

Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

На правах рукописи



Минаева Екатерина Дмитриевна

**Лазерно-индуцированное формирование биосовместимых конструкций
из полимерных материалов и лазерная биопечать клеточными
агрегатами для тканевой инженерии**

Специальность 1.3.19 – Лазерная физика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2024

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

Научный руководитель:

Минаев Никита Владимирович

к.ф.-м.н., заведующий лабораторией Лазерной наноинженерии Института фотонных технологий Курчатовского комплекса Кристаллография и Фотоника (ИФТ КККиФ)

Официальные оппоненты:

Зимняков Дмитрий Александрович

д.ф.-м.н., профессор, заведующий кафедрой «Физика», Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный технический университет им. Гагарина Ю.А.»

Бармина Екатерина Владимировна

д.ф.-м.н., заместитель директора по науке, Научный центр волновых исследований (филиал) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук»

Залесский Александр Дмитриевич

к.ф.-м.н., старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук

Защита состоится « 9 » октября 2024 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета МИФИ.1.01 федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (115409, г. Москва, Каширское шоссе, 31).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <http://ds.mephi.ru> федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ».

Автореферат разослан « » 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
МИФИ.1.01, к.ф.-м.н.



/Степаненко А.А./

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Лазерные технологии представляют собой уникальное сочетание точности и регуляции режимов воздействия, которое широко используется в различных областях науки и техники, включая регенеративную медицину. Тканевая инженерия – подход в регенеративной медицине по восстановлению поврежденных или утраченных фрагментов тканей или органов, альтернативный трансплантации [1]. В настоящее время применение лазерных технологий представляет интерес для формирования биосовместимых конструкций (каркасов, скаффолдов) [2] и последующего заселения их живым клеточным материалом [3,4] при создании будущих тканевых эквивалентов. Возможности лазерной техники как прецизионного инструмента позволили реализовать режим локального воздействия, что является важным условием при формировании и заселения биосовместимых конструкций.

Технологии аддитивного производства, основанные на послойном формировании по компьютерной модели, могут быть использованы для создания медицинских изделий и их прототипов, имплантов, капсул для лекарственных препаратов, а также для изготовления искусственных биосовместимых конструкций [5]. Современные лазерные источники открыли доступ к большим мощностям излучения при меньших габаритах устройств, что положительно сказалось на технологиях резки, сплавления и сварки [6]. Стали доступны режимы локального воздействия на объекты и материалы благодаря возможности фокусировки лазерного луча в пятно микронного размера. Гальваносканирующие системы с F-theta объективами позволяют достигать необходимых для выполнения широкого круга задач скоростей перемещения лазерного пятна по поверхности, что позволяет проводить высокоскоростную обработку большой группы материалов с помощью лазерного излучения [7].

Одним из примеров технологии аддитивного производства является метод селективного лазерного спекания (СЛС), который широко используется в медицине для изготовления объектов из металлов (например, титановые импланты) и пластиков (например, полиуретановые протезы). Важным обстоятельством является то, что существуют ограничения по применению метода СЛС для ряда материалов, в том числе биологически совместимых полимеров. В процессе реализации метода СЛС излучение поглощается полимерным материалом во всем объеме, из-за чего происходит перегрев и расплавление. Такой подход к спеканию материала ограниченно применим для биосовместимых полимеров, которые резорбируются (растворяются) в среде организма и со временем из него выводятся. Сильный перегрев приводит

к деградации таких материала и утрате свойств биосовместимости. Также, в процессе формирования трехмерных конструкций методом СЛС из-за переплавления трудно добиться развитой внутренней микропористой структуры, необходимой для лучшего роста и развития клеток, заселенных в сформированные конструкции.

Указанные недостатки могут быть устранены использованием метода поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС), который является разновидностью СЛС [8,9]. Подход ПСЛС дает возможность переместить область максимального поглощения энергии лазерного излучения из объема микрочастиц на их поверхность, что приводит к спеканию твердых трехмерных структур за счет плавления только приповерхностного слоя микрочастиц. Это особенно важно при изготовлении тканеинженерных конструкций, материал которых может содержать биологически активные вещества, разрушающиеся в результате перегрева. В отличие от СЛС, при ПСЛС используется эффект локализации поглощения лазерного излучения на поверхности спекаемого полимерного материала за счёт дополнительных покрытий или включений (сенсбилизаторов нагрева), интенсивно поглощающих лазерное излучение. Известно, что в ранних исследованиях в качестве сенсбилизатора нагрева использовались микрочастицы углерода и наночастицы золота [8], однако эти сенсбилизаторы не подходят для решаемых задач тканевой инженерии. Микрочастицы углерода со временем не выводятся из организма, а наночастицы золота дороги и сложны в производстве. В представляемой работе в качестве сенсбилизатора нагрева выбрана вода, которая не обладает указанными выше недостатками. Для реализации процесса поверхностного спекания использовалось излучение тулиевого волоконного лазера с длиной волны 1,96 мкм. Выбор лазерного источника обусловлен достаточно низким коэффициентом поглощения полимера ($\sim 0,3 \text{ см}^{-1}$) и высоким коэффициентом поглощения сенсбилизатора нагрева на рабочей длине волны ($\sim 130 \text{ см}^{-1}$) [10].

Как известно из литературы, лазерные технологии являются эффективным инструментом для придания новых свойств биосовместимым конструкциям с использованием биологически активных веществ или для заселения конструкций живыми клетками [11,12]. Заселение конструкций методом лазерной биопечати быстрее и точнее по сравнению с используемыми до настоящего времени методами [13].

Одним из успешных подходов лазерной биопечати можно назвать лазерно-индуцированный прямой перенос (LIFT – laser induced forward transfer)[13]. Этот метод позволяет переносить в пространстве отдельные клетки или микроорганизмы. Однако до настоящего момента он не

использовался для переноса крупных живых объектов, клеточных агрегатов – сфероидов. Это связано с тем, что использование сфокусированного лазерного излучения с Гауссовым распределением интенсивности приводит к разрушению клеточного агрегата. Поэтому необходимо адаптировать лазерный пучок таким образом, чтобы сохранить разрешающую способность метода и обеспечить высокую выживаемость клеток сфероида после переноса на уровне современных методов биопечати. Клеточные сфероиды – крупные клеточные агрегаты размером 200-300 мкм в диаметре и содержащие в себе порядка 2000 клеток, прочно адгезированных друг к другу за счет белков межклеточной адгезии. Использование сфероидов в качестве объектов биопечати может позволить повысить выживаемость общего числа клеток после пространственного переноса и увеличить скорость заселения биосовместимых конструкций по сравнению с используемыми до настоящего времени методами заселения клеточными культурами [14–17].

Таким образом, развитие метода поверхностно-селективного лазерного спекания перспективно для создания и совершенствования качественно новых биосовместимых конструкций, а адаптация метода лазерно-индуцированного прямого переноса для биопечати клеточными сфероидами улучшит процесс заселения этих конструкций. Следует ожидать, что сочетание этих методов формирования биосовместимых конструкций и их заселения клеточными агрегатами приведет к значительному расширению возможностей лазерных технологий в регенеративной медицине.

Цель и задачи работы

Целью работы являются разработка и развитие лазерных аддитивных технологий формирования трехмерных биосовместимых каркасов в рамках задач тканевой инженерии с помощью технологий поверхностно-селективного лазерного спекания и биопечати живыми клеточными агрегатами – клеточными сфероидами – методом лазерно-индуцированного прямого переноса.

В соответствии с поставленной целью, необходимо было решить следующие задачи:

- экспериментальное исследование влияния содержания воды в приповерхностном слое полимерных микрочастиц на основе полилактида, в том числе с нанесенным на поверхность микрочастиц природным полисахаридом, на процесс поверхностной локализации энергии лазерного излучения, определение значений температуры, которые достигаются в процессе лазерного спекания;

- определение диапазона оптимальных параметров инфракрасного лазерного излучения с длиной волны $\lambda=1,96$ мкм для формирования

трехмерных структур из полимерных микрочастиц неправильной формы и из сферических композитных микрочастиц на основе полилактида методом поверхностно-селективного лазерного спекания с использованием воды в качестве сенсibilизатора нагрева;

– экспериментальное исследование возможности лазерного микроструктурирования и изменения морфологии нетканых материалов на основе полилактида и поликапролактона с помощью инфракрасного лазерного излучения с длиной волны $\lambda=1,96$ мкм в режиме поверхностно-селективного лазерного спекания с использованием воды в качестве сенсibilизатора нагрева;

– разработка экспериментальной лазерной системы для пространственного переноса живых клеточных агрегатов с характерным размером 200-300 мкм методом лазерно-индуцированного прямого переноса;

– экспериментальное исследование возможностей метода лазерно-индуцированного прямого переноса для задачи деликатной биопечати клеточными сфероидными из мезенхимальных стромальных клеток со средней выживаемостью клеток 75%.

