

Московский Государственный университет им. М. В. Ломоносова

Химический факультет

Кафедра физической химии

**Влияние ИК-лазерной обработки на
сорбционную емкость препаратов хрящей**

Курсовая работа по физической
химии студента 40X группы
XXXXXXXXX X.X.

Научный руководитель: к.х.н.
XXXXXXXXX X.X.

Москва 200X

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	3
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	4
1.1. СОСТАВ И СТРУКТУРА ИССЛЕДУЕМЫХ ТКАНЕЙ	4
1.1.1. Коллаген как важнейшая составляющая соединительных тканей ...	4
1.1.2. Состав хрящевой ткани	5
1.1.3. Надмолекулярная структура и морфология хряща	6
1.2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ.....	7
1.2.1. Дифференциальная сканирующая калориметрия соединительных тканей	7
1.2.2. Сорбция паров воды биологическими объектами.....	9
1.3. ЛАЗЕРНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА БИОТКАНИ	12
1.3.1. Лазеры, использующиеся в медицине	12
1.3.2. Взаимодействие лазерного излучения с биологическими тканями	13
1.3.2.1. Распределение энергии при лазерном облучении биотканей	13
1.3.2.2. Фотохимическое воздействие.....	15
1.3.3. Реакция биотканей на тепловое воздействие.....	15
1.3.3.1. Низкоинтенсивное лазерное воздействие	17
1.3.3.2. Субабляционное лазерное воздействие на биоткани	17
1.3.3.3. Абляционное лазерное воздействие на биоткани.....	19
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	21
2.1 МАТЕРИАЛЫ	21
2.2 ОБЛУЧЕНИЕ ТКАНЕЙ.....	21
2.3 РАДИОМЕТРИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТЕМПЕРАТУРЫ	22
2.4 ИЗОТЕРМЫ СОРБЦИИ	22
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	24
4 ВЫВОДЫ.....	29
5 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	30

Введение

Лазерное излучение широко применяется во многих областях человеческой деятельности, особенно в современной медицине. В частности, в настоящее время лазеры используют в офтальмологии, оториноларингологии и пластической хирургии. На текущий момент внедрение лазеров в медицину значительно опережает накопление научных сведений по данной тематике. Развитие новых лазерных медицинских технологий стимулирует интенсивные исследования механизмов взаимодействия лазерного излучения с различными биотканями [1]. Наиболее перспективным в настоящее время является воздействие на ткани ИК лазерного излучения умеренной интенсивности, так называемая локальная лазерная гипертермия. При этом повышение температуры на несколько десятков градусов приводит к нужному терапевтическому или хирургическому результату (спайка сосудов [2], изменение формы хрящей носовой перегородки [3] и др.). Локальность и кратковременность лазерного нагрева предотвращают повреждение биологических тканей, обеспечивают безопасность и неразрушающий характер воздействия.

Внимание большинства исследователей до сих пор привлекали, главным образом, изменение оптических свойств и структуры биологических тканей при лазерном воздействии [3–6]. Однако, этих данных недостаточно для описания физико-химических процессов, происходящих при лазерной обработке. Более тонкие изменения в ткани, такие, как надмолекулярная реорганизация системы коллагеновые волокна – протеогликаны изучены недостаточно. Поэтому целью данной работы является **исследование изменения надмолекулярной структуры в соединительных тканях, подвергнутых ИК лазерному воздействию.**

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Состав и структура исследуемых тканей

1.1.1. Коллаген как важнейшая составляющая соединительных тканей

На сегодняшний день известно более двух десятков различных коллагенов. Для различных типов коллагенов до сих пор продолжается расшифровка первичной структуры α -цепей (а их на данный момент описано не менее 10), но брутто-состав уже известен для многих коллагеновых субъединиц (табл. 1). При этом в литературе продолжают появляться сообщения об обнаружении новых типов коллагенов. Однако, в хрящевом матриксе встречаются в основном только коллагены II, XI и IX, а в фиброзной соединительной ткани – коллаген I, который является самым распространённым типом коллагена в организме. Коллаген I представляет собой гетеротример [$\alpha 1$ (I) $_2$ $\alpha 2$ (I)]. Волокна коллагена II в матриксе, как правило, тоньше волокон коллагена I и не образуют плотных пучков.

Таблица 1. Аминокислотные остатки некоторых коллагеновых субъединиц в пересчете на 1000 остатков.

Остатки	$\alpha 1$ (II)	$\alpha 1$ (I)	$\alpha 2$
Глицил	322	306	320
Гидроксипролил	105	102	102
Пролил	112	116	111
Гидроксилизил	23	36	41
Лизил	13	18	17
Аланил	104	71	105

Коллаген XI структурно мало отличается от коллагена II. Формула коллагена XI имеет вид $\alpha 1$ (XI) $\times\alpha 2$ (XI) $\times\alpha 3$ (XI), причем $\alpha 3$ (XI)-цепь весьма сходна с $\alpha 1$ (II)-цепью, что позволяет предположить, что и $\alpha 3$ (XI), и $\alpha 1$ (II) – продукты одного гена. Коллаген IX, $\alpha 1$ (IX) $\times\alpha 2$ (IX) $\times\alpha 3$ (IX), существенно отличается по строению от фибриллообразующих коллагенов, как называют коллагены II и XI. Главное его отличие заключается в том, что N терминальный участок $\alpha 1$ (IX) зачастую несет достаточно крупный доменный участок, а $\alpha 2$ (IX) содержит участок присоединения гликозаминогликановой боковой цепи.

Наличие в системе коллагенов II, XI и IX является принципиальным, поскольку каждый из них имеет свою определенную функцию в структуре коллагеновой фибриллы [1].

1.1.2. Состав хрящевой ткани

Хрящевая ткань – одна из разновидностей соединительной ткани, относящаяся к группе тканей опорной функции. Особенности структуры хряща на молекулярном и морфологическом уровнях обеспечивают его прочность и эластоупругие свойства, то есть способность к обратимой деформации с одновременным сохранением возможности активного метаболизма.

Химический состав и параметры надмолекулярной структуры хрящевой ткани варьируются в зависимости от биологического вида и возраста донора образца, а также от типа хряща и локализации донорской зоны в пределах одного органа. Например, в суставных хрящах концентрация коллагена выше в поверхностной зоне [2].

Хрящевая ткань содержит относительно небольшое количество (меньше одного массового процента) специализированных метаболически активных клеток, хондроцитов, интегрированных в межклеточный матрикс. Функция хондроцитов сводится к производству и поддержанию молекулярного состава и регенерации матрикса. В большинстве своем хондроциты формируют поликлеточные образования, хондроны. Физико-механические и другие свойства хрящевой ткани обусловлены свойствами матрикса.

Матрикс представляет собой гель сложного состава (табл. 2). Каркас матрикса представляет собой пространственную сетку коллагеновых фибрилл, сложным образом связанную с протеогликановыми агрегатами [2, 3-6]. Каркас заполнен водой, часть которой является свободной, а часть связанной, то есть входящей в сольватную оболочку макромолекул [7].

Таблица 2. Состав внеклеточного хрящевого матрикса:

Коллаген	10 – 30 %
Протеогликаны	3 – 10 %
Вода и растворенные электролиты	65 – 80 %

1.1.3. Надмолекулярная структура и морфология хряща

Исследованы взаимодействия *in vitro* (в растворе) коллагена с гликозаминогликанами [7, 8] и обнаружен факт комплексообразования коллагена с CS, HS и DS. В пользу комплексообразования говорят следующие факты:

- 1) температура плавления макромолекул коллагена в растворе повышается в присутствии GAG.
- 2) химическое «пришивание» CS к коллагену не меняет его температуру плавления в пленке. Известно, что взаимодействие гликозаминогликанов с коллагеном имеет электростатическую природу.

Также обнаружен факт образования комплексов коллагена со стержневыми белками, декорином и фибромодулином.

Изучено влияние малых PG на фибрилlogenез коллагена в растворе и найдено, что декорин и фибромодулин уменьшают скорость фибрилlogenеза [8]. Обнаружено существование тканевой специфичности взаимодействий

PG+ Collagen \leftrightarrow Complex

(«свой» PG оказывает наибольшее влияние на «свой» Collagen). На силу взаимодействия влияет степень гликозилирования коллагена, степень идуронизации CS/DS и длина цепи GAG.

Исследованы взаимодействия коллагена и протеогликанов *in vivo* генетическими (вывод линий животных с отсутствием синтеза PG) и биохимическими (нарушение биосинтеза PG) методами. Отсутствие и нарушение синтеза D и L приводит к утолщению фибрилл. Отсутствие и нарушение синтеза FM приводило к уменьшению диаметра фибрилл. Отсутствие любого малого протеогликана ведет к потере регулярности структуры ткани. Например, в роговице нарушаются регулярные расстояния между ламелями, а в коже – толщина волокна и расстояние между волокнами, что приводит к непрозрачности роговицы (без люмикана) и хрупкости и дряблости кожи (без декорина) [9-11].

