

УДК 543.424.2

Хемометрический анализ биоимплантатов из твердой мозговой оболочки при их изготовлении

© 2019 г. П. Е. ТИМЧЕНКО*, КАНД. ФИЗ.-МАТ. НАУК; Е. В. ТИМЧЕНКО*, КАНД. ФИЗ.-МАТ. НАУК;
Л. Т. ВОЛОВА**, ДОКТОР МЕД. НАУК; Н. В. ВОЛОВ**, КАНД. МЕД. НАУК;
О. О. ФРОЛОВ*, СТУДЕНТ

*Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королёва, Самара

**Самарский государственный медицинский университет, институт экспериментальной медицины и биотехнологий, Самара

E-mail: laser-optics.timchenko@mail.ru

Поступила в редакцию 17.09.2018

DOI:10.17586/1023-5086-2019-86-01-13-20

Представлены результаты сравнительной спектральной оценки компонентного состава поверхностей образцов имплантатов на основе твердой мозговой оболочки, изготовленных по технологии «Лиопласт»[®], с ультразвуковой обработкой и без нее. В качестве основного метода контроля выбран метод спектроскопии комбинационного рассеяния. В результате проведенных исследований предложены критерии, позволяющие оценить относительную концентрацию основных компонентов экстрацеллюлярного матрикса. Показано, что деконволюция спектров методом подбора спектрального контура и хемометрический анализ методом главных компонент позволяют провести расширенный компонентный качественный и количественный анализ биоимплантатов на основе твердой мозговой оболочки по содержанию основных показателей биоматрикса и установить наиболее репрезентативные параметры, влияющие на качество имплантатов при экспрессной оценке.

Ключевые слова: спектроскопия комбинационного рассеяния, оптические коэффициенты, твердая мозговая оболочка, ультразвуковая обработка.

Коды OCIS: 300.6450, 160.1435, 170.6510

ВВЕДЕНИЕ

Биоимплантаты из тканей человека на основе твердой мозговой оболочки широко используются для реконструкции и восстановления структуры опорных и соединительных тканей реципиента.

В настоящее время в мировой стоматологической практике особую актуальность приобретает лечение атрофии мягких тканей десны в области обнаженных шеек зубов — так называемых рецессий десны. Их распространенность, по данным зарубежных авторов, увеличивается с возрастом с 38% в возрастной группе 30–39 лет до 90% в возрастной группе 80–90 лет [1].

Рецессии десны бывают как единичные, так и множественные: по данным ВОЗ единичные составляют 69,3%, множественные наблюдаются в 71,4% случаев [2]. Лечение рецессий проводят с целью стабилизации некариозно-измененных зубов, снижения болевой и температурной чув-

ствительности, улучшения внешнего вида зубного ряда [3].

За последние 30 лет были разработаны и предложены операции как без применения пластического материала, так и с ним. Тенденцией последних лет стало применение в клинической практике способа коронального смещения лоскута для устранения одиночных и множественных рецессий десны. Среди существующих технологий устранения множественных рецессий наименее травматичной является операция *Zucchelli* [4].

При этом золотым стандартом на сегодняшний день остается пересадка свободного соединительно-тканного лоскута, взятого с твердого неба самого больного. Однако такая операция сопровождается образованием еще одной раневой поверхности, что создает определенный дискомфорт пациенту, а ограниченный объем аутоотрансплантата не позволяет проводить лечение множественных

рецессий. С этих позиций применение в качестве пластического материала биоимплантатов аллогенного происхождения наиболее перспективно.

Одним из путей решения устранения рецессий является использование твердой мозговой оболочки (ТМО) человека, изготовленной по оригинальной отечественной технологии «Лиопласт»® (ТУ-9398-001-01963143-2004). Применение ТМО в данном случае является оптимальным для лечения множественных рецессий [5].

Успешный результат таких операций зависит от качества и технологии производства биоимплантатов, направленной на сохранение необходимых биологических веществ, участвующих в регенеративном процессе, таких как коллаген, гликозаминогликаны, протеогликаны [6–8], и на удаление клеточных компонентов ДНК/РНК (дезоксирибонуклеиновая кислота/рибонуклеиновая кислота) – основного фактора антигенности.

Применение ТМО также перспективно в пластической хирургии в качестве «камуфляжа» при исправлении деформаций спинки носа [9].

В процессе изготовления биоимплантатов необходим постоянный мониторинг их качества с оценкой органической составляющей. Для этого применение оптических методов весьма перспективно, так как они могут использоваться как скрининговые, быстро выполняемые, малозатратные, без разрушения представленных образцов [10, 11].

Среди физических методов широкое применение для контроля имплантатов из ТМО нашла растровая электронная микроскопия [12], рентгеновская спектроскопия [13] и спектроскопия комбинационного рассеяния (СКР) [14–16], которая имеет определенные преимущества и позволяет в реальном времени проводить неразрушающий, количественный и качественный анализ состава биологических объектов с высоким пространственным разрешением.