Научная новизна

Научная новизна диссертационной работы состоит в следующем:

1. Продемонстрированы возможности применения метода поверхностно-селективного лазерного спекания с использованием лазерного излучения с длиной волны $\lambda=1,96$ мкм и воды в качестве сенсibilизатора нагрева для формирования трехмерных конструкций из микрочастиц полилактида:
 - полученных методом механического помола и покрытых гидрофильной оболочкой из хитозана;
 - сферической формы, покрытых гидрофильной оболочкой на основе хитозана или его сополимера;
 - сферической формы, покрытых β -лактоглобулином, объемно наполненных наночастицами гидроксиапатита.
2. Впервые проведено микроструктурирование и изменение морфологии нетканых полимерных материалов из алифатических полиэфиров, полученных методом электроформования, в режиме поверхностно-селективного лазерного спекания.
3. Разработан процесс лазерной биопечати методом лазерно-индуцированного прямого переноса с использованием распределения интенсивности в лазерном пятне, близкого к П-образному, для обеспечения пространственного переноса микрообъектов с характерным размером 200-300 мкм.

4. Впервые проведен пространственный перенос клеточных сфероидов из мезенхимальных стромальных клеток методом лазерно-индуцированного прямого переноса с использованием распределения интенсивности в лазерном пятне, близкого к П-образному, со средней выживаемостью клеток 75%.

Практическая значимость

Метод поверхностно-селективного лазерного спекания может быть использован для создания пористых биосовместимых каркасов из биосовместимых полимерных материалов. Такие скаффолды применяются для создания тканеинженерных конструкций, которые вживляются в место дефекта и помогают восстанавливать нативную ткань. Метод лазерно-индуцируемого прямого переноса может быть использован для пространственного переноса живых клеточных агрегатов (сфероидов) в задачах биопечати, например, при заселении скаффолдов живыми клетками. Такие тканеинженерные конструкции используются при восстановлении поврежденных фрагментов тканей и органов. Таким образом, результаты диссертационной работы вносят вклад в развитие лазерных аддитивных технологий, применяемых в регенеративной медицине.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Применение метода поверхностно-селективного лазерного спекания с использованием лазерного излучения с длиной волны 1,96 мкм и воды в качестве сенсibilизатора нагрева для формирования трехмерных конструкций из микрочастиц полилактида, с поверхностями, функционализированными биополимерами на основе хитозана, либо сферической формы, либо полученными методом механического помола, а также из сферических микрочастиц полилактида с добавлением наночастиц гидроксиапатита, функционализированных β -лактоглобулином для задач тканевой инженерии.
2. Контролируемое лазерное изменение морфологии и микроструктурирование материалов, изготовленных методом электроформования из биосовместимых алифатических полиэфиров для задач тканевой инженерии, реализовано методом поверхностно-селективного лазерного спекания с использованием лазерного излучения с длиной волны 1,96 мкм с плотностью мощности $0,6-11 \times 10^3$ Вт/см² и воды в качестве сенсibilизатора нагрева.
3. Метод лазерно-индуцированного прямого переноса при использовании импульсного лазерного излучения с длиной волны 1,05 мкм, с длительностью импульса 7 нс, энергией в импульсе 180-230 мкДж при плотностях энергии 0,16-0,18 Дж/см² в сочетании с оптической системой

формирования распределения интенсивности в лазерном пятне, близком к П-образному обеспечивает пространственный перенос клеточных сфероидов из мезенхимальных стромальных клеток с размером 200-300 мкм целиком без разрушения, с выживаемостью клеток на среднем уровне $78 \pm 15\%$.

Апробация

Изложенные в работе результаты неоднократно докладывались автором на конференциях:

Международная конференция по фотонике и информационной оптике IX, X, XI, XII (Москва, 2020 – 2023 гг.);

VII Троицкая конференция с международным участием «Медицинская физика» (ТКМФ-7) (Троицк, 2020);

XVII Международная научно-практическая конференция «Новые полимерные композиционные материалы. Микитаевские чтения» (Эльбрус, 2021);

9th International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures, (Санкт-Петербург, 2022);

XLIX Международная молодёжная научная конференция «Гагаринские чтения» (Москва, 2023);

VII международная конференция UltrafastLight-2023 (Москва, 2023).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, среди них 6 статей в рецензируемых изданиях, включенных в перечень ВАК РФ и/или индексируемых в базах данных WoS и Scopus, 11 работ в трудах международных конференций, индексируемых в базе данных РИНЦ, 1 работа в трудах всероссийских конференций, индексируемых в базе данных РИНЦ.

Список статей, опубликованных по теме диссертации

Antoshin A., **Minaeva E.**, Koteneva P., et al. LIFT of cell spheroids: Proof of concept // Bioprinting. Elsevier B.V., – 2023. – Vol. 34 – № March. – P. e00297. (**Scopus, Web of Science, Q1**)

Minaeva E.D., Antoshin A.A., Kosheleva N. V., et al. Laser Bioprinting with Cell Spheroids: Accurate and Gentle // Micromachines. – 2023. – Vol. 14 – № 6. – P. 1152. (**Scopus, Web of Science, Q2**)

Minaev N. V., Minaeva S.A., **Minaeva E.D.**, et al. Controlled Structure of Polyester/Hydroxyapatite Microparticles Fabricated via Pickering Emulsion

Approach // Polymers (Basel). – 2022. – Vol. 14 – № 20. – P. 4309. (**Scopus, Web of Science, Q1**)

Demina T.S., Popyrina T.N., **Minaeva E.D.**, et al. Polylactide microparticles stabilized by chitosan graft-copolymer as building blocks for scaffold fabrication via surface-selective laser sintering // J. Mater. Res. Springer International Publishing. – 2022. – Vol. 37 – № 4. – P. 933–942. (**Scopus, Q2**)

Minaeva E.D., Kuryanova A.S., Dulyasova A.A., et al. Laser Technology of Directional Microstructuring of Biodegradable Nonwovens // High Energy Chem. – 2022. – Vol. 56 – № 2. – P. 138–144. (**Scopus, Q3**)

Minaev N. V., Demina T.S., **Minaeva E.D.**, et al. The Evolution of Surface-Selective Laser Sintering: Modifying and Forming 3D Structures for Tissue Engineering // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. – 2020. – Vol. 84 – № 11. – P. 1315–1320. (**Scopus, Q3**)

Личный вклад

В части лазерного спекания материалов личный вклад автора в настоящую работу состоит в исследованиях процессов поверхностно-селективного лазерного спекания; модификации и улучшении ранее созданной экспериментальной установки для проведения исследований по диагностике процесса поверхностно-селективного лазерного спекания; изготовления малых серий экспериментальных образцов. Автором проводились исследования, направленные на подбор оптимальных режимов лазерного воздействия на полимерные микрочастицы и нетканые материалы; экспериментальное исследование процесса поверхностно-селективного спекания полимерных микрочастиц и нетканых материалов с последующим анализом физических процессов, происходящих при этом; теоретическом исследовании процесса поведения микрочастиц при лазерном воздействии.

В части клеточной биопечати личный вклад автора состоит в модификации метода лазерно-индуцированного прямого переноса для пространственного переноса крупных клеточных агрегатов: разработке и сборке экспериментальной установки, проектировании и расчёте оптической схемы; экспериментальном исследовании процессов при лазерной биопечати с использованием П-образных лазерных пучков; отработке алгоритмов по пространственному переносу клеточных сфероидов; экспериментальном исследовании пространственного переноса клеточных сфероидов с анализом полученных результатов.

Автор принимала непосредственное участие в подготовке отчетов и написании статей по теме исследования.

Структура и объем

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения и библиографии. Общий объем диссертации составляет 143 страницы, включая 41 рисунок, 6 таблиц и приложение. Библиография содержит 132 наименования.

Содержание работы

Во введении диссертационной работы обоснованы актуальность исследования, сформулированы цель и задачи работы, отражена научная новизна и практическая значимость, прописаны положения, выносимые на защиту.

В Главе 1 представлен обзор литературы, посвященной технологиям аддитивного производства трехмерных конструкций из биосовместимых биорезорбируемых материалов и методам биопечати клетками и клеточными агрегатами для задач регенеративной медицины.