Гистохимические и иммунохимические методы в соединении с микроскопией, ферментативной обработкой (гиалуронидазой AC и ABC хондроитиназой расщепляющие полисахариды до моносахаридов, которые затем вымываются) и физико-химической обработкой (детергенты и растворы электролитов различной ионной силы) показали, что декорин, фибромодулин и люмикан локализованы у поверхности коллагеновых фибрилл. Различные PG локализованы на различных участках макромолекул коллагена. Стержневой белок взаимодействует с коллагеном специфически (но не ковалентно), он перпендикулярен фибрилле, а вот гликозаминогликаны демонстрируют более слабые

неспецифические электростатические взаимодействия, которые меняются во времени, они могут располагаться то параллельно, то перпендикулярно коллагеновой фибрилле [9, 10].

Таким образом, все протеогликаны и протеогликановые агрегаты в соединительных тканях связаны друг с другом и с коллагеновыми фибриллами, образуя упорядоченную трёхмерную сеть.

Малые протеогликаны, участвующие в создании сложной надмолекулярной структуры, выполняют ряд важных функций:

- 1) Регулируют фибрилlogenез коллагена (диаметр и толщина фибрилл). Модель – присоединение D и L к фибрилле является сигналом к окончанию ее роста, а присоединение FM – сигналом к дальнейшему слиянию.
- 2) Предохраняют поверхность коллагеновых фибрилл от повреждений.
- 3) Регулируют динамическую жесткость тканей (как следствие).

1.2. Физико-химические методы исследования структуры биологических систем

1.2.1. Дифференциальная сканирующая калориметрия соединительных тканей

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии является одним из наиболее часто используемых физико-химических методов для исследования термических превращений биологических объектов. При этом ДСК анализу подвергают как ткани, изъятые из животных, так и модельные системы, имитирующие ту или иную ткань. Наиболее хорошо изучена модельная система коллаген – вода [12-22]. Для коллагена, как и для всех высокомолекулярных соединений, характерно два процесса. Первый процесс – стеклование представляет собой “разморозку” конформационных степеней свободы макромолекулы. Второй процесс – денатурация. В настоящее время денатурацию коллагена принято рассматривать в рамках модели фазового перехода первого рода как плавление биополимера с упорядоченной фибриллярной структурой (переход спираль - статистический клубок) [13, 14]. При исследовании этой системы принципиальным является вопрос о количестве присутствующей в ней воды. Так, известно, что температура денатурации коллагена зависит от количества воды в системе коллаген – вода. Это явление, по своей сути, является проявлением криоскопии. В коллагене разделяют связанную воду (входящую в сольватные оболочки макромолекул) и свободную. При наличии в системе свободной воды её термограмма довольно простая: при увеличении концентрации коллагена пик стеклования смещается в высокотемпературную область (от 6,5 до 12⁰С), а теплоёмкости нативного и денатурированного коллагена отличаются, но их разность остаётся постоянной. При частичной денатурации (нагрев до 50⁰С) появляется

низкотемпературное крыло пика денатурации, возникающее из-за плавления небольшого количества геля, образовавшегося при охлаждении частично нативного образца. При содержании в системе воды менее 27% (только связанная вода) для денатурированных образцов появляется аномальный скачок теплоёмкости при температуре предшествующей денатурации (S-образный ход кривых). Эта аномалия имеет все признаки, соответствующие процессу стеклования аморфных синтетических полимеров, а температура середины скачка теплоёмкости является температурой стеклования денатурированного коллагена. До этого скачка система проявляет стеклообразные свойства, а после – высокоэластические. Вода в этом случае выступает в роли пластификатора и чем её больше, тем меньше температура стеклования. При этом для денатурированных образцов коллагена, содержащих свободную воду, процесс стеклования не наблюдается, поскольку вода при замерзании образует ледяную матрицу, препятствующую калориметрическому проявлению этого процесса при температурах ниже 0⁰C [27]. А для нативных образцов коллагена скачок теплоёмкости, обусловленный стеклованием, отсутствует при любом содержании связанной воды (коллаген является относительно связанной и организованной системой с ограниченной сегментальной подвижностью). Также показано, что теплоёмкость системы коллаген-вода не может быть рассмотрена по аддитивной схеме, где одной составляющей является теплоёмкость сухого белка, а второй составляющей – теплоёмкость воды.

Наряду с простым делением воды на свободную и связанную, существует также деление связанной воды в коллагене на четыре группы. По мере повышения влажности, сначала появляется незамерзающая вода (около 30 мас.%), затем вода, с ростом содержания которой происходит увеличение энтальпии денатурации коллагена (чем больше в коллагене межфибриллярных сшивок, тем меньше содержание воды данного типа). Затем сорбируется вода, которая уже не изменяет энтальпии денатурации коллагена, но понижает температуру денатурации. Вслед за ней сорбируется вода, не изменяющая каких-либо параметров денатурации коллагена, тем не менее, она всё ещё является незамерзающей. Отмечают, что количество незамерзающей воды в коллагене уменьшается после его денатурации (перехода в желатину) и что увеличение количества поперечных фибриллярных сшивок приводит к уменьшению количества связанной воды и к более сильному её удержанию.

Исследована тепловая денатурация коллагена кожи крыс в фибриллах и водных растворах различной концентрации при разных скоростях нагрева. Обнаружено, что тепловой эффект денатурации в растворах с концентрацией коллагена выше 10% сильно зависит от скорости нагревания: тепловой эффект тем больше, чем выше скорость нагревания. При медленном нагревании энтальпия денатурации H_d минимальна и слабо

зависит от используемой скорости нагревания. В фибриллах коллагена, а также в разбавленных растворах зависимость H_d от скорости нагрева не наблюдается. В этом случае значение H_d (84 ± 8 Дж/г) совпадает со значением, полученным для концентрированных растворов при быстром нагревании. Таким образом, уменьшение значения H_d в концентрированных растворах при уменьшении скорости нагревания является проявлением экзотермического процесса последенатурационной агрегации белка. То есть наблюдаемый тепловой эффект является суперпозицией двух процессов: эндотермический процесс разрушения нативной структуры коллагена со скоростью, задаваемой скоростью нагрева и экзотермический процесс, обусловленный образованием новых случайных связей между молекулами белка после денатурации. Поэтому при быстром нагревании эти два процесса можно разделить (пренебречь вторым процессом). Следует отметить, что величина теплового эффекта денатурации коллагена зависит от степени его очистки, гидратации, типа соединительной ткани, возраста животного и варьируется в интервале 30-85 Дж/г.

При нагревании коллагена в атмосфере азота не происходит никаких значительных изменений вплоть до 240°C . При температуре 240°C начинается полное разложение коллагена (разрушение первичной структуры).

В литературе имеется немного данных о ДСК хрящевой ткани. На термограммах образцов интактного хряща наблюдался эндотермический процесс ($Q \cong 1,5$ Дж/г) в интервале температур $65-78^{\circ}\text{C}$, величина которого уменьшалась до 0,24 Дж/г после облучения эрбиевым волоконным лазером мощностью 3,5 Вт. Из литературных данных известна теплота денатурации коллагена, поэтому с учётом содержания коллагена в хряще, он должен был быть равен 5-14 Дж/г, что гораздо больше, чем 1,5 Дж/г. Исходя из этого, авторы делают вывод, что этот эндотермический процесс не является денатурацией коллагена. Диссоциацией ПГА при температуре около 70°C можно пренебречь, так как это медленный процесс (характерное время около 1 часа при 70°C), а лазерный нагрев происходит быстро (несколько секунд).

1.2.2. Сорбция паров воды биологическими объектами

Изотермами сорбции воды белками и другими биологическими объектами уже давно интересуются многие исследователи [23-28]. Это связано, в том числе, с попытками изучения изменения структуры продуктов при хранении. Сорбция воды биологическими препаратами описывается в рамках широко известной модели полимолекулярной адсорбции Брюнауэра, Эммета и Тэйлера (БЭТ), 1938 год:

$$x(a_w) = \frac{x_{mB} c_B a_w}{(1 - a_w)(1 + (c_B - 1)a_w)}$$

Линеаризованная форма:

$$\frac{a_w}{(1-a_w)x(a_w)} = \frac{1}{c_B x_{mB}} + \left[\frac{c_B - 1}{c_B x_{mB}} \right] a_w$$

где x – кол-во воды на грамм адсорбента; a_w – активность воды (относительная влажность); x_{mB} – кол-во воды, приходящееся на монослой; c_B – константа, связанная логарифмически с разностью химических потенциалов молекулы адсорбата (воды) в толще воды и в первом адсорбционном слое. В работе [23] отмечается, что 1) обызвествлённый коллаген поглощает намного меньше воды, чем коллаген из сухожилий хвоста крысы, различие особенно заметно в интервале относительных влажностей 20-80%; 2) при низкой относительной влажности плёнка реконструированного коллагена имеет тоже водопоглощение, что и коллаген из сухожилий хвоста крысы, но абсорбирует меньше воды, чем последний, при относительной влажности 50%; 3) при 50°C плёнка реконструированного коллагена поглощает меньше воды во всём диапазоне влажностей, а изотерма сходна с изотермой для минерализованного коллагена вблизи значений P/P_0 около 0,5.