Так, в исследовании [17] были изучены менингиома и здоровая ТМО с помощью микроспектроскопии для оценки возможности разработки метода *in vivo*. В результате было установлено, что СКР позволяет дифференцировать ТМО и опухолевые ткани. Основные различия ТМО по сравнению с опухолевыми тканями проявляются в высоком содержании коллагена.

Целью настоящей работы являлась качественная и количественная оценка имплантатов из ТМО по технологии «Лиопласт»® в процессе их изготовления методом СКР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве основного метода анализа биоимплантатов был использован метод СКР, реализуемый с помощью экспериментального стенда, включаю-

щего рамановский пробник RPB-785 (фокусное расстояние 7,5 мм), совмещенный с лазерным модулем *LuxxMaster LML-785.0RB-04* (мощность до 500 мВт, длина волны $784,7 \pm 0,05$ нм) и высокоразрешающий цифровой спектрометр *Shamrock sr-303i*, обеспечивающий спектральное разрешение 0,15 нм, со встроенной охлаждаемой камерой DV420A-OE [18] (спектральный диапазон 200–1200 нм). Спектры регистрировались в семи различных точках каждого образца.

Объектами исследования являлись 12 образцов ТМО наружной оболочки размером 10×10 мм. Все образцы были разделены на 2 группы: 1-я группа — образцы, обработанные ультразвуком, 2-я группа — образцы без обработки ультразвуком.

На первом этапе производства биоимплантатов из ТМО по технологии «Лиопласт»® биоматериалы подвергались специальной ультразвуковой очистке от антигенных структур (жир, кровь, клетки ТМО) для проведения первичной стерилизации материала и вирусной инактивации. После этого ткани лиофилизировались, а затем на заключительном этапе герметично упакованный материал стерилизовался радиационным методом. Химическое воздействие при изготовлении сводилось к минимуму для снижения аллергических реакций и осложнений.

Обработка спектров комбинационного рассеяния (КР) проводилась в программной среде *Wolfram Mathematica 10* и заключалась в удалении шумов сглаживающим медианным фильтром по 7 точкам. Затем в выбранном интервале $300\text{--}2200\text{ см}^{-1}$ с помощью итерационного алгоритма [19, 20] определялась аппроксимирующая линия (полином 7-й степени) автофлуоресцентной составляющей, после чего эта составляющая вычиталась для выделения спектра КР. Погрешность используемых коэффициентов не превышала 4% [16].

Метод моделирования спектрального контура для повышения информативности спектров был реализован в программной среде *MagicPlotPro 2.7.2*, где проводилось разложение спектра на линии, описываемые функцией Гаусса [21]. Дальнейший хемометрический анализ с помощью метода главных компонент (РСА) реализован в программной среде *The Unscrambler X*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ спектров комбинационного рассеяния

Характерные усредненные по 12 образцам спектры КР двух групп образцов ТМО в области $750\text{--}2000\text{ см}^{-1}$ представлены на рис. 1. Основные различия проявляются в линиях КР 929, 1002, 1030, 1080, 1102, 1167, 1660 и 1738 см^{-1} . Анализ спектров КР представлен в таблице.

Спектральные линии КР, характерные для образцов ТМО

Рамановский частотный сдвиг, см^{-1}	Фрагмент, колебание
814	РНК/ДНК ($\text{C}'_5\text{-O-P-O-C}'_3$ валентное) [22]
856, 870	Бензольное кольцо пролина, гидроксипролина (коллагеновая группа) (C–C валентное) [7]
898	Моносахариды (β -глюкоза) (C–O–C) [23]
929	Аминокислоты пролин и валин (протеиновая группа) (C–C валентное) [24]
964	Липиды (протеиновая группа) [25]
1002	Ароматическое кольцо фенилаланина $\nu_s(\text{C-C})$, (коллагеновая группа) [7]
1030	Фенилаланин CH_2CH_3 (протеиновая группа) [7]
1062	Гликозамингликаны (GAGs) (O-SO_3^- симметричное валентное сульфатной группы) [25]
1080	Фосфолипиды (PO_2 симметричное) (C–C валентное) [26]
1102	Фенилаланин (протеиновая группа) [27]
1134	Фосфолипиды и жирные кислоты (протеиновая группа) [28]
1167	Гликозамингликаны (GAGs), протеогликины (CSPGs) [7]
1204	Тирозин (коллагеновая группа) [7]
1230–1280	Амид III (C–N–H валентное) (деформационное колебание N–H, валентное C–N) (пептидная связь) [7]
1298	Жирные кислоты [28]
1390	CH_3 деформации ДНК
1420	Дезоксирибоза [29]
1440–1447	Липиды и жирные кислоты (коллагеновая группа) [7]
1555–1565	Амид II (C–N–H валентное) (деформационное колебание N–H) (пептидная связь) [7]
1600	Тирозин $\delta(\text{C=C})$ (протеиновая группа) [30]
1655–1675	Амид I (C=O валентное) (пептидная связь) [7]
1738	Фосфолипиды, жирные кислоты (C=O сложноэфирная группа) [7]