В разделе 1.1 обсуждаются технологии аддитивного производства для задач тканевой инженерии. Аддитивные технологии дают возможность изготавливать трехмерные конструкции из широкого спектра биосовместимых материалов различного функционального назначения. Одним из наиболее перспективных методов изготовления биосовместимых и биорезорбируемых структур для задач тканевой инженерии является метод поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС) [18,19]. Преимуществом данного метода является спекание материала за счет локализации нагрева тонкого приповерхностного слоя без затрагивания основного внутреннего объема используемого материала в результате лазерного воздействия. Такой режим нагрева достигается благодаря использованию сенсбилизатора нагрева, который можно нанести либо перед лазерным воздействием, либо в процессе синтеза материала. Метод ПСЛС позволяет сформировать конструкции из биосовместимых полимерных материалов с системой пор внутри самой конструкции и сохранить биосовместимые свойства. Внутренняя система пор позволяет клеткам мигрировать внутри изделия, обеспечивает лучшее разрастание клеток в процессе восстановления поврежденных участков тканей. В нетканых материалах волокнистая структура создает систему внутренних пор и формирует окружение для клеток, близкое к нативному. Дополнительное микроструктурирование нетканых материалов позволяет контролировать пористость и изменять морфологию материала.

В разделе 1.2 обсуждаются технологии лазерной биопечати клетками и клеточными сфероидными. Перспективными методами заселения конструкций

клетками являются методы лазерной биопечати благодаря бесконтактности пространственного переноса, высокой разрешающей способности, скорости процесса печати, малом механическом воздействии и широте выбора переносимых материалов [20]. В качестве метода заселения биосовместимых конструкций выбрана одна из разновидностей лазерной биопечати – метод лазерно-индуцируемого прямого переноса (LIFT – laser-induced forward transfer) [21–24]. Известно, что метод LIFT позволяет переносить отдельные клетки или бактерии используя отдельные лазерные импульсы. Преимущества этого метода в минимальном контакте с переносимым объектом и в прецизионной печати, где точность переноса сравнима с размером переносимого объекта. В настоящее время набирает популярность использование крупных клеточных агрегатов (клеточных сфероидов), в которых содержится несколько сотен или тысяч клеток, для переноса которых ранее не предлагалось использовать подход лазерной биопечати. Приводится обоснование использования метода LIFT для биопечати крупными агрегатами клеток.

В **Главе 2** представлено описание метода ПСЛС, характеристика микрочастиц различной формы и состава из биосовместимого полимера полилактида и нетканых материалов из полимеров полилактида и поликапролактона; описание метода LIFT.

В разделе 2.1 подробно описаны полимерные материалы, использованные в качестве «строительного материала» для трехмерных конструкций, формируемых методом ПСЛС, описаны нетканые материалы, которые можно микроструктурировать с использованием метода ПСЛС. Для формирования конструкций «с нуля» использовались микрочастицы, полученные методом механического помола, и сферические микрочастицы, изготовленные методом испарения растворителя из эмульсии. Полимерные микрочастицы, полученные методом механического помола, разделены на 4 образца в зависимости от предобработки (лиофильная сушка, сохранение естественной влажности, дополнительное увлажнение перед лазерным воздействием, сочетание покрытия гидрофильной оболочкой и дополнительного увлажнения). Сферические полимерные микрочастицы в процессе формирования были покрыты хитозаном или его сополимером для придания поверхности гидрофильных свойств. Гибридные сферические микрочастицы содержали в себе наночастицы гидроксиапатита и были покрыты β -лактоглобулином для придания поверхности гидрофильных свойств. Нетканые материалы из полилактида и поликапролактона были изготовлены методом электроформования. Нанесение гидрофильного покрытия на микрочастицы неправильной формы, изготовление всех

сферических микрочастиц, изготовление нетканых материалов проведено коллегами из ИСПМ им. Н.С. Ениколопова Российской академии наук.

В разделе 2.2 описана экспериментальная установка для реализации исследования процессов ПСЛС. В качестве источника лазерного излучения использован волоконный непрерывный тулиевый лазер с длиной волны $\lambda = 1,96$ мкм и максимальной мощностью 3 Вт (НТО «ИРЭ-Полнос», Россия). На рисунке 1 представлены фотография и схема установки для исследования процессов ПСЛС.

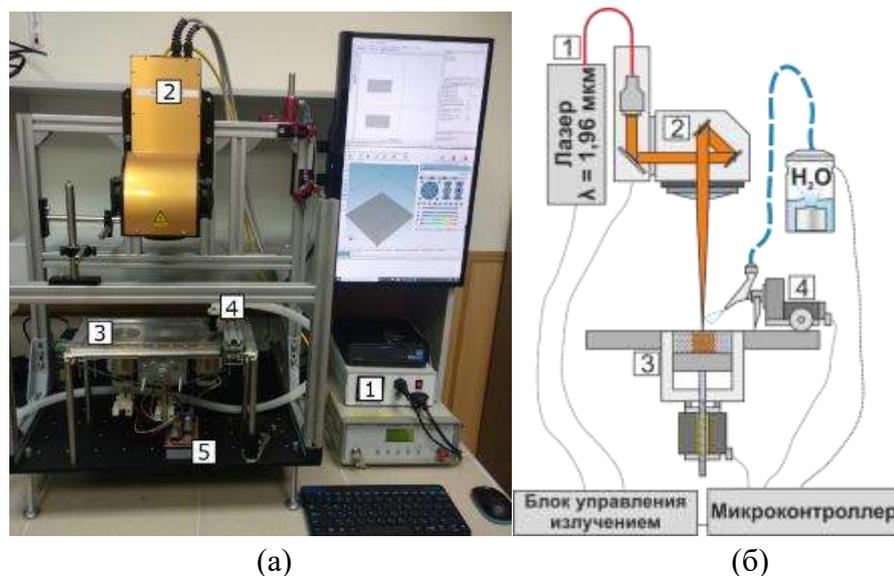


Рис. 1. Фотография (а) и схема (б) установки для метода ПСЛС: 1 – волоконный лазер, 2 – гальваносканирующая система, 3 – система послойного нанесения микрочастиц, 4 – выравнивающий нож, 5 – контроллер шаговых двигателей, адаптировано из [25].

После прохождения лазерного излучения через оптическую систему выходная мощность составила 2,65 Вт. Оптическая система позволяла формировать лазерное пятно диаметром 280 мкм и перемещать его по заданной траектории по рабочей поверхности спекаемого материала.

В разделе 2.3 описана установка для лазерно-индуцированного прямого переноса LIFT. Установка позволяла формировать пучки, близкие по распределению интенсивности к П-образному. Распределения такого типа, как будет описано далее, позволяют переносить клеточные сфероиды как целое с большей выживаемостью по сравнению с Гауссовыми пучками. На рисунке 2 представлена схема этой установки.

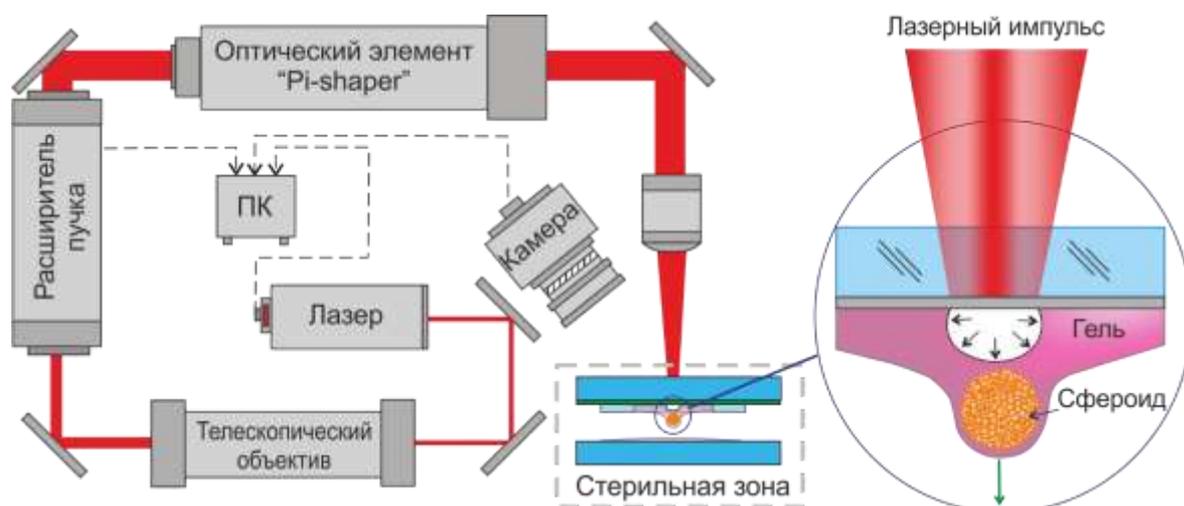


Рис.2. Схема установки для LIFT. На выносе условно показан клеточный сфероид в начальный момент своего переноса со струей геля, адаптировано из [26].