Наряду с уравнением БЭТ, в последнее время часто используется уравнение ГАБ (Гуггенгейм, Андерсон и де Бор, 1985 год):

$$x(a_w) = \frac{x_{mG} c_G k a_w}{(1 - k a_w)(1 + (c_G - 1) k a_w)}$$

Линеаризованная форма:

$$\frac{a_w}{(1 - k a_w)x(a_w)} = \frac{1}{c_G k x_{mG}} + \left[\frac{c_G - 1}{c_G x_{mG}} \right] a_w$$

где x – кол-во воды на грамм адсорбента; a_w – активность воды (относительная влажность); x_{mG} – кол-во воды, приходящееся на монослой; c_B , k – константы, связанные логарифмически с разностью химических потенциалов молекулы адсорбата во втором (и последующем) и первом адсорбционных слоях и с разностью химических потенциалов молекулы адсорбата в толще воды и во втором (и последующем) адсорбционном слое.

Как правило, наблюдается следующее отношение между константами, посчитанными по уравнениям БЭТ и ГАБ [24]:

$$x_{mB} < x_{mG}, c_B(\text{БЭТ}) > c_B(\text{ГАБ}), \text{ где } c_B(\text{ГАБ}) = c_G * k$$

Оба уравнения, и БЭТ, и ГАБ, очень тесно связаны, поскольку выводятся из одной и той же статистической модели. Отличие заключается в том, что в модели БЭТ постулируется одинаковое состояние воды во втором и последующих адсорбционных слоях, но отличающееся от состояния молекулы воды в первом адсорбционном слое, а в модели ГАБ предполагается существование второго хорошо дифференцированного

сорбционного состояния. Это допущение вносит дополнительную степень свободы (константа k), благодаря чему область применения этого уравнения увеличивается (10-90% относительной влажности), по сравнению с областью применения уравнения БЭТ (30-40% относительной влажности) [24].

Встречаются также и другие модели, описывающие сорбцию воды [25]:

$$x(a_w) = k \frac{a_w}{1 - a_w}$$

уравнение Озвина (1946 год)

$$a_w = e^{(-k/x(a_w))^n}$$

уравнение Хэлси (1948 год)

Следует отметить, что для разных биологических объектов для обработки изотерм сорбции наилучшим образом могут подходить разные уравнения. Например, для обработки изотерм сорбции воды красным и зелёным перцем лучше всего подходит уравнение Хэлси [25], а для изотерм сорбции воды пищевыми продуктами – уравнение ГАБ [26].

Изотермы сорбции воды различными белками, в том числе коллагеном и желатиной, были получены в работе [24]. Все изотермы были обработаны в рамках модели полимолекулярной адсорбции БЭТ, причём посчитанный исходя из этой модели параметр сорбционной ёмкости монослоя для желатины (денатурированный коллаген) оказался меньше, чем для коллагена (470 моль/10⁵г против 535 моль/10⁵г). Делались попытки провести корреляцию между сорбционной ёмкостью монослоя и количеством полярных групп (исходя из формулы) в адсорбенте [28]. Соответствие между сорбционной ёмкостью монослоя, посчитанной по модели БЭТ и количеством полярных групп было удовлетворительным (табл. 3). Корреляция немного улучшается, если сравнивать число полярных групп с сорбционной ёмкостью монослоя, посчитанной по модели ГАБ [24]. Таким образом, благодаря дополнительному варьируемому параметру, уравнение ГАБ даёт наиболее близкий к истине параметр, характеризующий сорбционную ёмкость монослоя.

Таблица 3. Сравнение количества полярных групп (Pauling) со значениями сорбционной ёмкости монослоя, посчитанной по БЭТ и ГАБ моделям, для различных белков.

Белок	Число полярных групп, моль/10 ⁵ г	сорбционная ёмкость монослоя, моль/10 ⁵ г
-------	--	--

		ВЕТ	GAB
Коллаген	328	535	638
Желатина	—	470	572
Сероальбумин	424	362	419
Яичный белок	313	288	350
Казеин	456	306	343

1.3. Лазерное воздействие на биоткани

1.3.1. Лазеры, использующиеся в медицине

СО₂-лазер: Газовый лазер на молекулах СО₂ был впервые сконструирован в 1964 году. За время своего развития СО₂-лазер нашел множество различных применений в медицинской практике, в том числе косметологии и дерматологии. В качестве лазерной среды для СО₂-лазера применяется смесь гелия, азота и СО₂. Возможна перестройка длины волны в диапазоне примерно 9-11 мкм. СО₂-лазеры бывают непрерывными и импульсными.

ИАГ-эрбиевый лазер: Лазеры этого типа генерируют импульсное излучение длиной волны 2,94 мкм, что соответствует практически центру полосы поглощения воды. Рабочим телом ИАГ:Ег лазера служит искусственный кристалл иттрий-алюминиевого граната, легированный ионами Ег³⁺. Характерная длительность импульса ИАГ:Ег лазера составляет примерно 300 мкс. Частота следования лазерных импульсов обычно составляет 1-3 Гц и только у лучших образцов достигает 20 Гц. Максимальная энергия излучения в одном импульсе ИАГ:Ег лазера равна 1-2 Дж. Характер действия излучения ИАГ:Ег лазера на биологические ткани исключительно абляционный (испарение ткани). В основном это связано с тем, что коэффициент поглощения излучения эрбиевого лазера в воде на длине волны 2,94 мкм составляет примерно 10⁴ см⁻¹. Это почти в 10 раз больше, чем в случае СО₂-лазера. Таким образом, излучение ИАГ:Ег лазера проникает в глубь ткани лишь на несколько микрометров. Поскольку вся его энергия поглощается в очень тонком приповерхностном слое, этот слой быстро перегревается до высокой температуры, при которой происходит его абляция. В сравнении с СО₂-лазером толщина удаляемого за импульс слоя ткани оказывается существенно меньше. При необходимости деликатной обработки поверхности ткани, это качество может оказаться решающим.

В последние несколько лет в офтальмологии активно используют эксимерные лазеры, излучающие в УФ диапазоне. Механизм их воздействия, как правило, абляционный, благодаря кратковременности излучаемых ими импульсов, вся энергия переходит в испарение клеток, а близлежащие области получают минимальные термические повреждения.

Следует отметить, что при проведении локальных операций способ нагрева ткани может быть любым, главное чтобы он был быстрым и локальным. Например, можно также проводить нагрев ткани, используя СВЧ-излучение, оно экономично и очень безопасно.

1.3.2. Взаимодействие лазерного излучения с биологическими тканями

1.3.2.1. Распределение энергии при лазерном облучении биотканей

В последнее время в англоязычной научной литературе по лазерной медицине широко стал применяться термин “lasing” или, по-русски, “лазерное облучение”. Цель лазерного облучения – ввести энергию излучения в локальный объем ткани и стимулировать в нем требуемые фотохимические или тепловые процессы, дающие благоприятный медицинский эффект. Очевидно, что чем большая доля энергии излучения поглощается в выделенном объеме ткани, тем совершеннее лазерная медицинская процедура. Для решения задачи целевой доставки энергии к локальному объему ткани во многих случаях лазерное излучение не имеет альтернативы. Однако следует учитывать, что значительная часть энергии света отражается, рассеивается, или проходит сквозь целевой участок ткани. На рисунке 1 схематично изображены процессы перераспределения световой энергии падающего луча. При попадании излучения на поверхность ткани примерно 4% энергии излучения зеркально отражается согласно закону Френеля. Оставшаяся часть излучения преломляется на шероховатостях поверхности и распространяется в конусе, который расширяется по мере прохождения луча к цели. Поскольку биологическая ткань обычно является оптически неоднородной, то излучение претерпевает множество актов рассеяния, при которых фотон меняет свое направление, не теряя энергию. Из-за актов рассеяния фотоны случайно блуждают в объеме биоткани, или, другими словами, диффузно рассеиваются.

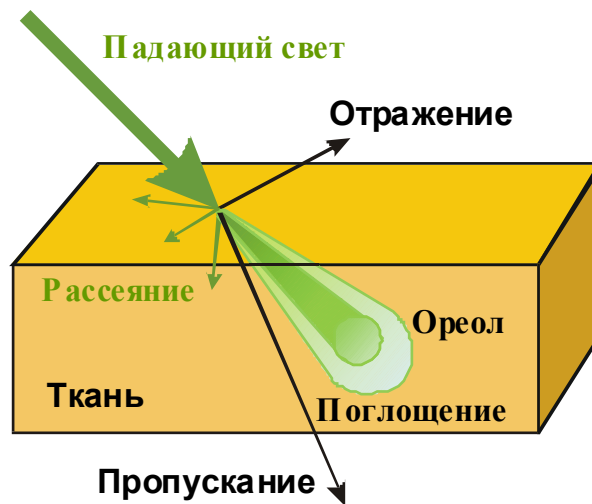


Рисунок 1. Распространение света при облучении биологических тканей.