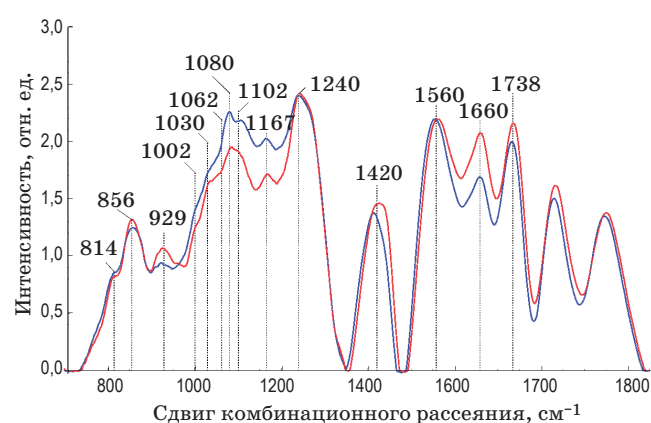


Рис. 1. Усредненные нормализованные спектры КР образцов ТМО с ультразвуковой обработкой (синие) и без нее (красные).

Интенсивность линии, соответствующей фосфолипидам (1738 см^{-1}), уменьшается в результате ультразвуковой обработки, что говорит о ее влиянии на данный компонент биоматрикса.

Коллагеновая составляющая, помимо линий КР пролина и гидроксипролина, представлена группами амида III (в области $1230\text{--}1280 \text{ см}^{-1}$), амида II ($1555\text{--}1565 \text{ см}^{-1}$) и амида I ($1655\text{--}1675 \text{ см}^{-1}$), а также линиями КР 1002 , 1030 и 1102 см^{-1} , соответствующими колебаниям фенилаланина.

Во всех группах образцов также присутствует линия КР 814 см^{-1} , соответствующая фосфоэфирной связи ДНК/РНК, что возможно свидетельствует о разрушении ядер и неполном выводе из образцов остатков ДНК/РНК.

Анализ спектральных линий в области $1000\text{--}1300 \text{ см}^{-1}$ затруднителен без их разделения. То есть, для получения более детальной информации следует использовать математические методы обработки, позволяющие повысить информативность спектров КР.

Разделение спектральных контуров

С помощью подбора спектрального контура и деконволюции функции Гаусса в программной среде MagicPlotPro 2.7.2 был проведен нелинейный

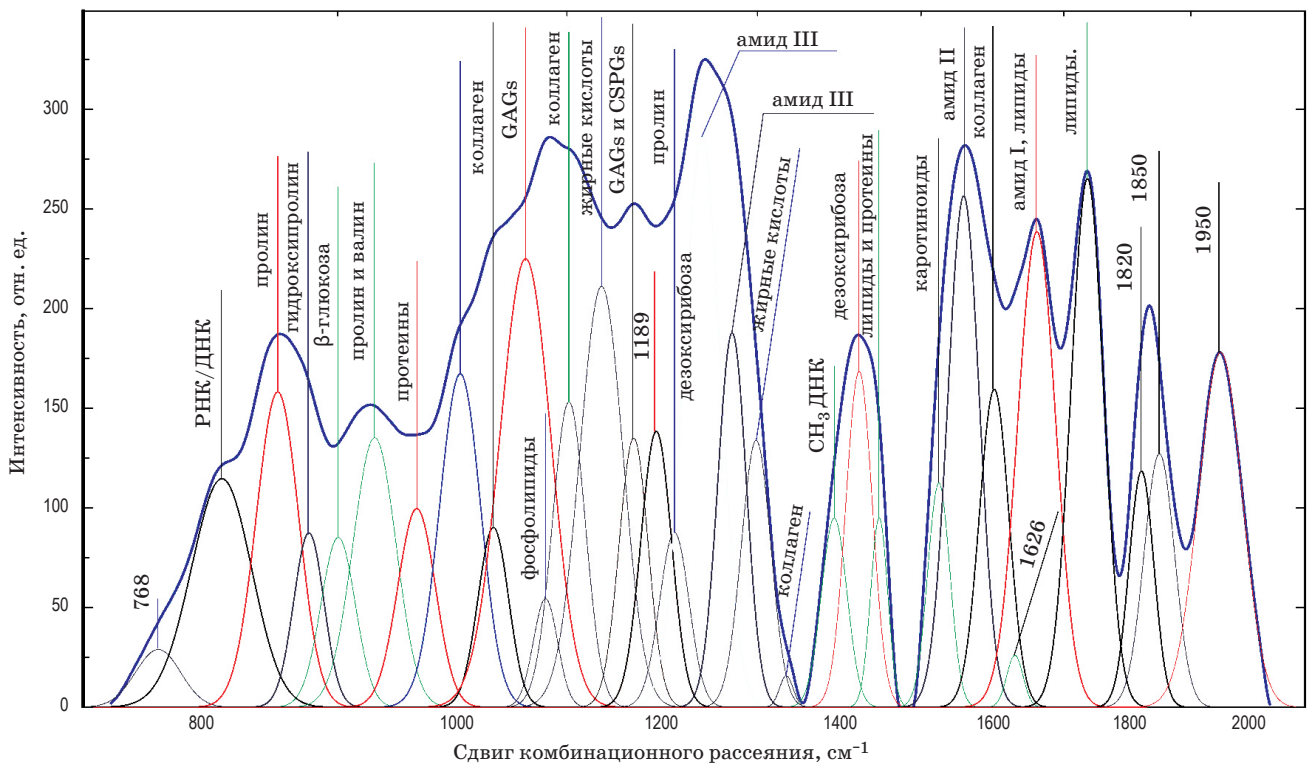


Рис. 2. Моделирование спектрального контура, характерного для образцов ТМО.