В качестве источника излучения использовался импульсный наносекундный твердотельный лазер ТЕСН-1053 (Лазер-Компакт, Россия) с длиной волны 1,05 мкм с длительностью импульса 7 нс. Сочетание расширителей пучка и оптического элемента Pi-Shaper позволяло формировать в фокальной плоскости оптической системы П-образные распределения интенсивности, которые можно в дальнейшем использовать для реализации процесса лазерной биопечати клеточными сфероидами. После экспериментального подбора было выбрано два типа П-образных (не-Гауссовых) распределений энергии лазерного излучения в пятне – режимы «кольцо с точкой» и «два concentрических кольца», которые обеспечивали деликатный перенос клеточных сфероидов с их минимальным повреждением.

В разделе 2.4 описана методика расчета средней интенсивности лазерного излучения для сложных распределений интенсивности, разработанная в рамках исследования. В экспериментах использовалось не-Гауссово распределение интенсивности, поэтому использовать для расчетов формулу для «классического» Гауссова распределения некорректно. Расчет средней интенсивности лазерного излучения в пятне проводился с использованием результатов прямых измерений распределения интенсивности в рабочей плоскости.

$$\overline{I(R)} = \int_0^{2\pi} \int_0^R I(r, \varphi) r dr d\varphi \quad (1)$$

где I – интенсивность лазерного излучения в точке (r, φ) , R – радиус.

За рабочий радиус R пятна лазерного излучения принято такое значение R , при котором модуль производной от (1) максимален. Таким образом, по

экспериментальным измерениям распределения интенсивности получен рабочий радиус пятна и средняя интенсивность в этом пятне.

В **Главе 3** представлены результаты поверхностно-селективного лазерного спекания микрочастиц полилактида различной формы и наполнения.

В разделе 3.1 представлены результаты экспериментов по формированию трехмерных конструкций из полимерных микрочастиц различной формы и состава с помощью метода ПСЛС. Исследованы процессы поверхностно-селективного лазерного спекания микрочастиц, изготовленных методом механического помола, с различным содержанием воды на поверхности и в объеме материала. Схема подготовки микрочастиц и формирования образцов представлена на рисунке 3.

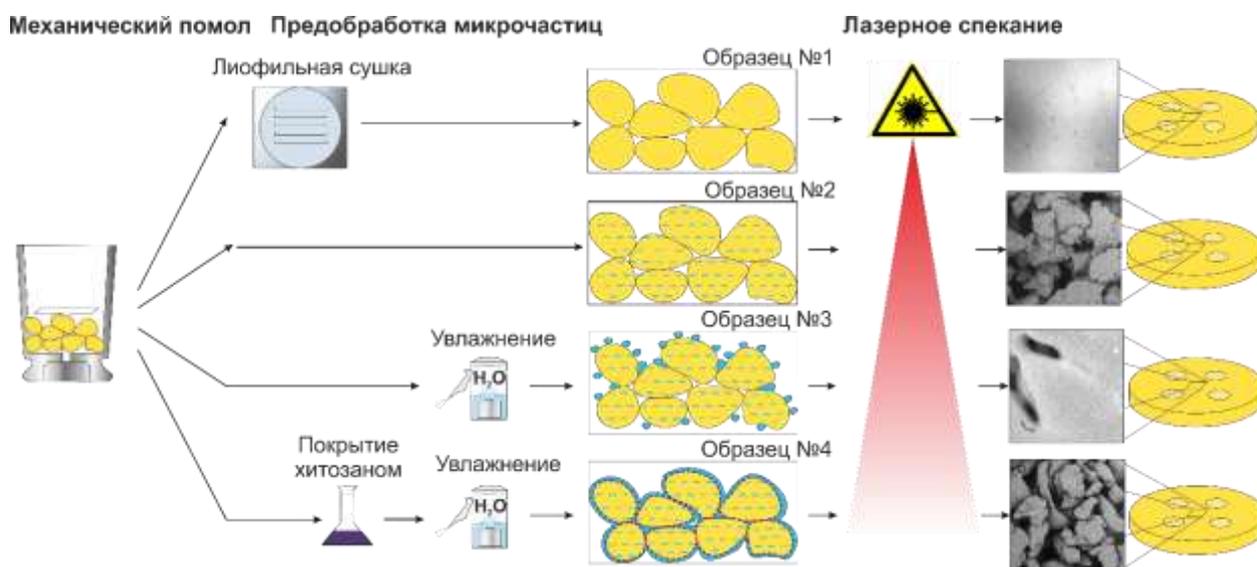


Рис.3. Схема подготовки микрочастиц и формирования образцов с различным содержанием воды.

Гидрофильная оболочка из природного полисахарида хитозана необходима для увеличения количества осажденной воды. Показано, что при отсутствии воды микрочастицы полилактида сплавляются в сплошные структуры. При наличии воды в объеме материала, микрочастицы спекаются в крупные конгломераты без реализации процесса поверхностного спекания. Наличие гидрофильной оболочки из хитозана позволяет эффективно распределить сенсibilизатор нагрева на поверхности микрочастиц и тем самым локализовать энергию лазерного излучения. В результате микрочастицы спекаются своими приповерхностными слоями без переплавления и образования крупных конгломератов.

Из микрочастиц с гидрофильным покрытием сформированы трехмерные конструкции в форме цилиндров из 10 слоев по 500 мкм толщиной

каждый. Предварительные эксперименты показали, что для формирования объемных структур из микрочастиц оптимальным является диапазон плотностей энергии 13-16 Дж/см². Здесь и далее под оптимальным понимается такой диапазон плотностей энергий, при котором микрочастицы спекаются только приповерхностными слоями, а сформированные конструкции сохраняют целостность при простых манипуляциях с ними (захват пинцетом, перенос из рабочей области, имплантация).

В разделе 3.2 представлены результаты экспериментов по формированию трехмерных конструкций из полимерных сферических микрочастиц с поверхностью, покрытой гидрофильной оболочкой из хитозана. Проведены предварительные эксперименты по подбору диапазонов плотностей энергий для поверхностно-селективного лазерного спекания. Аналитически описан процесс поверхностно-селективного лазерного спекания сферических микрочастиц с поверхностью, покрытой гидрофильной оболочкой из хитозана.

На рисунке 4 показана схематическая модель нагрева приповерхностного слоя сферических микрочастиц под действием лазерного излучения. Модель показывает основные факторы, влияющие на эффективность метода ПСЛС с использованием микрочастиц полилактида с гидрофильной оболочкой: диаметр лазерного пятна, скорость перемещения лазерного пятна.

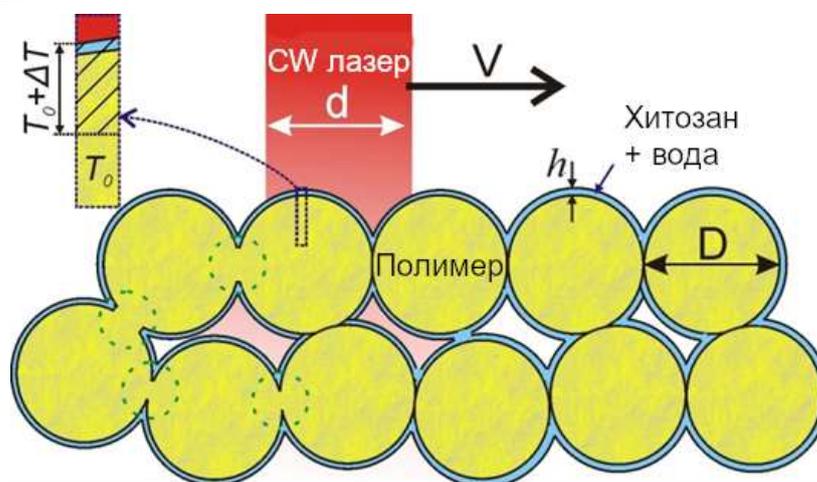


Рис. 4. Схематическая модель нагрева приповерхностного слоя микрочастиц при ПСЛС с гидрофильным покрытием, адаптировано из [25].

Для расчета были взяты параметры используемых в последующих экспериментах микрочастиц (средний диаметр $D = 200$ мкм, толщина покрытия на основе хитозана $h \sim 1$ мкм) и параметры лазерного воздействия (диаметр лазерного пятна $d = 280$ мкм, скорость движения пятна $v = 25$ мм/с). Для расчетов сделано допущение, что использовалось П-образное распределение лазерной энергии в пятне.