Некоторые фотоны после многократного рассеяния выходят обратно из ткани под случайными углами. Это так называемый диффузно отраженный свет. Он спектрально зависим. Доля энергии диффузно отраженного света может достигать 30-40% от энергии падающего луча.

Рассеянные фотоны постепенно удаляются от оси пучка, но в среднем они сохраняют ее направление и формируют ореол вокруг конуса основного пучка. Размер этого ореола и доля энергии, которая в нем содержится, в значительной степени зависят от оптических свойств биоткани и от поперечного диаметра пучка света. Чем меньше диаметр пучка, тем большая доля фотонов будет в ореоле. Таким образом, эффективность лазерного облучения зависит не только от оптических параметров ткани, но и от геометрических размеров лазерного пучка. Формирование конуса излучения и ореола может оказаться существенным лишь при селективном воздействии на объекты, расположенные в глубине ткани. При воздействии на поверхностный слой ткани широким пучком света роль этого эффекта незначительна.

Наиболее важным процессом, в результате которого энергия лазерного излучения передается от лазерного луча в ткань, является поглощение. Оно происходит при возбуждении электронных, колебательных и вращательных состояний хромофоров, то есть, поглощающих молекул, входящих в состав биологической ткани. После быстрой релаксации энергия возбужденных хромофоров трансформируется в тепло. Эффективность поглощения фотонов зависит от длины волны и определяется спектром поглощения ткани. Спектр характеризует зависимость коэффициента поглощения от длины волны излучения. Чем больше коэффициент поглощения, тем быстрее происходит ослабление интенсивности лазерного луча, и, следовательно, уменьшается глубина проникновения света в вещество. Под глубиной проникновения принято считать расстояние от поверхности образца, при котором интенсивность лазерного луча

уменьшается в e раз. Глубина проникновения в рассеивающей среде (которой является большинство биологических тканей) зависит как от коэффициента поглощения, так и от коэффициента рассеяния.

1.3.2.2. Фотохимическое воздействие

Лазерный луч с достаточно большой энергией фотонов (например, в ультрафиолетовой области спектра) может инициировать в биологических тканях цепь химических превращений, которые способны стимулировать как позитивные, так и негативные отклики организма. При этом не требуется сколько-нибудь значительного термического разогрева, поскольку эти превращения инициируются путем прямой фотоионизации, фотодиссоциации или фотоизомеризации компонентов биоткани. К негативным явлениям обычно относят неуправляемое генерирование свободных радикалов. Полагают, что они могут оказывать мутагенное и канцерогенное действие, поскольку вполне вероятно, что химически активные свободные радикалы могут разрушать или изменять ДНК и РНК клеток. В работе экспериментально показано, что УФ излучение ArF эксимерного лазера ($\lambda=193$ нм) индуцирует свободные радикалы в роговице глаза. В работе методом ЭПР доказано существование свободных радикалов в твердых биологических тканях (кость, хрящ) и их компонентах (коллаген, хондроитинсульфат) при воздействии УФ излучения эксимерных KrF ($\lambda=248$ нм) и XeCl ($\lambda=308$ нм) лазеров. Фотоны ультрафиолетового излучения, очевидно, обладают достаточной энергией для возбуждения молекул в высокие энергетические состояния, которые имеют каналы отрыва электрона или разрыва химических связей. Однако энергия фотонов видимого и тем более ИК диапазонов спектра чаще всего недостаточна для осуществления подобных процессов. В той же работе при исследовании воздействия ИК волоконного эрбиевого лазера ($\lambda=1,56$ мкм) на хрящевую ткань показано отсутствие радикалов.

Поскольку эксимерные лазеры излучают в УФ спектральном диапазоне и могут вызывать фотохимические реакции в коже и других тканях с нежелательными побочными действиями, они пока практически не применяются в косметологии и дерматологии. В то же время, они активно используются в пластике роговицы и хрусталика глаза для коррекции зрения, несмотря на возможные непредсказуемые осложнения.

1.3.3. Реакция биотканей на тепловое воздействие

Тепловое воздействие лазерного излучения на биоткани основывается на поглощении излучения и преобразовании его энергии в тепло. Эффект зависит как от

температуры, так и от длительности воздействия. В таблице 5 приведена классификация реакций биоткани на её нагрев в зависимости от температуры.

Таблица 4. Лазерное воздействие на биоткань в зависимости от температуры:

Температура, °С	Реакция биоткани
37	нет изменений
40-45	активация ферментов, образование отеков, изменение мембран и в зависимости от времени, воздействия смерть клеток
60	денатурация белков, начало коагуляции и некрозы
80	денатурация коллагена, дефекты мембраны
100	обезвоживание
свыше 150	обугливание
300>	Выпаривание, газообразование

При температуре до 45°C не ожидается каких-либо необратимых повреждений ткани (лишь при достаточно длительном нагреве может произойти гибель клеток). Прогрев тканей до температуры 42-45°C в медицинской практике используется при стимулирующей локальной термотерапии. При температуре около 60°C достаточно быстро наступает денатурация белков. Она может быть полной и частичной, обратимой и необратимой. Во многом степень денатурации белков зависит от времени воздействия. Процесс денатурации можно рассматривать как мономолекулярную химическую реакцию, константа скорости которой зависит от температуры по закону Аррениуса, и как фазовый переход первого рода (см. ДСК калориметрия, обзор). При известных параметрах уравнения Аррениуса и временной динамике температуры $T(t)$ можно оценить долю белка, который денатурирует в процессе лазерного воздействия на биоткань. Однако следует помнить, что скорость денатурации для различных белковых структур может сильно отличаться друг от друга. Так, быстрая денатурация нативных волокон коллагена, благодаря многоуровневой организации, происходит лишь при температуре около 80°C. В реальных условиях критическая температура начала денатурации большинства тканевых компонент составляет около 55°C.

Заметное обезвоживание биологических тканей, начинается при температуре около 70°C. При достижении температуры кипения воды происходит обезвоживание ткани,

поскольку внутритканевая вода превращается в пар, при этом создается значительное избыточное давление. При медленном нагреве образующийся пар успевает выйти из объема биоткани через множество пор, которые в ней обычно имеются, или образуются под напором пара и в результате термической деструкции матрикса. Такой процесс называют фотовыпариванием. Скорость нагрева ткани вблизи 100°C существенно уменьшается из-за значительных затрат энергии на парообразования. После ухода воды высушенная ткань быстро нагревается до температуры 150°C, при которой начинается процесс карбонизации. При карбонизации из органических молекул выходит водород и образуется мелкодисперсный углерод (сажа), то есть происходит обугливание. При температуре выше 300°C испаряется органический матрикс ткани.

1.3.3.1. Низкоинтенсивное лазерное воздействие

Обработка тканей и органов в режиме низкоинтенсивного лазерного воздействия не приводит к каким либо существенным изменениям структуры тканей, поскольку температура в ходе такой процедуры повышается на несколько градусов. Такое повышение температуры приводит к стимуляции клеточной деятельности и репарационных процессов. Авторы отмечают уменьшение воспалительных процессов в коленном хряще свиней после низкоинтенсивной обработки He-Ne лазером. Гистологические исследования показали, что после лазерного воздействия происходит замена повреждённого коллагена новым и образование хрящевых мостиков, на месте повреждённого хряща.

1.3.3.2. Субабляционное лазерное воздействие на биоткани

Режим лазерной обработки ткани, при котором доза лазерного излучения ниже порога абляции, называется субабляционным. Субабляционное лазерное воздействие на биоткани отличается от низкоинтенсивного лазерного воздействия тем, что в ней средняя температура биоткани повышается на несколько десятков градусов. В субабляционном режиме осуществляются такие лазерные процедуры как термотерапия (43-60°C), гипертермия (60-100°C), остановка кровотечения (60-150°C), термопластика хрящей и коллагенсодержащих тканей (65-75°C). В пластической хирургии субабляционный режим используют для лазерной сшивки (прижимают 2 части ткани и греют) и сварки (между сшиваемых тканей находится белковая прокладка) повреждённых хрящевых и других коллагенсодержащих тканей. При этом температура должна находиться в диапазоне 60-80°C. Это достигается применением лазеров умеренной мощности, сравнительно большими интервалами между экспозициями, достаточными для предотвращения аккумуляции тепла и перегрева места будущего сварного шва, нанесением красителей

(«припоев»), поглощающих излучение, на поверхность места сварки с целью снижения термических повреждений в глубоких слоях облучаемой ткани. Лазерную сварку применяют и для сшивания мелких и среднего калибра кровеносных сосудов, пересеченных нервных стволов, соединения стенок полых органов.