регрессионный анализ спектров КР, состоящий в их разложении на спектральные линии (рис. 2). В качестве пробной использовалась функция Гаусса, описываемая формулой [21]

$$y = a \exp \left[-\ln(2) \left(\frac{x - x_0}{dx} \right)^2 \right],$$

где a – амплитуда, dx – полуширина на уровне половинной амплитуды, x_0 – положение максимума.

Критериальной переменной являлась амплитуда линий, которая зависит от независимых переменных (регрессоров) dx и x_0 , определяющих начальные условия анализа. Среднее значение коэффициента детерминации результирующего спектра, смоделированного с помощью пробных функций исходного спектра КР в области 750–2050 см^{-1} , составляет $R^2 = 0,997$.

Степень обработки и качество имплантатов определяется полнотой удаления клеточных компонентов (ДНК, РНК) и сохранностью созданного экстраклеточного матрикса, основными компонентами которого являются коллаген, гликозаминогликаны, протеогликианы [7]. Качество имплантата напрямую зависит от содержания в нем данных компонентов.

Наибольший интерес при анализе спектров КР представляют линии 1420 и 814 см^{-1} (ДНК, РНК), 856 и 929 см^{-1} (пролин), 1062 и 1167 см^{-1} (GAGs, CSPGs), 1240 см^{-1} (амид III), 1560 см^{-1} (амид II),

1660 см^{-1} (амид I и липиды), 1080, 1440, 1738 и 1134 см^{-1} (липиды и жирные кислоты).

Следует отметить, что нелинейный регрессионный анализ спектральной кривой имеет ограничения, связанные с разрешением спектральных линий, поэтому достоверное разделение линий с перекрытием менее 10 см^{-1} не представляется возможным [28].

Для контроля этих параметров и более полной относительной количественной оценки компонентного состава поверхности биоимплантатов на основе ТМО были введены относительные коэффициенты. Относительно постоянной линии в исследуемых образцах ТМО являлся амид II [7] (рис. 1) 1560 см^{-1} , поэтому амплитуда этой разделенной линии использовалась в качестве знаменателя (I_{1560}) во введенных коэффициентах (k)

$$k_i = \frac{I_i}{I_{1560}},$$

где I_i – интенсивность спектральных линий анализируемых компонентов.

Хемометрический анализ методом главных компонент

Для анализа этих данных был выбран метод главных компонент, который используется для выявления скрытой структуры в больших массивах данных. Он обеспечивает визуальное представление

взаимосвязей между выборками и переменными и дает представление о том, как измеряемые переменные выявляют сходство или различия некоторых выборок между ними. Большие матрицы данных обычно содержат и большой объем информации. Эта информация может быть частично скрыта, поскольку данные слишком сложны, чтобы их можно было легко интерпретировать.

Данный метод реализован в программной среде The Unscrambler X. Используемый алгоритм для PCA описан в работе [31]. Результаты PCA представлены в виде набора данных: график счетов (рис. 3), график нагрузок (рис. 4) и разъясненная дисперсия.

Разъясненная дисперсия показывает, какая часть данных описывается моделью и выражает долю информации, описываемую созданной моделью, т.е. насколько хорошо модель подходит для описания этих данных. В идеале стремятся получить простые модели, где остаточная дисперсия близка к нулю с минимальным количеством главных компонент. Если это не так, значит, данные были сильно зашумлены или структура данных слишком сложна, чтобы учитываться небольшим количеством компонент.

В нашем случае главная компонента PC-1 несет в себе 41% информации, описываемой моделью (рис. 3), поэтому при дальнейшем анализе

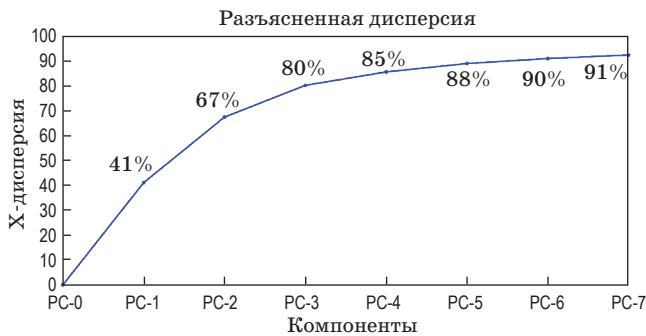


Рис. 3. График разъясненной дисперсии модели, описывающей спектры КР образцов ТМО.