Время лазерного воздействия составило

$$\tau = \frac{d}{V} \approx 11 \text{ мс} \quad (2)$$

Поверхностная плотность мощности (интенсивность) лазерного излучения

$$I = \frac{4P}{\pi d^2} = 4,9 \cdot 10^3 \frac{\text{Вт}}{\text{см}^2} \quad (3)$$

С учетом доли поглощенной энергии в слое воды толщиной h :

$$1 - \exp^{-\mu_a h} \approx \mu_a h \sim 1,3 \%, \quad (4)$$

где $\mu_a = 130 \text{ см}^{-1}$ – коэффициент поглощения водой оптического излучения при $\lambda = 1,96 \text{ мкм}$. Поверхностная плотность поглощенной энергии составила

$$F = \mu_a h I \tau = 0,7 \frac{\text{Дж}}{\text{см}^2}. \quad (5)$$

Повышение температуры ΔT можно рассчитать по энергии E , поглощенной в объеме V , по известной формуле:

$$E = c_p \rho \Delta T, \quad (6)$$

где c_p – теплоемкость воды при постоянном давлении, ρ – плотность воды. Поскольку

$$F = \frac{E}{S} \quad (7)$$

и

$$V = Sh, \quad (8)$$

повышение температуры в итоге составит

$$\Delta T = \frac{\mu_a I \tau}{c_p \rho} \quad (9)$$

Выражение (10) показывает, что, при таких исходных данных, лазерный нагрев тонкого слоя не зависит от толщины покрытия (h). Эта особенность весьма удобна, так как толщину покрытия затруднительно регулировать и определять, а значение, взятое для данной модели (т.е. $h = 1 \text{ мкм}$), является усредненным.

Однако, в выражение (10) необходимо внести поправочные коэффициенты по двум причинам. Первая причина связана с температуропроводностью полилактида: в результате воздействия лазерного излучения за время τ нагревается слой

$$h_1 = \sqrt{a\tau} \approx 26 \text{ мкм}, \quad (10)$$

где $a \approx 6 \cdot 10^{-8} \text{ м}^2/\text{с}$ – коэффициент температуропроводности. Из-за этого нагрев будет меньше в

$$K_1 = \frac{h_1 + h}{h} \approx 27 \text{ раз} \quad (11)$$

Вторая причина связана с тем, что содержание воды (СВ) в гигроскопическом покрытии не равно 100%. Для случая, когда СВ ~ 80% влажности воздуха, т.е. используемого впоследствии для оценки водопоглощительной способности микрочастиц, нагрев будет меньше в

$$K_2 = \frac{100}{СВ} \approx 1,3 \text{ раза.} \quad (12)$$

С учетом изложенного реальный рост температуры нагрева приповерхностного слоя микрочастиц в таких условиях может составить

$$\Delta T_{\text{real}} = \frac{\mu_a I \tau K_1}{c_p \rho K_2} \quad (13)$$

Для микрочастиц из полилактида, покрытых гидрофильной хитозановой оболочкой, повышение температуры составит приблизительно 85 °С. Фактическое повышение температуры приповерхностного слоя микрочастиц полимера, ΔT_{real} , должно существенно зависеть от уровня влажности воздуха и/или содержания остатков воды в полимерном порошке, а не от толщины полимерного покрытия. При этом следует иметь в виду, что при лазерном воздействии на микрочастицы и повышении их средней температуры процент воды в образце будет уменьшаться. В следствие этого будет понижаться ΔT_{real} .

Проведены эксперименты по формированию трехмерных конструкций из микрочастиц сферической формы с гидрофильным покрытием из хитозана и его сополимера. Определено, что для спекания сферических микрочастиц, покрытых хитозаном, оптимальной плотностью энергии лазерного излучения является диапазон 8-10 Дж/см², а для спекания сферических микрочастиц, покрытых сополимером – 11-15 Дж/см².

Показана возможность формирования трехмерных структур из сферических композитных микрочастиц методом поверхностно-селективного лазерного спекания. На подготовительном этапе трехмерные конструкции изготавливались из микрочастиц с различным содержанием гидроксиапатита. Предварительные эксперименты показали, что сферические микрочастицы с соотношением полимер/наночастицы гидроксиапатита 3 к 1 могут быть использованы в качестве «строительного материала» для трехмерных конструкций и спекаются стабильно без карбонизации (обугливания). Показано, что для спекания гибридных сферических микрочастиц с наночастицами гидроксиапатита в составе оптимальной плотностью энергии лазерного излучения является диапазон 20-30 Дж/см² в зависимости от размера фракции микрочастиц.

В **Главе 4** представлены результаты микроструктурирования и изменения морфологии поверхности нетканых полимерных материалов методом ПСЛС. Форма конструкций для задач тканевой инженерии зависит от

геометрических размеров области, которую требуется восстановить. Так, двумерные каркасы активно используются для восстановления тканей эпителия [27]. Нетканые материалы, изготовленные методом электроформования, обладают для этого подходящими характеристиками: высокое соотношение площади поверхности к объему, высокая пористость, однородность волокна, композиционное разнообразие, гибкость и простота изменения химических и физических свойств поверхности [28]. Модификация нетканых материалов для оптимизации их архитектуры – одно из возможных применений метода ПСЛС. В работе показано, что с использованием инфракрасного лазерного излучения и воды в качестве сенсбилизатора нагрева можно быстро провести изменение структуры нетканого материала. В дальнейшем такие материалы после заселения клеточным материалом можно будет использовать для восстановления тканей эпителия.

В разделе 4.1 описаны возможные типы модификаций структуры нетканых материалов, которые можно сформировать в режиме ПСЛС с использованием тулиевого источника лазерного излучения с длиной волны $\lambda = 1,96$ мкм. Показано, что в первую очередь изменение морфологии происходит в местах контакта волокон.

На рисунке 5 представлены примеры модификации нетканых материалов в результате лазерного воздействия.

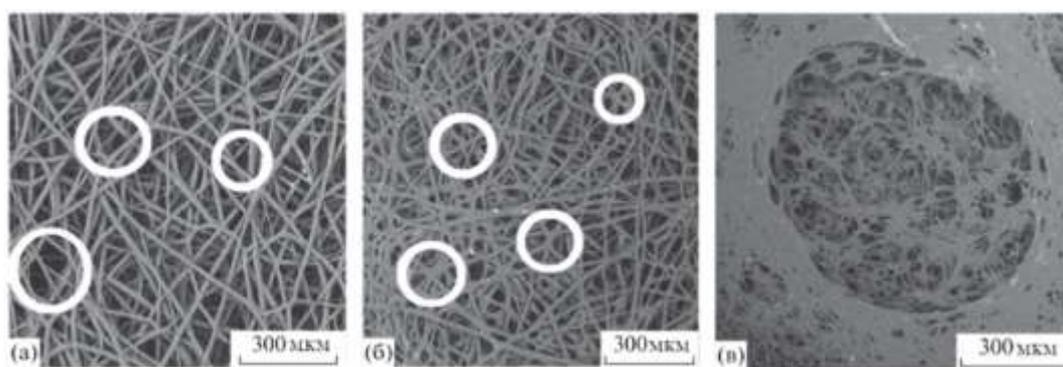


Рис. 5. Типы модификации нетканых материалов, получаемые благодаря лазерному воздействию в режиме ПСЛС: а) «отверстия», б) спайки – «узелки», в) большие «отверстия» и «переплавления» вокруг них, адаптировано из [29].

Первый тип модификации – образование «отверстий» размером от 10 диаметров волокон без появления видимого спекания волокон, с присутствием единичных «узелков». «Узелком» считается место спекания пяти и более волокон в месте контакта. Эта модификация дает непрочную структуру и относительно небольшое изменение в морфологии образцов. Второй тип модификации – «отверстия» с появлением множественного точечного спекания «узелков». Этот режим дает прочную структуру,

пригодную для дальнейшей работы с ней. Третий тип модификации – «переплавление» – представляет собой переход от отдельных волокон материала к сплошной пленке размером от 20% от области воздействия лазерного излучения. Нетканый материал полностью изменяется, утрачивая его исходную развитую структуру.

В разделе 4.2 представлено исследование влияния параметров лазерного воздействия на микроструктурирование нетканых материалов из полилактида. Показано, что для модификации нетканых материалов из полилактида необходимы плотности мощности примерно равные $0,6 \cdot 10^3$ Вт/см²,

В разделе 4.3 представлены результаты исследования влияния параметров лазерного воздействия на структуру нетканых материалов из поликапролактона. При микроструктурировании нетканых материалов из поликапролактона, у которого температурный переход стеклования и кристаллизации находится в области меньших температур по сравнению с полилактидом, даже без нанесения сенсibilизатора нагрева и при меньшей плотности мощности происходит значительное сплавление волокон и локальное образование пленки, которая занимает от 20% области лазерного воздействия. Дополнительное увлажнение образцов приводит к усилению процесса спекания также до формирования монолитной пленки. Для модификации нетканых материалов из поликапролактона необходимы плотности мощности примерно $1,1 \cdot 10^3$ Вт/см².