Сравнительно новая технология изменения формы хрящей с помощью лазерной обработки также осуществляется в субабляционном режиме. Эта технология уже успешно используется в клинике для коррекции формы носовой перегородки. Она открывает широкие перспективы для осуществления принципиально новых типов операций в пластической и эстетической хирургии с применением лазерного излучения. Метод основан на эффекте релаксации внутренних механических напряжений хрящевых тканей при нагреве до температуры примерно 65-75°C. При этом хрящ устойчиво сохраняет новую форму. С помощью лазерного излучения прогрев хрящевой ткани можно осуществить во всем объеме за время, в течение которого не успеют произойти существенные разрушения матрикса, а клетки сохраняют свою жизнеспособность, и в то же время успевают произойти процессы, изменяющие физико-химические свойства хрящей.

В температурном диапазоне 60-80°C (зависит от типа соединительной ткани) происходит денатурация коллагеновых фибрилл, которые входят в состав соединительных тканей и определяют многие их свойства. Различают два типа денатурации: термическая и термомеханическая (при длительной экспозиции и температуре выше 100°C возникают градиенты давления). Коллагеновые фибриллы претерпевают превращение: высокоорганизованное полукристаллическое состояние → статистический клубок, описывающееся как фазовый переход первого рода. При этом наблюдается сокращение коллагенсодержащей ткани, её усадка. Величина усадки зависит как от температуры, так и от времени экспозиции, причём наблюдается эффект температурно-временной суперпозиции. Максимальная усадка (50%) наблюдалась при облучении Но: YAG – лазером (65°C и время экспозиции ≥ 1 минута). При нагреве коллагенсодержащей ткани (КСТ) до температуры денатурации коллагена, происходит изменение ультраструктуры коллагеновых волокон. Авторы на основе морфологических исследований отмечают три зоны изменения коллагеновых фибрилл (дерма и связки) при обработке импульсным CO₂-лазером:

- 1) потеря волоконной структуры коллагена (денатурация)
- 2) смешанные места с нативными и увеличившимися в диаметре коллагеновыми фибриллами
- 3) нормальная коллагеновая структура

А при облучении Но: YAG лазером с ростом мощности коллаген претерпевает следующие изменения [68]:

- 1) 5 Вт – исчезновение поперечной исчерченности коллагеновых фибрилл
- 2) 10 Вт – тоже + нечёткое очертание краёв фибрилл
- 3) 15 Вт – увеличение диаметра фибрилл и полная потеря очертания фибрилл

Такие же изменения были отмечены в работе при облучении КСТ Nd: YAG лазером.

Следует заметить, что температура, при которой происходит усадка коллагена, растёт с увеличением содержания в нём аминокислот пролина и гидроксипролина. Временное сокращение коллагеновых волокон стимулирует регенерацию ткани. Этот процесс активно исследуется в связи с возможным его применением при пластике кожи, фасции и других тканей, содержащих коллаген.

1.3.3.3. Абляционное лазерное воздействие на биоткани

При достаточно высокой интенсивности лазерного излучения органические компоненты биоткани механически разрушаются под действием импульса давления, создаваемого паром и распадаются на атомы и молекулы под действием высокой температуры (пиролиз). Биоткань превращается в газообразный поток атомов, молекул и мелкодисперсных частиц, исходящий из зоны воздействия хирургического лазера. Описанный процесс называется лазерной абляцией биологической ткани. Его основной признак – это ликвидация ткани непосредственно под действием фотонов лазерного излучения. Импульсная абляция характеризуется пороговой плотностью энергии за один импульс. Абляция непрерывным излучением зависит от мощности излучения при заданном диаметре лазерного пучка и характеризуется временем достижения критических условий. В этом случае абляция ткани под действием лазерного луча наступает лишь на последних этапах взаимодействия излучения с объектом и является результатом кумулятивного фототермического эффекта, при котором накопление тепла в объекте происходит быстрее его рассеяния из зоны облучения. Следует отличать абляцию биотканей импульсным излучением, при которой испарение всех компонент происходит за время короткого лазерного импульса, и абляцию биотканей сфокусированным лучом непрерывного излучения лазера. При импульсной абляции вместе с перегретым материалом из ткани удаляется и большая часть тепловой энергии, а ее незначительный остаток приводит к минимальным термическим повреждениям за пределами абляционного кратера. Например, изменения в хрящевой ткани при воздействии импульсного CO₂-лазера, интенсивность которого более чем в 20 раз превышала пороговое значение (50 Вт/см²), необходимое для лазерного изменения формы хрящей

выглядят следующим образом (по мере убывания интенсивности излучения и удалении от облучаемой поверхности:

- 1) обугливание хрящевой ткани;
- 2) коагуляционный некроз, сопровождающийся полным разрушением; хондроцитов и термической деструкцией матрикса;
- 3) спекание и значительная деформация хондроцитов, выпаривание тканевой жидкости и нарушение упорядоченной структуры матрикса;
- 4) повреждение оболочки и незначительная деформация хондроцитов, изменение тонкой структуры протеогликанов, незначительные изменения внутренней структуры хондроцитов без заметного изменения матрикса.

В монографии Неворотина (2000) выделено четыре основных механизма абляции биотканей. Первый механизм соответствует низкому уровню поглощения в основном компоненте мягких тканей – воде при незначительном его поглощении в остальных тканевых компонентах (ИАГ: Nd лазер, $\lambda=1,064$ мкм) или сильном поглощении лишь в отдельных из них (аргоновый и аналогичные лазеры, работающие в видимой области спектра). Действие второго механизма характерно для CO₂-лазеров или ИАГ: Er лазер, излучение которых интенсивно поглощается молекулами тканевой воды. Для таких лазеров имеет место быстрый разогрев воды, а от нее и неводных компонентов ткани. Третий механизм работает при абляции твердых тканей (кость, дентин). Его характерной чертой является значительное поглощение не только тканевой водой, но и минеральной компонентой. В основе четвертого механизма лежит фотохимическая деструкция органических молекул биоткани, которая происходит под действием интенсивного лазерного излучения ультрафиолетового диапазона. В пластической хирургии находят применение лишь первый и второй механизмы абляции биотканей.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы

Исходными материалами служили гиалиновый хрящ носовой. Ткани были изъяты у поросят в возрасте 6 месяцев. Хрящевая ткань очищалась от надкостницы и рыхлой соединительной ткани. Все ткани хранились в холодильнике при температуре 4°C.

Из соединительных тканей нарезались образцы толщиной 1-2 мм и диаметром 10 мм.

2.2 Облучение тканей

Для лазерной обработки образцов тканей использовали излучение Er-Glass волоконного ИК лазера ЛС-1,56-5 (“ИРЭ-Полус”, Россия), $\lambda = 1,56$ мкм и излучение волоконного ИК лазера Nd-YAG ($\lambda=1.32$ мкм), $\lambda = 1,32$ мкм.

Схема экспериментальной установки представлена на рисунке 2. Излучение лазера с помощью световода подавалось под углом 45° на образцы, закрепленные вертикально в специальном держателе. Расстояние между торцом световода и поверхностью образца составляло 8 мм. Диаметр облучаемой зоны составлял 6 мм. Время лазерного воздействия составляло 10-15 секунд, что соответствует типичному времени облучения при лазерной коррекции формы деформированных хрящей.

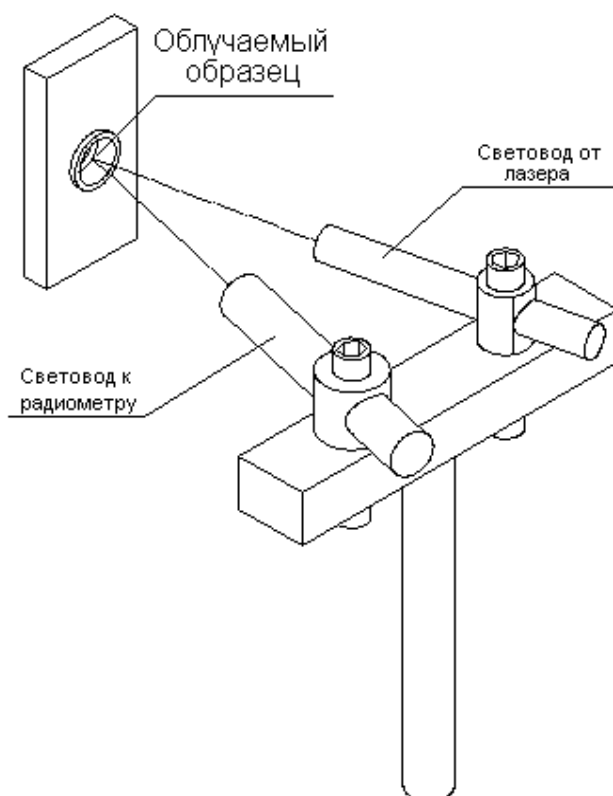


Рисунок 2. Схема экспериментальной установки для облучения образцов тканей.