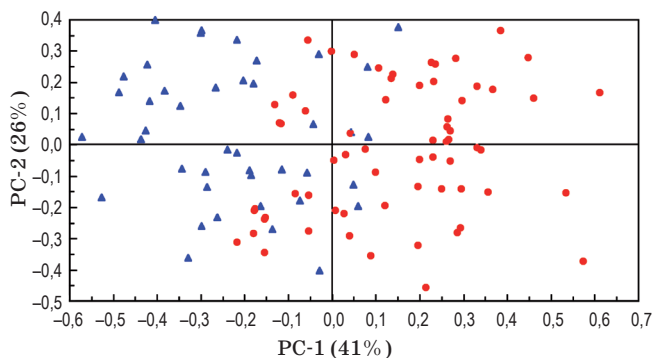


Рис. 4. График счетов спектров КР образцов ТМО с ультразвуковой обработкой (синие) и без нее (красные).

будет учитываться только PC-1. Компонента PC-2 в дальнейшем анализе не учитывается, поскольку, как видно из рис. 4 и 5, отсутствует информация, позволяющая интерпретировать ее физический смысл. Анализ последующих главных компонент PC-3–PC-7 также затруднителен ввиду сложной структуры данных и существования других неучтенных факторов, влияющих на количественный компонентный состав (шумы).

График счетов описывает структуру данных и, как правило, показывает различия или сходство между группами образцов. Рисунок 4 показывает, что основные отличия между двумя группами образцов описывает главная компонента PC-1. Положительные значения PC-1 в главной степени характерны для образцов без ультразвуковой обработки и наоборот отрицательные – для образцов с ультразвуковой обработкой. Также на графике имеется область, в которой лежат счета образцов обеих групп, что говорит не только о различии, но и о сходстве по некоторым признакам (переменным), в нашем случае – относительной интенсивности спектральных линий, соответствующих компонентам биоматрикса образцов ТМО.

Нагрузки описывают структуру данных в виде вклада переменных в нагрузку на каждый PC и отражают, насколько хорошо PC учитывает вариацию значений переменных.

Из анализа рис. 4 и 5 и выходных данных PCA можно сделать следующие выводы:

Различия между группами образцов описывают коэффициенты, отражающие относительную интенсивность линий 1660 см^{-1} (амид I), 1440 см^{-1} (липиды), 1738 см^{-1} (фосфолипиды), $856, 929\text{ см}^{-1}$ (пролин), 1600 см^{-1} (фенилаланин). Эти переменные имеют большие значения в образцах без ультразвуковой обработки. Для образцов с ультразвуковой обработкой характерны более высокие значения переменных, лежащих в области I: 1134 см^{-1} (жирные кислоты), 1204 см^{-1} (пролин), 1080 см^{-1} (фосфолипиды), 1062 и 1167 см^{-1} (GAGs), 1002 см^{-1} (фенилаланин). При этом, чем выше значение PC-1 переменной, тем в большей степени она влияет на наблюдаемую разницу в компонентном составе, что, например, видно из значения коэффициента k_{1134} . Из рис. 5 видно, что интенсивность спектральной линии 1134 см^{-1} , соответствующей колебаниям жирных кислот и липидов, выше у образцов с ультразвуковой обработкой. Исходя из этого, поле данных на рис. 5 и было разделено на три области, где II – переходная область, содержащая компоненты биоматрикса, не изменяющиеся в процессе ультразвуковой обработки и характерные для обеих групп образцов. Из-за более высокой погрешности разделения спектральных линий $1189, 1298, 1390$ и 1524 см^{-1} соответствующие им коэффициенты не рассматриваются в дальнейшем анализе.