В **Главе 5** представлены результаты применения метода лазерно-индуцированного прямого переноса для биопечати клеточными сфероидными. Клеточные агрегаты – сфериды – могут являться материалом для быстрого заселения трехмерных полимерных конструкций, в т.ч. изготовленных методом поверхностно-селективного лазерного спекания. Размеры сфероидов зависят от базового клеточного материала, используемого для их формирования, в среднем диаметр сфероидов составляет 100-300 мкм и содержит в себе порядка двух тысяч клеток, прочно адгезированных друг к другу за счет белков межклеточной адгезии. Метод лазерно-индуцированного прямого переноса является перспективным методом лазерной биопечати для решения задачи заселения биосовместимых конструкций как с точки зрения переноса большого числа клеток за один лазерный импульс, так и благодаря высокой выживаемости перенесенных клеток, сравнимой с передовыми методами.

В разделе 5.1 описаны подбор и характеристика режимов лазерного воздействия для реализации пространственного переноса клеточных сфероидов. Для подбора профиля распределения интенсивности лазерного излучения переносились фантомы клеточных сфероидов, которые имитируют

клеточные агрегаты по своему размеру. Фантомы клеточных сфероидов изготовлены из фотоотверждаемого полимера для трехмерной печати F39T (Resion, Китай) в виде сфер диаметром 150 мкм и находились в питательной гелевой среде.

В ходе исследования выяснено, что для деликатного режима пространственного переноса без повреждений необходимо использовать лазерное пятно, близкое по размерам к диаметру сфероида, а для уменьшения воздействия высоких температур на сфероид необходимо уменьшить энергию лазерного воздействия в центральной области лазерного пятна – в том месте, где сфероид наиболее близко располагается к донорной поверхности. Для реализации этих требований предложены варианты П-образных распределений лазерной энергии в пятне. Для формирования таких распределений был использован оптический элемент Pi-Shaper. Проведены предварительные эксперименты по подбору П-образных распределений энергии в лазерном пятне, которые позволяли переносить фантомы клеточных сфероидов и сами сфероиды.

В разделе 5.2 представлены энергетические параметры лазерного излучения для двух П-образных распределений, описаны особенности процесса лазерно-индуцированного прямого переноса клеточных сфероидов.

На рисунке 6 приведены примеры профилей распределения интенсивности лазерного излучения в фокальной плоскости и их профили энергии по горизонтальной оси для двух режимов «кольцо с точкой» (Ring and Dot, RD) и «два concentрических кольца» (Two Rings, TR).

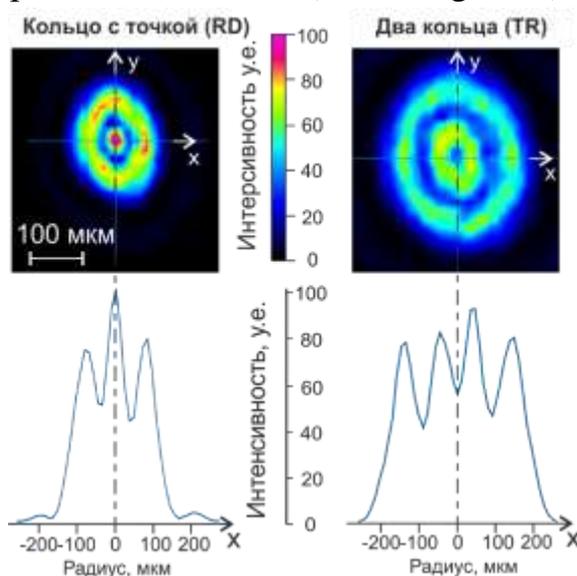


Рис. 6. Примеры профилей распределения интенсивности лазерного излучения в фокальной плоскости (сверху) и их профили энергии по горизонтальной оси (снизу) для режимов «кольцо с точкой» с энергией $E = 95$ мкДж и «два concentрических кольца» с энергией $E = 206$ мкДж, адаптировано из [26].

В соответствии с выражением (1) для режима «кольцо с точкой» плотность энергии лазерного пятна составила $F_{RD} = 0,161 \pm 0,005$ Дж/см² в пятне радиусом $R_{RD} = 120 \pm 30$ мкм. Для режима «два concentрических кольца» плотность энергии лазерного пятна составила $F_{TR} = 0,171 \pm 0,003$ Дж/см² в пятне радиусом $R_{TR} = 182 \pm 11$ мкм. Основной вклад в погрешность вносила погрешность измерений. Полученные значения находятся на нижней границе диапазона используемых энергий лазерного излучения в процессе лазерной биопечати, что является преимуществом используемого метода.

В разделе 5.3 проанализирована выживаемость клеточных сфероидов после пространственного переноса. Клеточные сфероиды изготовлены в Первом МГМУ имени И.М. Сеченова. Ключевым критерием применимости метода биопечати является выживаемость клеток после процесса пространственного переноса. Для экспериментов по проверке выживаемости сфероидов после переноса применялось 3 типа распределения энергии в лазерном пятне: 1) адаптированное под размер клеточного агрегата по размеру перетяжки Гауссово распределение 2) «кольцо с точкой» RD и 3) «два concentрических кольца» TR. Контрольный перенос осуществлен пипеткой.

На рисунке 7 представлена диаграмма выживаемости клеточных сфероидов, перенесенных методом LIFT, в зависимости от распределения энергии в лазерном пятне.

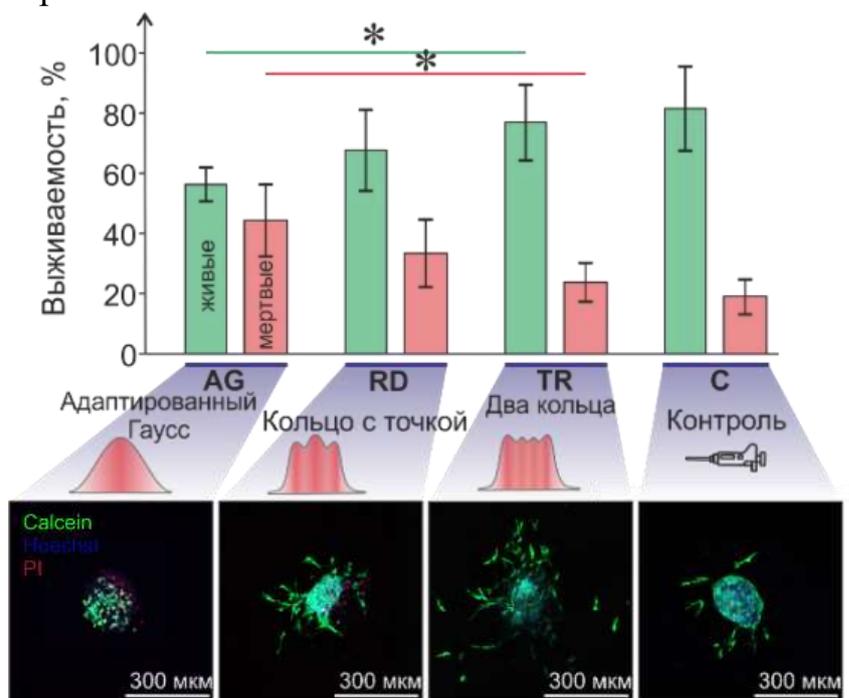


Рис.7. Выживаемость клеточных сфероидов, перенесенных методом LIFT и контроля, в зависимости от распределения энергии в лазерном пятне. В верхней части рисунка диаграмма отражает соотношение живых и мертвых клеток в сфероидах (* – $P < 0,05$). В нижнем ряду представлены фотографии с конфокального микроскопа после Live/Dead анализа, адаптировано из [26].

В верхней части рисунка диаграмма – соотношение живых и мертвых клеток в сфероидах, в нижней части – фотографии с конфокального микроскопа после Live/Dead анализа. Использовались два красителя для живых клеточных ядер: Calcein – зеленый, Hoechst – синий; и один краситель для мертвых ядер клеток Propidium iodide – красный.

Использование режима с распределением энергии в лазерном пятне типа «два concentрических кольца» TR ($F = 0,17 \text{ Дж/см}^2$, $E = 206 \text{ мкДж}$) обеспечивало наиболее высокую клеточную выживаемость – $76 \pm 13\%$. Предположительно, это связано с отсутствием в центре пятна максимума интенсивности энергии лазерного излучения.