2.3 Радиометрический контроль температуры

Контроль температур осуществляли дистанционным методом ИК радиометрии. ИК отклик от нагреваемых образцов собирали с области диаметром 1.5 – 2 мм при помощи световода (AgI/AgBr, диаметр 0.7 мм), закрепленного под углом 45° по отношению к облучаемой поверхности образца на расстоянии 5 мм (рис. 14).

Сигнал ИК эмиссии подавался на оригинальный прибор, непрерывный ИК радиометр, оцифровывался и обрабатывался специальной программой. Этот прибор состоит из ИК световода, CdHgTe детектора, предусилителя и системы светофильтров, выделяющих из всего спектра ИК эмиссии образца узкую полосу в специально подобранном диапазоне частот, где наблюдается практически линейная зависимость плотности интенсивности ИК эмиссии от температуры определяемых объектов в интервале от 20°C до 80°C. Реализация подобного принципа требует калибровки прибора перед проведением измерений.

Калибровку сигнала производили по ИК излучению воды при температурах 8-69°C, определяемых при помощи ртутного термометра. В качестве эталонного вещества была выбрана вода по той причине, что коэффициент рассеяния ИК излучения чистой водой, а также коэффициент отражения ИК излучения непосредственно от поверхности раздела вода – воздух в интересующем нас диапазоне частот пренебрежимо малы. Характерный вид калибровочной кривой представлен на рисунке 3.

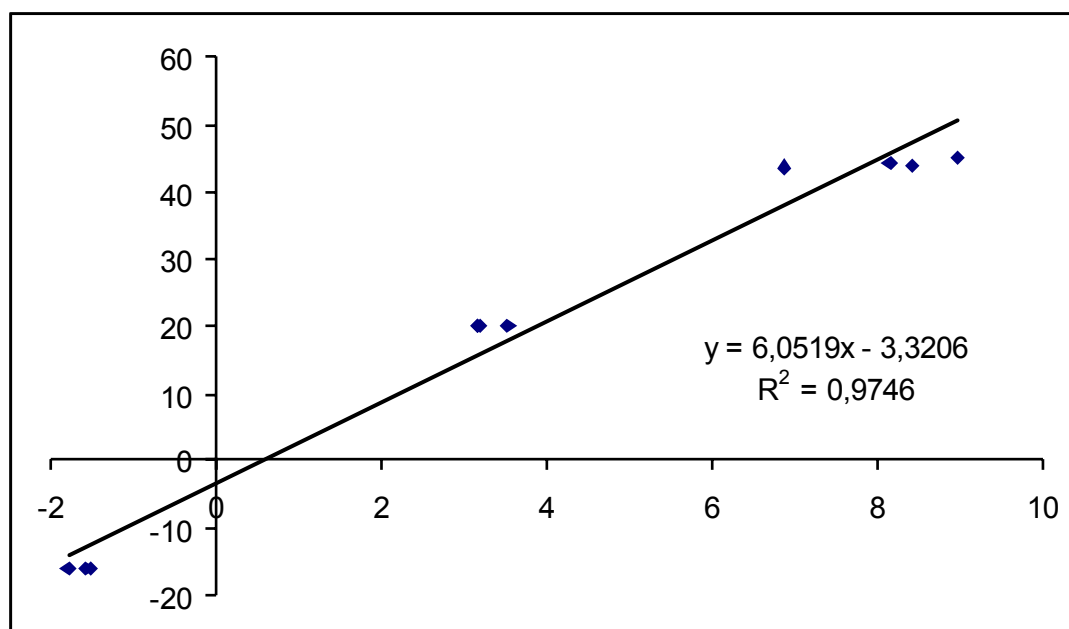


Рисунок 3. Калибровочная кривая радиометра.

2.4 Изотермы сорбции

Сорбционные свойства изучали на препаратах, высушенных в эксикаторе с P_2O_5 в течение 48 часов. Остаточное содержание воды в таких образцах не превышает 1%. Затем

образцы тканей помещали на 48 часа в эксикаторы с заданной влажностью (растворы неорганических солей и щелочи). Количество сорбированной воды определялось гравиметрическим методом с точностью до 0,0001 г на электронных весах Sartorius. Отметим, что, выдерживание образцов в эксикаторах в течение 48 часов оказалось достаточным для достижения адсорбционного равновесия, и увеличение времени выдерживания в эксикаторах не приводило к увеличению массы образцов.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Облучение препаратов ИК лазером различной мощности приводило к заметным видимым изменениям (потемнение образца и незначительное изменение формы хрящей)

На рисунках 4-7 приведена динамика нагрева препаратов хрящевой ткани при разных режимах облучения.