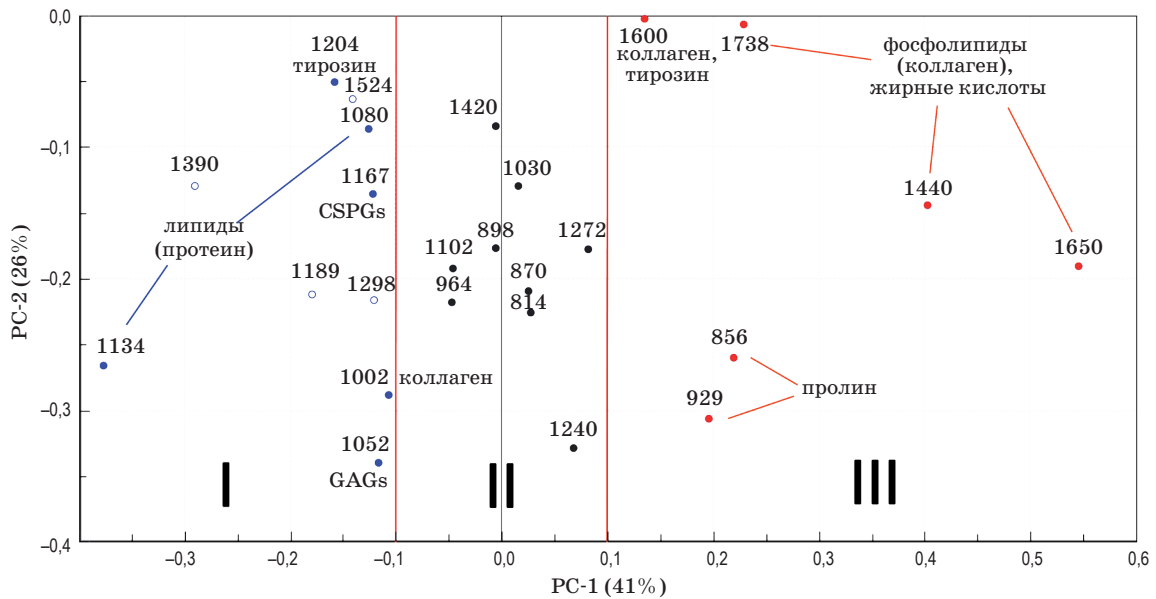


Рис. 5. График нагрузок спектральных линий спектров КР образцов ТМО. I – область, содержащая компоненты биоматрикса, преобладающие в группе образцов с обработкой ультразвуком, II – переходная область, где находятся неизменяющиеся компоненты, III – область, содержащая компоненты биоматрикса, преобладающие в группе образцов, не прошедших ультразвуковую обработку.

Двумерный анализ введенных коэффициентов

Результаты подробного анализа приведены на рис. 6, где представлены двумерные диаграммы введенных коэффициентов, на которых видны различия и сходства между образцами двух групп.

На рис. 6а представлены характерные области групп образцов и видно, что коэффициенты k_{1738} , k_{1440} , отражающие относительную концентрацию жирных кислот, у образцов с обработкой ультразвуком больше, чем у группы образцов без нее, что говорит о деструктивном воздействии ультразвуковой обработки на жирные кислоты. Однако значения коэффициентов k_{1134} и k_{1080} (рис. 6б), отражающих относительную концентрацию протеиновых фосфолипидов, характерных для группы образцов с обработкой, выше, чем без нее, что может быть связано с остаточной (менее 1%) концентрацией липидов и жиров в связи с неполным их удалением.

На рис. 7 представлены значения оптических коэффициентов k_{1002} , отражающих относительную концентрацию фенилаланина в составе коллагена и протеинов, входящих в биоматрикс ТМО. С учетом данных рис. 5 можно сказать, что отличия между двумя группами по этим трем признакам минимальны, т.е. ультразвуковая обработка в меньшей степени влияет на концентрацию фенилаланина.

Рисунок 8 показывает, что амплитуды линий 814 и 1420 см^{-1} , соответствующие ДНК/РНК, в процессе ультразвуковой обработки остаются практически неизменными, что говорит о невозможности полного вывода остатков этих кислот из образцов первичной стерилизацией ультразвуком.

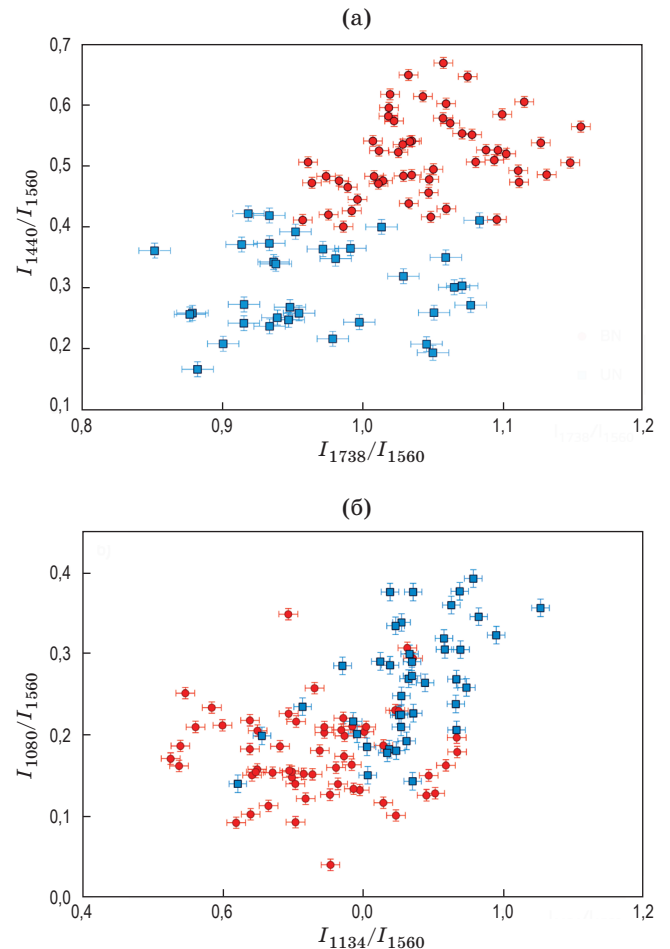


Рис. 6. Двумерные диаграммы введенных коэффициентов I_{1440}/I_{1560} и I_{1738}/I_{1560} (а), I_{1080}/I_{1560} и I_{1134}/I_{1560} (б) образцов ТМО с ультразвуковой обработкой (голубые) и без нее (красные).