Используя форму лазерного пятна (TR) для режима прецизионной печати, напечатаны геометрические фигуры (линия, треугольник, квадрат) в качестве доказательства применимости LIFT для прецизионного позиционирования сфероидов с заданной пространственной геометрией и высокой выживаемостью, что было доказано при помощи теста Live/Dead (рисунок 8).

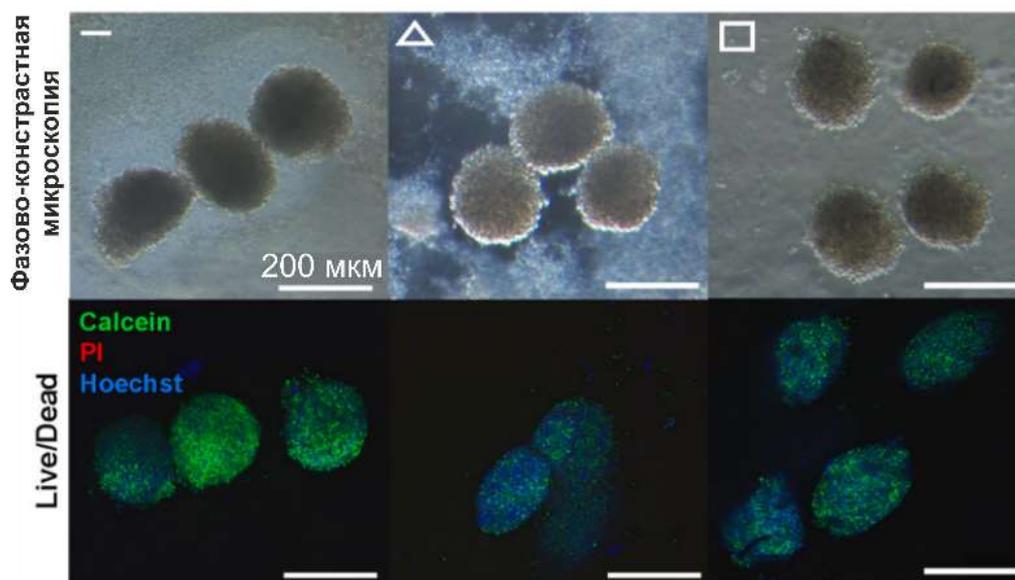


Рис. 8. Результат прецизионного переноса клеточных сфероидов методом LIFT.

Напечатаны простые геометрические формы из клеточных сфероидов (линия, треугольник, квадрат) с использованием распределения энергией в лазерном пятне типа «два concentрических кольца» и визуализированы с помощью фазово-контрастной и конфокальной микроскопии (окрашивание Live/Dead) через 1 день после печати, адаптировано из [26].

Сфероиды визуализировали с помощью фазово-контрастного и конфокального микроскопов. Среднее отклонение реальных центров клеточных сфероидов от точек нацеливания составило $62 \pm 33 \text{ мкм}$, что существенно меньше размера самого клеточного сфероида.

Заключение

В рамках диссертационной работы проведены исследования в части разработки и развития лазерных аддитивных технологий формирования трехмерных биосовместимых каркасов с помощью технологий поверхностно-селективного лазерного спекания и лазерно-индуцированного прямого переноса.

Исследованы процессы поверхностно-селективного лазерного спекания микрочастиц биосовместимого биорезорбируемого полимера полилактида, изготовленных методом помола с различным содержанием воды в объеме материала и на поверхности. Экспериментально исследовано влияние содержания воды в приповерхностном слое полимерных микрочастиц. Для повышения содержания воды на поверхности микрочастиц использовались гидрофильные покрытия из хитозана. Показано, что при отсутствии воды микрочастицы полилактида спекаются в сплошные объекты. При наличии воды, удержанной гигроскопичной поверхностью, микрочастицы спекаются своими поверхностями в режиме ПСЛС. Показано, что при использовании гигроскопичного покрытия на микрочастицах и при наличии воды тепловая энергия распространяется равномерно.

Проанализирован процесс ПСЛС сферических микрочастиц с функционализированной поверхностью. Показано, что толщина гидрофильной оболочки слабо влияет на нагрев в результате лазерного воздействия. Показана возможность формирования трехмерных структур из сферических полимерных микрочастиц с гигроскопичным покрытием из хитозана и его сополимера. Оптимальным диапазоном плотностей энергий лазерного излучения для формирования объемных структур из микрочастиц является диапазон 13-16 Дж/см².

Показана возможность формирования трехмерных структур из сферических полимерных микрочастиц с добавлением наночастиц гидроксиапатита методом ПСЛС. Показано, что сферические микрочастицы с соотношением полимер/наночастицы гидроксиапатита 3 к 1 с диаметром 100-200 мкм могут быть использованы в качестве «строительного материала» для трехмерных конструкций в режиме ПСЛС. Для спекания сферических микрочастиц, покрытых хитозаном, оптимальным диапазоном плотностей энергии лазерного излучения является диапазон 8-10 Дж/см², а для спекания сферических микрочастиц, покрытых сополимером – 11-15 Дж/см². Для спекания гибридных сферических микрочастиц с наночастицами гидроксиапатита в составе оптимальным диапазоном плотностей энергии лазерного излучения является диапазон 20-30 Дж/см² в зависимости от размера фракции.

Проведено изменение морфологии нетканых материалов из полилактида и поликапролактона методом поверхностно-селективного лазерного спекания. Показано, что наиболее вероятные места спекания волокон – это их изломы, появляющиеся в результате изменения структуры материала под действием лазерного излучения и натяжения волокон между точками сплавления.

Исследованы несколько режимов микроструктурирования нетканых материалов с использованием непрерывного излучения тулиевого лазера с длиной волны 1,96 мкм. Определены энергетические параметры лазерного воздействия на нетканые материалы. Для модификации нетканых материалов из полилактида необходимы плотности мощности примерно $0,6 \cdot 10^3$ Вт/см². Для модификации нетканых материалов из поликапролактона необходимы плотности мощности примерно $1,1 \cdot 10^3$ Вт/см².

Проведено экспериментальное исследование процесса переноса клеточных сфероидов с характерным размером 200-300 мкм методом лазерно-индуцированного прямого переноса с использованием различных распределений интенсивности в лазерном пятне. Показано, что лазерные пучки с Гауссовым распределением интенсивности в пятне не оптимальны для переноса крупных клеточных агрегатов.

Установлено, что лазерные пучки с не-Гауссовым профилем распределения интенсивности, приближенным к П-образному пятну («кольцо с точкой» и «два концентрических кольца») и диаметром пятна, сопоставимым с диаметром сфероида, позволяют переносить сфероиды в деликатном режиме, обеспечивая высокую клеточную выживаемость и высокое разрешение трехмерной печати. Показано, что перенос в подобранных режимах обеспечивает выживаемость $76 \pm 13\%$, что сопоставимо с другими методами биопечати. Среднее отклонение реальных центров клеточных сфероидов от точек нацеливания составило 62 ± 33 мкм.

Список тезисов, опубликованных по теме диссертации

Минаева Е.Д., Пермяков А.П. Формирование трехмерных структур из полимерных материалов и модифицирование нетканых полимерных материалов методом поверхностно-селективного лазерного спекания // XLIX Международная молодёжная научная конференция «Гагаринские чтения». – 2023 – С. 557.

Минаева Е.Д., Антошин А.А., Минаев Н.В. и др. Сравнение использования различных профилей распределения энергии лазерного излучения для задачи лазерной биопечати // XII МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ФОТОНИКЕ И ИНФОРМАЦИОННОЙ ОПТИКЕ. – 2023. – С. 114–115.

Minaeva E.D., Antoshin A.A., Kosheleva N. V., et al. Laser-induced forward transfer method adaptation for cell spheroids // 9th International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures. Saint-Petersburg. – 2022. – P. 78–79.

Минаева Е.Д., Антошин А.А., Минаев Н.В. Исследование процесса лазерно-индуцированного прямого переноса агрегатов из живых клеточных культур – клеточных сфероидов // XI МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ФОТОНИКЕ И ИНФОРМАЦИОННОЙ ОПТИКЕ. – 2022. – С. 114–115.

Седова Ю.К., Минаева С.А., **Минаева Е. Д.** и др. Методика исследования распределения компонентов внутри гибридных микрочастиц // НОВЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ. МИКИТАЕВСКИЕ ЧТЕНИЯ. Материалы XVII Международной научно-практической конференции. – 2021 – С. 214.

Седова Ю.К., Минаев Н.В., **Минаева Е.Д.** и др. Исследование распределения наночастиц гидроксиапатита в объеме полимерных микрочастиц методом спектроскопии комбинационного рассеяния // X МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ФОТОНИКЕ И ИНФОРМАЦИОННОЙ ОПТИКЕ СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ. – 2021. – С. 285–286.