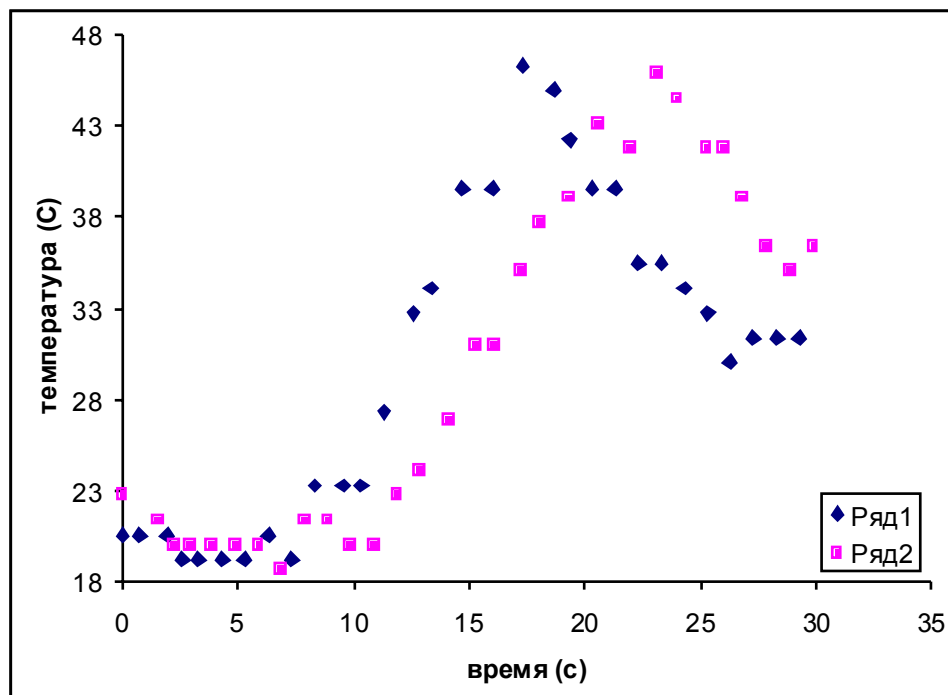


рисунок 4

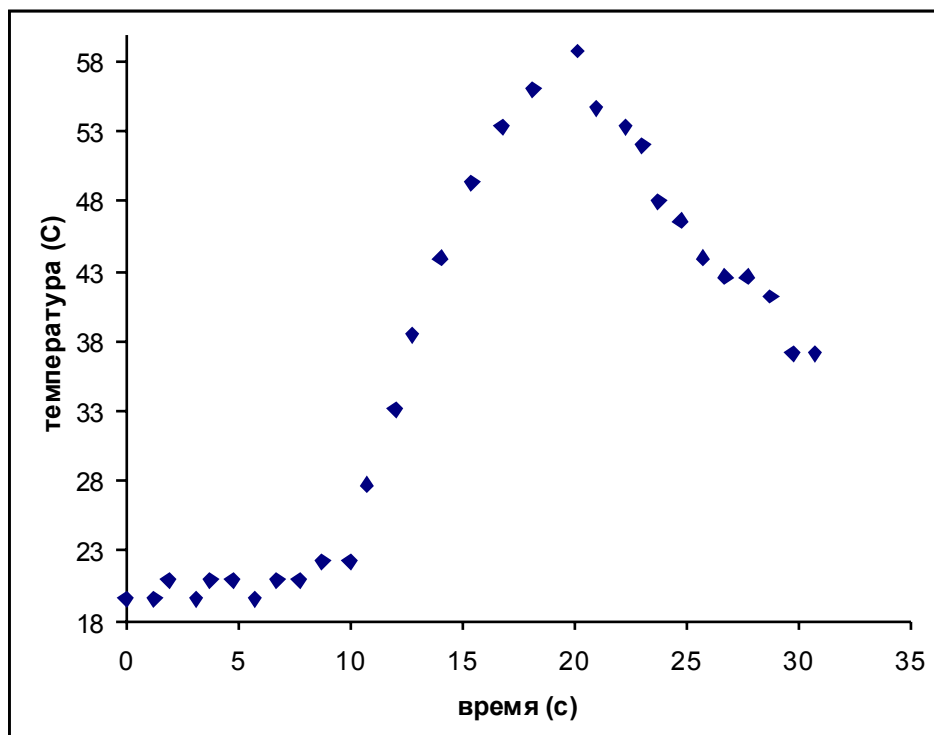


рисунок 5

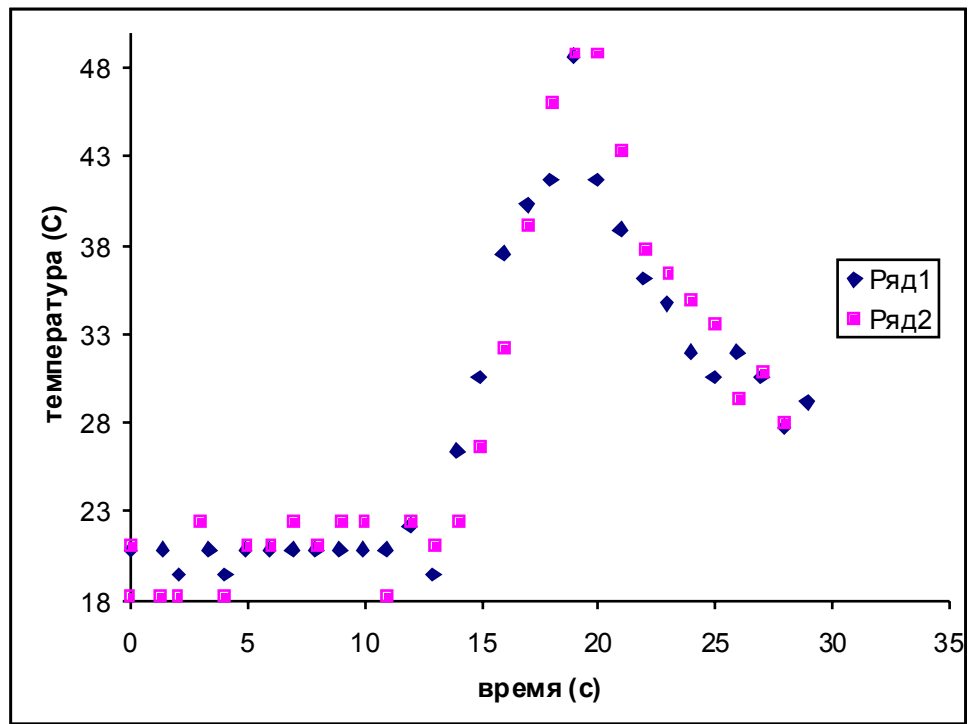


рисунок 6

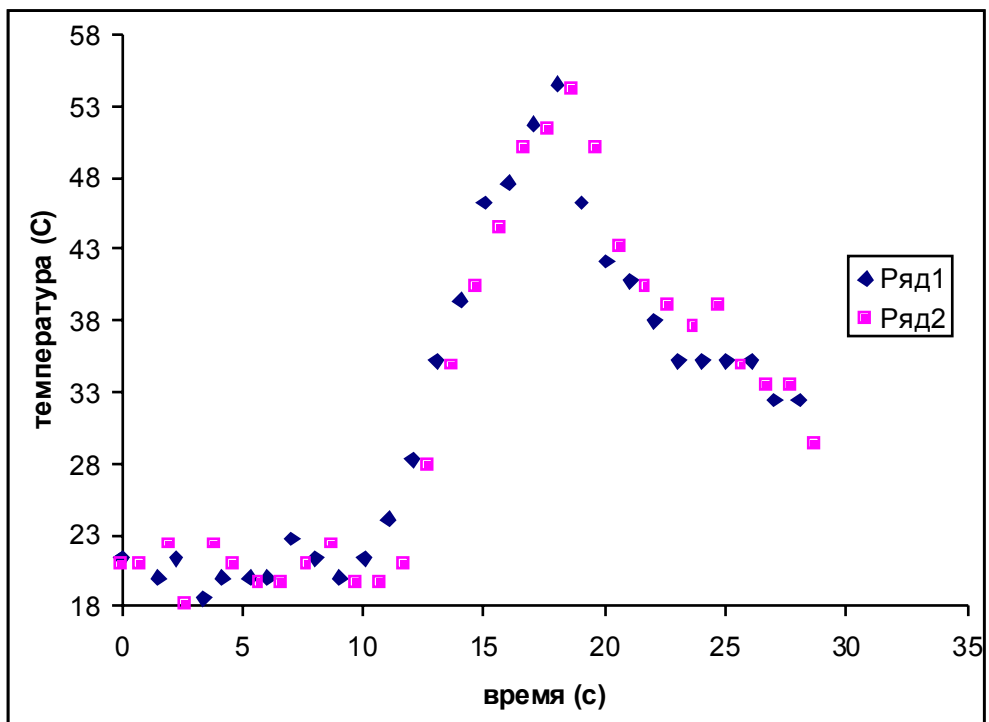


рисунок 7

Данные по максимально достигнутой температуре приведены в таблице 5.

T_{\max} (°C)	Тип лазера
46,2	Nd-YAG ($\lambda=1.32 \mu\text{m}$)
58,7	Nd-YAG ($\lambda=1.32 \mu\text{m}$)
48,7	Er-fiber ($\lambda=1.56 \mu\text{m}$)
54,5	Er-fiber ($\lambda=1.56 \mu\text{m}$)

Таблица 5

Для оценки влияния лазерного излучения на изменение взаимодействия коллаген-вода были получены изотермы сорбции воды препаратами хрящевой ткани (рис 8) Поглощение воды образцами тканей после облучения.

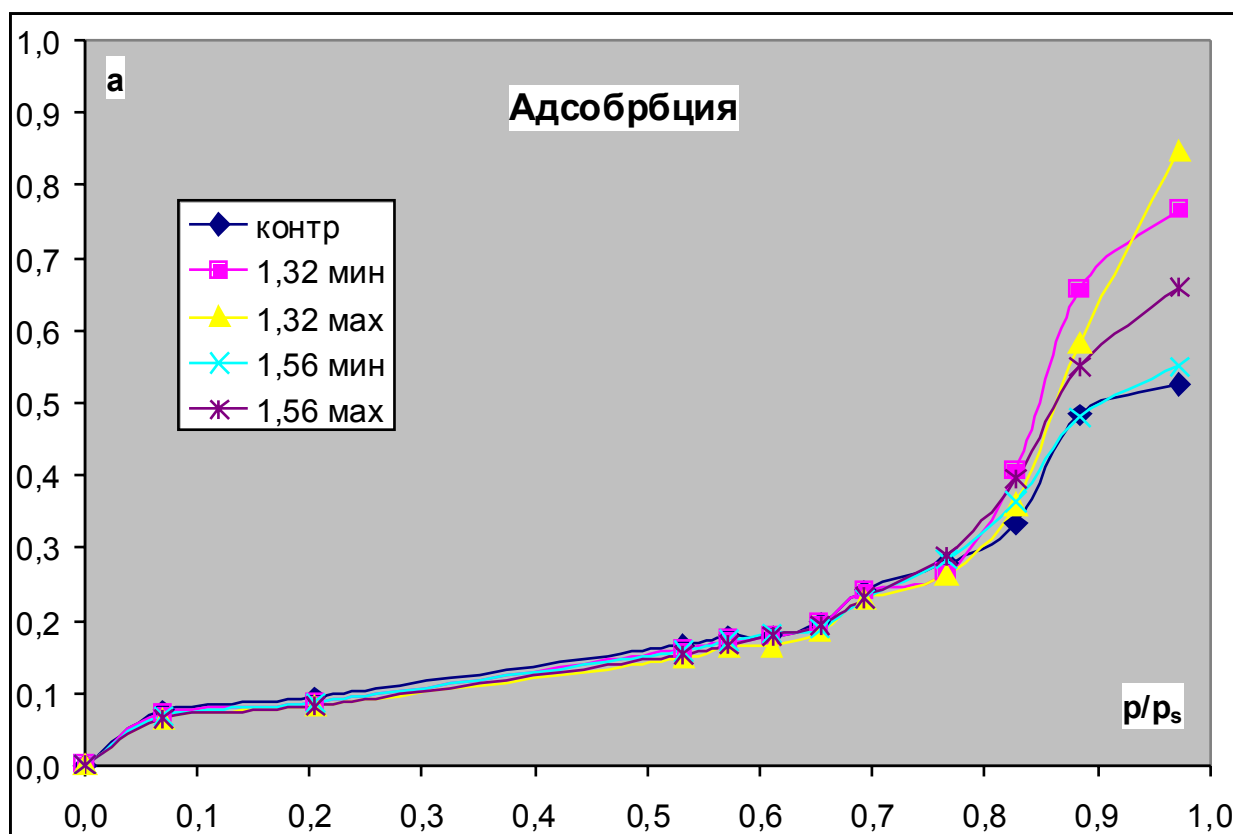


Рисунок 8. Изотерма сорбции паров воды хрящом

Полученные изотермы адсорбции были обработаны на основе модели полимолекулярной адсорбции БЭТ (Brunauer, Emmett, Teller) (рис 9).