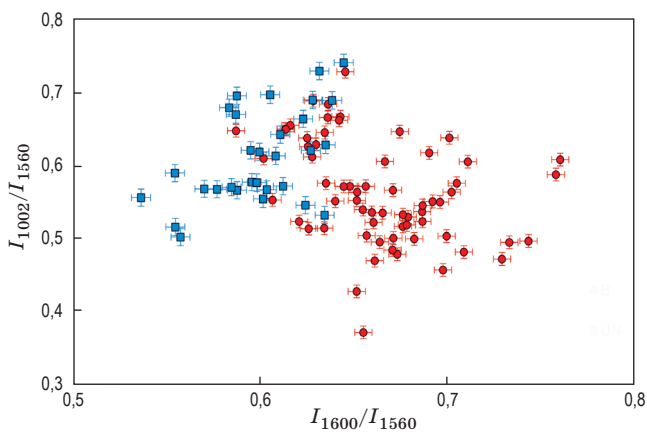


Рис. 7. Двумерные диаграммы введенных коэффициентов I_{1002}/I_{1560} и I_{1600}/I_{1560} образцов ТМО с ультразвуковой обработкой (голубые) и без нее (красные).

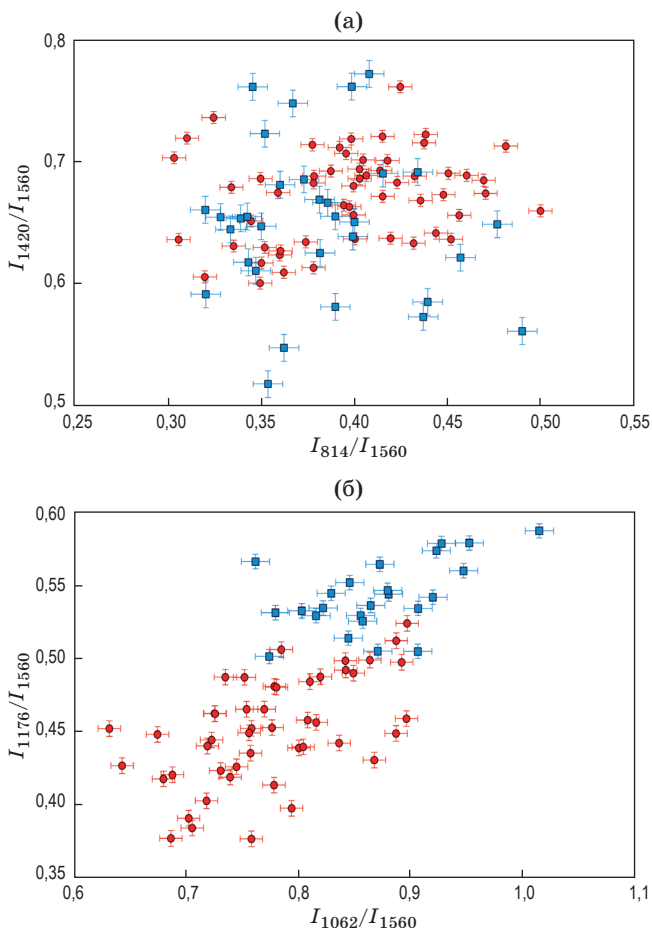


Рис. 8. Двумерные диаграммы введенных коэффициентов I_{1420}/I_{1560} и I_{814}/I_{1560} (а), I_{1176}/I_{1560} и I_{1062}/I_{1560} (б) образцов ТМО с ультразвуковой обработкой (голубые) и без нее (красные).

Значения коэффициентов, отражающих относительную концентрацию гликозаминогликанов и протеогликанов, I_{1062}/I_{1660} и I_{1167}/I_{1660} , варьируются в пределах $0,75 < I_{1062}/I_{1660} < 1$ и $0,5 < I_{1167}/I_{1660} < 0,6$ у образцов, обработан-

ных ультразвуком, и $0,6 < I_{1062}/I_{1660} < 0,9$ и $0,35 < I_{1167}/I_{1660} < 0,5$ без ультразвуковой обработки по технологии «Лиопласт»® (рис. 8б), что отражает рост относительной концентрации GAGs, CSPGs по отношению к коллагеновым структурам (амид II) при изготовлении и указывает на сохранность компонентов, играющих важную роль в процессе приживляемости имплантата, и, следовательно, на получение качественного экстраклеточного матрикса.

Таким образом, при использовании анализа спектров КР математическими методами улучшения разрешения спектральных контуров и хемометрическим анализом PCA для оценки имплантатов, изготовленных на основе ТМО, показано, что при их обработке удаляются компоненты, негативно влияющие на их качество, при этом сохраняется необходимый уровень экстраклеточного матрикса: гликозаминогликанов, коллагенов, пролинов, гидроксипролинов и фенилаланинов.