Минаева Е.Д., Минаев Н.В. Исследования различий внутренней структуры из порошков различных фракций методом поверхностно-селективного лазерного спекания // X МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ФОТОНИКЕ И ИНФОРМАЦИОННОЙ ОПТИКЕ СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ. – 2021. – Т. 535. – С. 149–150.

Минаева Е.Д., Минаева С.А., Демина Т.С. и др. Анализ процесса формирования трехмерных структур методом поверхностно-селективного лазерного спекания из полимерных порошковых материалов // СБОРНИК ТЕЗИСОВ. VII Троицкая конференция с международным участием “Медицинская физика” (ТКМФ-7). – 2020. – С. 208–209.

Демина Т.С., Минаев Н.В., **Минаева Е.Д.** и др. Микрочастицы для получения 3D материалов методом поверхностно-селективного лазерного спекания // СБОРНИК ТЕЗИСОВ. VII Троицкая конференция с международным участием “Медицинская физика” (ТКМФ-7). – 2020. – С. 201-202.

Черненко Т.В., **Минаева Е.Д.**, Минаева С.А. и др. Материалы из поликапролактона и их модифицирование с помощью физических методов воздействия // СБОРНИК ТЕЗИСОВ. VII Троицкая конференция с международным участием “Медицинская физика” (ТКМФ-7). – 2020. – С. 176-177.

Минаева Е.Д., Минаева С.А., Минаев Н.В. Лазерные аддитивные технологии формирования функциональных тканеинженерных конструкций для восстановления костной ткани // IX МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ФОТОНИКЕ И ИНФОРМАЦИОННОЙ ОПТИКЕ. – 2020. – С. 181–182.

Минаева Е.Д., Демина Т.С., Минаев Н.В. и др. Особенности формирования матриксов из новых порошковых материалов методом поверхностно-селективного лазерного спекания // IX МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ФОТОНИКЕ И ИНФОРМАЦИОННОЙ ОПТИКЕ. – 2020. – С. 141–142.

Список цитируемой литературы

1. Salgado A., Oliveira J., Pedro A., et al. Adult Stem Cells in Bone and Cartilage Tissue Engineering // Current Stem Cell Research & Therapy, 2006, Vol. 1, № 3, pp. 345–364.
2. Germaini M.-M., Belhabib S., Guessasma S., et al. Additive manufacturing of biomaterials for bone tissue engineering – A critical review of the state of the art and new concepts // Progress in Materials Science, 2022, Vol. 130, p. 100963.

3. Murphy S. V, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs // *Nature Biotechnology*, 2014, Vol. 32, № 8, pp. 773–785.
4. *Virtual Prototyping & Bio Manufacturing in Medical Applications* / ed. Bidanda B., Bartolo P.J., Springer Science+Business Media, LLC, 2008, 307 p.
5. Praveena B.A., Lokesh N., Abdulrajak B., et al. A comprehensive review of emerging additive manufacturing (3D printing technology): Methods, materials, applications, challenges, trends and future potential // *Materials Today: Proceedings*, 2022, Vol. 52, pp. 1309–1313.
6. Pradeep P.V., Paul A., Paul L., et al. Application of micro machining and additive manufacturing processes for difficult-to-cut materials in aerospace industry—a review // *Modern Manufacturing Processes for Aircraft Materials*, Elsevier, 2024, pp. 227–262.
7. Schille J., Schneider L., Streek A., et al. High-throughput machining using high average power ultrashort pulse lasers and ultrafast polygon scanner / ed. Klotzbach U., Washio K., Arnold C.B., 2016, p. 97360R.
8. Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Whitaker M.J., et al. Three-Dimensional Bioactive and Biodegradable Scaffolds Fabricated by Surface-Selective Laser Sintering // *Advanced Materials*, 2005, Vol. 17, № 3, pp. 327–330.
9. Kanczler J.M., Mirmalek-Sani S.H., Hanley N.A., et al. Biocompatibility and osteogenic potential of human fetal femur-derived cells on surface selective laser sintered scaffolds // *Acta Biomaterialia*, Elsevier, 2009, Vol. 5, № 6, pp. 2063–2071.
10. Antonov E.N., Krotova L.I., Minaev N. V, et al. Surface-selective laser sintering of thermolabile polymer particles using water as heating sensitizer // *Quantum Electronics*, 2015, Vol. 45, № 11, pp. 1023–1028.
11. Koch L., Deiwick A., Chichkov B. *Laser-Based Cell Printing* // *3D Printing and Biofabrication*, Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 1–27.
12. Chichkov B. Laser printing: trends and perspectives // *Applied Physics A*, 2022, Vol. 128, № 11, p. 1015.
13. Antoshin A.A., Churbanov S.N., Minaev N.V., et al. LIFT-bioprinting, is it worth it? // *Bioprinting*, Elsevier Ltd, 2019, Vol. 15, p. e00052.
14. Gettler B.C., Zakhari J.S., Gandhi P.S., et al. Formation of Adipose Stromal Vascular Fraction Cell-Laden Spheroids Using a Three-Dimensional Bioprinter and Superhydrophobic Surfaces // *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2017, Vol. 23, № 9, pp. 516–524.
15. Goulart E., de Caires-Junior L.C., Telles-Silva K.A., et al. 3D bioprinting of liver spheroids derived from human induced pluripotent stem cells sustain liver function and viability in vitro // *Biofabrication*, 2019, Vol. 12, № 1, p. 015010.
16. Aguilar I.N., Olivos D.J., Brinker A., et al. Scaffold-free bioprinting of mesenchymal stem cells using the Regenova printer: Spheroid characterization and osteogenic differentiation // *Bioprinting*, 2019, Vol. 15, p. e00050.

17. Chen K., Jiang E., Wei X., et al. The acoustic droplet printing of functional tumor microenvironments // *Lab on a Chip*, 2021, Vol. 21, № 8, pp. 1604–1612.
18. Минаев В.П. Лазерные Аппараты Для Хирургии И Силовой Терапии: Вчера, Сегодня, Завтра. *Лазерная Медицина*, 2012, Vol. 16, № 3, pp. 57–65.
19. Cui D., Sun F., Zhuo J., et al. A randomized trial comparing thulium laser resection to standard transurethral resection of the prostate for symptomatic benign prostatic hyperplasia: Four-year follow-up results // *World Journal of Urology*, 2014, Vol. 32, № 3, pp. 683–689.
20. Odde D.J., Renn M.J. Laser-guided direct writing for applications in biotechnology // *Trends in Biotechnology*, 1999, Vol. 17, № 10, pp. 385–389.
21. Ovsianikov A., Gruene M., Pflaum M., et al. Laser printing of cells into 3D scaffolds. *Biofabrication*, 2010, Vol. 2, № 1, p. 014104.
22. Minaev N. V., Yusupov V.I., Zhigarkov V.S., et al. Laser Printing of Gel Microdrops with Living Cells and Microorganisms. *KnE Energy*, 2018, Vol. 3, № 3, p. 23.
23. Yusupov V.I., Zhigar'kov V.S., Churbanova E.S., et al. Laser-induced transfer of gel microdroplets for cell printing // *Quantum Electronics*, 2017, Vol. 47, № 12, pp. 1158–1165.
24. Chrisey D.B. The Power of Direct Writing // *Science*, 2000, Vol. 289, № 5481, pp. 879–881.
25. Demina T.S., Popyrina T.N., Minaeva E.D., et al. Polylactide microparticles stabilized by chitosan graft-copolymer as building blocks for scaffold fabrication via surface-selective laser sintering // *Journal of Materials Research*, Springer International Publishing, 2022, Vol. 37, № 4, pp. 933–942.
26. Minaeva E.D., Antoshin A.A., Kosheleva N. V., et al. Laser Bioprinting with Cell Spheroids: Accurate and Gentle // *Micromachines*, 2023, Vol. 14, № 6, p. 1152.
27. Golipour H., Ezzatzadeh E., Sadeghianmaryan A. The fabrication and characterization of a novel antibacterial curcumin and TiO₂ loaded gelatin/silk fibroin: polycaprolactone scaffolds for skin tissue engineering // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2023, pp. 1–13.
28. Khorshidi S., Solouk A., Mirzadeh H., et al. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2016, Vol. 10, № 9, pp. 715–738.
29. Minaeva E.D., Kuryanova A.S., Dulyasova A.A., et al. Laser Technology of Directional Microstructuring of Biodegradable Nonwovens // *High Energy Chemistry*, 2022, Vol. 56, № 2, pp. 138–144.