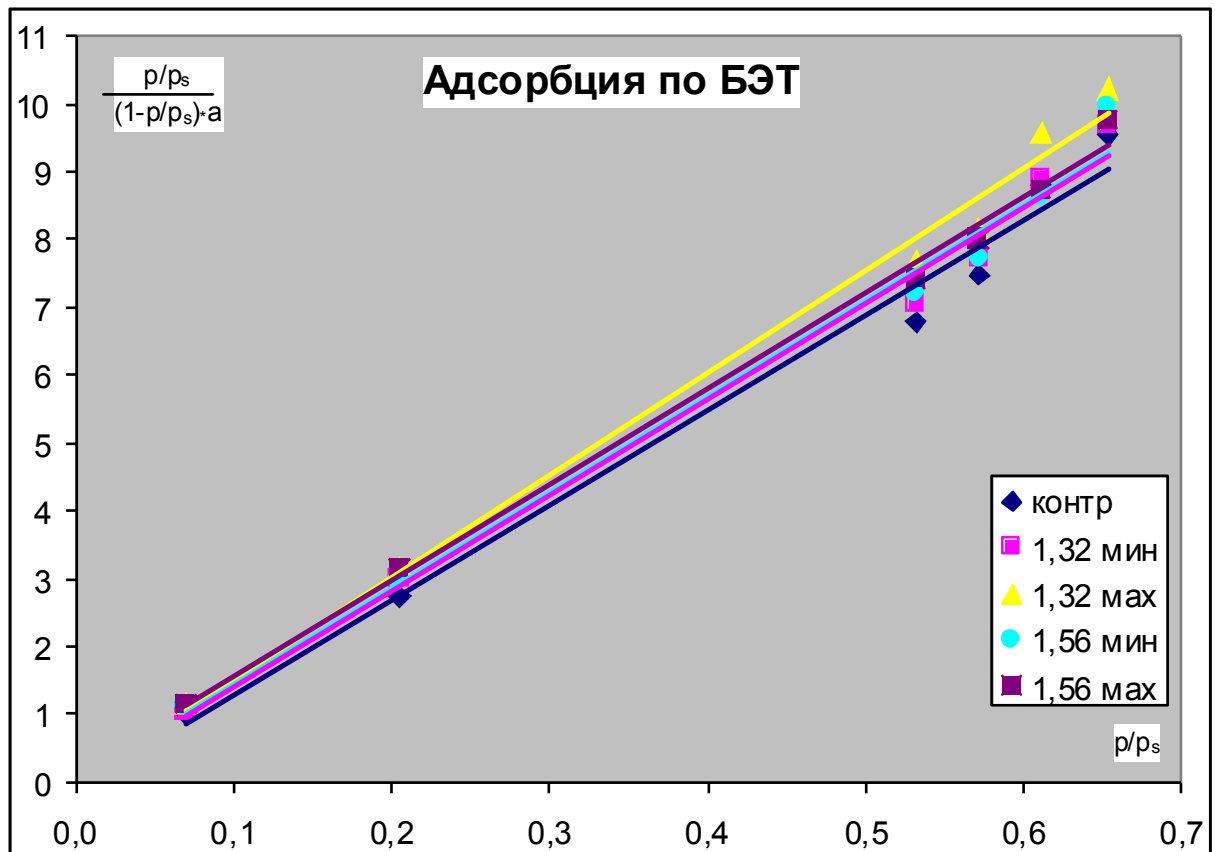


рисунок 9

Это позволило получить характерный параметр модели X_m — емкость монослоя (табл 6).

$T_{\max} (^{\circ}\text{C})$	$\tau_{\text{обл}}(\text{сек})$	$X_m (\text{г}^{\text{ВОДЫ}}/\text{г} \text{сухого хряща})$	Тип лазера
—	Не облучался	0,0717	Не облучался
46,2	16	0,0705	Nd-YAG ($\lambda=1.32 \mu\text{m}$)
58,7	16	0,0662	Nd-YAG ($\lambda=1.32 \mu\text{m}$)
48,7	13	0,0702	Er-fiber ($\lambda=1.56 \mu\text{m}$)
54,5	13	0,0699	Er-fiber ($\lambda=1.56 \mu\text{m}$)

Таблица 6

Облучение лазером небольшой мощности (нагрев до 55°C) не приводит к существенному изменению коллагена. Данный вывод был сделан на основе постоянства емкости монослоя X_m . При увеличении температуры обработки X_m незначительно уменьшается. Полученные нами величины X_m коррелируют с результатами других исследователей, свидетельствующих об уменьшении сорбционной способности коллагена после денатурации (для коллагена $X_{mB}=0,096$) [29, 30]

Очевидно, что после облучения число адсорбционных центров падает. Это связано с разрушением упорядоченной организации матрикса хрящевой ткани. Наблюдаемую же при высокой влажности повышенную сорбцию воды на образцах можно объяснить объемной сорбцией, которая протекает в полостях внутри белка, образовавшихся при его денатурации.

4 ВЫВОДЫ

1. Были определены сорбционные емкости препаратов хряща X_m облученных в различных режимах
2. Лазерная обработка до температур ниже 55°C не приводит к заметному изменению числа адсорбционных центров
3. При превышении температуры 55°C число первичных адсорбционных центров уменьшается, что связано с разрушением упорядоченной организации матрикса хрящевой ткани
4. При повышенной влажности наблюдалась повышенная сорбция, которая, возможно, объяснить объемной сорбцией

5 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Bruckner, Van der Rest, 1994, *Microscopy Research and Technique*, **28**, 378-384.
2. В.Н. Павлова, Т.П. Копьева, Л.И. Слущкий, Г.Г. Павлов, 1988, *Хрящ*, (М.: Наука).
3. W.D. Comper, 1991, *Cartilage: Molecular Aspects*, (Boston-London: CRC Press,).
4. N.P. Cohen, A.J. Foster, V.C. Mow, 1998, *JOSPT*, **28**, 203 – 215.
A. Maroudas, 1979, *Adult Articular Cartilage*, (London: Pitman Publishing Ltd.).
5. W.Y. Gu, W.M. Lai, V.C. Mow, 1993, *J. Biomechanics*, **26**, 709.
6. A. Maroudas, R. Schneiderman, 1987, *Journal of Orthopedic Research*, **5**, 133-138.
7. L. Svensson, I. Narlid, A. Oldberg, 2000, *FEBS Letters*, **470**, 178-182.
8. P. Sini, A. Denti, M.E. Tira, C. Balduini, 1997, *Glycoconjugate Journal*, **14**, 871-874.
9. P.D. Yurchenco, D. Birk, R.P. Mecham, 1994, *Extracellular Matrix Assembly and Structure*, (California: Acad. Press. Inc).
10. P.J. Roughley, E.R. Lee, 1994, *Microscopy research and technique*, **28**, 385-397.
11. D.F. Holmes, C.J. Gilpin, 2001, *PNAS*, **98(13)**, 7307-7312.
12. Г.И. Церетели, Т.В. Белопольская, 1997, *Биофизика*, **42(1)**, 68-74.
13. P.J. Flory, R.R. Garrett, 1958, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4836–4845.
14. P.L. Privalov, 1979, *Adv. Protein Chem*, **33**, 167.
15. Ю.К. Годовский, 1976, *Теплофизические методы исследования полимеров*, (М: Наука), 215.
16. Г.И. Церетели, О.И. Смирнова, 1990, *Биофизика*, **35(2)**, 217-220.
17. Г.И. Церетели, О.И. Смирнова, 1991, *Высокомолекулярные соединения*, **33(А)**, 2250.
18. Г.И. Церетели, Т.В. Белопольская, 1997, *Биофизика*, **42(3)**, 584-590.
19. J. Kopp, M. Bonnet, J.P. Renou, 1989, *Matrix*, **9**, 443-450.
20. Г.И. Церетели, 1982, *Биофизика*, **27(5)**, 780-784.
21. Т.В. Бурджанадзе, Н.О. Метревели, 1997, *Биофизика*, **42(1)**, 75-77.
22. W. Friess, G. Lee, 1996 *Biomaterials*, **17**, 2289-2294.
23. М. Эскубе, М. Пинери, *Сравнение изменений массы и энергии при сорбции воды коллагеном и кератином*.
24. E.O. Timmermann, J. Chirife, H.A. Iglesias, 2001, *Journal of Food Engineering*, **48**, 19-31.
25. F. Kaymak-Ertekin, M. Sultanoglu, 2001, *Journal of Food Engineering*, **47**, 225-231.
26. D. Simatos, J.L. Multon, 1985, *Properties of Water in Foods*, (Dordrecht: Martinus Nijhoff), 119.
27. A.M. Bianco, G. Boente, M.L. Pollio, S.L. Resnik, 2001, *Journal of Food Engineering*, **47**, 327-331.
28. L. Pauling, 1945, *Journal of the American Chemical Society*, **67**, 555-557.
29. Timmermann, E. O., 1989, *J. Chem. Soc. Faraday Transactions I*, **85**, 1631
30. Timmermann, E. O., Chirife, J., Iglesias, H. A., 2001, *Journal of Food Engineering*, **48**, 19