С.М.Хоудл, Труды XI Международной конференции "Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии" Гурзуф, Украина, 1-10 июня 2003 г., стр. 209-211.
- 9. V.K. Popov, E.N. Antonov, V.N. Bagratashvilli, et al, Materials Processing for Properties and Performance (MP3), 2004, V. 3, pp. 332-339.
- 10. E.N.Antonov, V.N.Bagratashvilli, M. J.Whitaker, et al., Advanced Materials, 2005, V. 17, p 327-330
- 11. I.Zein, D.W.Hutmacher, K.C.Tan, S.H.Teoh, 2002, Biomaterials, 23, 1169-1185
- 12. D.W Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, Biomaterials 21, 2000, 2529-2543.
- 13. S. Das, S.J. Hollister, C. Flanagan, A. Adewunmi, K. Bark, C. Chen, K. Ramaswamy, D. Rose, E. Widjaja, Rapid Prototyping J., 2003, 9, 43-49.
- 14. Y. Li, S.T. Yang, Biotechnol. Bioprocess Eng., 2001, 6, 311-325.
- 15. E.N.Antonov, A.S.Fomin, A.V.Popova, V.K.Popov, I.I. Selezneva, S.M.Barinov, O.S.Antonova, V.N.Bagratashvili, in "Nanotechnology for functional repair and regenerative medicine. The role of ceramics as in bulk and as coating", Consiglo Nacionale delle Ricerche, 2008, pp.114-119.
- 16. Е.Н.Антонов, В.Н.Баграташвили, В.К. Попов и др., Альманах клинической медицины, Том XVII, стр. 30, 2008
- 17. E.Antonov, V.Bagratashvili, E.Markvicheva, et al, Proc/ of 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology in Barcelona, Spain, 7- 10Apr. 2008
- 18. С.А.Бочкова, Е.Н.Антонов, В.Н.Баграташвили и др., Труды XYI Международной конференции "Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии". Гурзуф, Украина, 31мая -9 июня 2008 г., стр. 57-58.
- 19. V.K. Popov, E.N. Antonov, V.N. Bagratashvilli, et al., in Materials Processing for Properties and Performance, 2005, V.4, pp. 152-154,
- 20. Е.Н.Антонов, В.Н.Баграташвили, В.К.Попов, С.М.Хоудл, Р.Ореффо и др., Труды XIY Международной конференции "Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии" Гурзуф, Украина, 31мая -9 июня 2006 г., стр. 224-225
- 21. J.M.Kanczler, S-H. Antonov, V. N. Bagratashvili, V. K. Popov, R. O.C. Oreffo, et al., 2009, Acta Biomaterialia, 5, 2063-2071.