Применение низкочастотного ультразвука на этапах обработки биоимплантатов позволяет добиться удаления липидов, что нашло подтверждение в спектральной характеристике поверхностей исследуемых образцов биоимплантатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена сравнительная спектральная оценка компонентного состава поверхностей образцов имплантатов на основе твердой мозговой оболочки, изготовленных по технологии «Лиопласт»®, с ультразвуковой обработкой и без нее.

Деконволюция спектров методом подбора спектрального контура и хемометрический анализ методом главных компонент позволяют провести расширенный компонентный качественный и количественный анализ биоимплантатов на основе твердой мозговой оболочки по содержанию основных показателей биоматрикса: коллагенов, протеинов, гликозаминогликанов, протеогликанов, ДНК/РНК и установить наиболее репрезентативные параметры, влияющие на качество имплантатов при экспрессной оценке.

Установлено, что основные различия проявляются в линиях КР $1440, 1738, 1660 \text{ см}^{-1}$ (липиды и жирные кислоты), 856 и 929 см^{-1} (пролин), 1062 и 1167 см^{-1} (GAGs, CSPGs), 1204 см^{-1} (тирозин).

Введены коэффициенты и проведен двумерный анализ, который показал, что при ультразвуковой обработке сохраняются основные компоненты экстраклеточного матрикса и удаляются липиды, что повышает качество материала и обеспечивает возможность хорошего клинического эффекта при лечении множественных рецессий десны и пластики спинки носа.

Исследования проводились при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект 17-44-630343 p_a.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Moavia M.K., Robert E.C.* The etiology and prevalence of gingival recession // J. American Dental Association. 2003. № 134. С. 220–225.
2. *Вольф Г.Ф., Эдит М., Ратейцхак К.* Пародонтология. М.: МЕДпресс-информ, 2008. 548 с.
3. *Александровская И.Ю.* Планирование лечебных мероприятий при заболеваниях пародонта. М.: Медицинское информационное агентство, 2010. 56 с.
4. *Zucchelli G., De Sanctis M.J.* Treatment of multiple recession-type defects in patients with esthetic demands // J. Periodontol. 2000. V. 71. № 9. P. 1506–1514.
5. *Носова М.А.* Эффективность операции коронального смещения с пластикой твердой мозговой оболочкой «Лиопласт» для устранения множественных рецессий десны // Аспирантский вестник Поволжья. 2016. № 5–6. С. 103–106.
6. *Носова М.А., Шаров А.Н., Волова Л.Т.* Способ хирургического лечения множественных рецессий десны // Патент России № 2648855. 2018.
7. *Chen H., Xu P.W., Broderick N.* In vivo spinal nerve sensing in MISS using Raman spectroscopy // Proc. SPIE. 2016. V. 9802. P. 98021L-1–98021L-7.
8. *Chen J.L., Duan L., Zhu W.* Extracellular matrix production in vitro in cartilage tissue engineering // J. Transl. Med. 2014. V. 12. № 88. doi:[10.1186/1479-5876-12-98].
9. *Волова Л.Т., Максименко Н.А., Волов Н.В.* Способ пластики спинки носа // Патент России № 2631744. 2017.
10. *Timchenko E.V., Tregub N.V., Taskina L.A., Selezneva E.A., Timchenko P.E.* Optical methods for control of hydrogen influence on plants // Proc. SPIE. Remote Sensing and Modeling of Ecosystems for Sustainability XI. 2014. V. 9221. P. 922108.
11. *Zaharov V.P., Timchenko E.V., Timchenko P.E., Zolotuhina A.D., Alembekov S.V.* Alteration of hydrosphere optical properties by synthetic active compounds // Computer Optics. 2011. V. 35. № 2. P. 238–242.
12. *Колосов В.Ю.* Исследование наноматериалов методами сканирующей электронной микроскопии: методические указания. Екатеринбург: изд. Уральского государственного университета им. А.М. Горького, 2008. 17 с.
13. *Гюлдстейн Дж.* Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ. М.: Мир, 1984. 305 с.
14. *Koljenovic S., Schut T.B., Vincent A., Kros J.M., Puppels G.J.* Detection of meningioma in dura mater by Raman spectroscopy // Analyt. Chem. 2005. V. 77. № 24. P. 7958–7965.
15. *Anderson T.A., Kang J.W., Gubin T., Dasari R.R.* Raman spectroscopy differentiates each tissue from the skin to the spinal cord: A novel method for epidural needle placement // Anesthesiology. 2016. V. 125. № 4. P. 793–804.
16. *Timchenko P.E., Timchenko E.V., Pisareva E.V., Vlasov M.Yu., Red'kin N.A., Frolov O.O.* Spectral analysis of allogeneic hydroxyapatite powders // IOP Conf. Series: J. Phys.: Conf. Series. 2017. V. 784. P. 012060.
17. *Koljenovic S., Schut T.B., Vincent A.* Detection of meningioma in dura mater by Raman spectroscopy // Analyt. Chem. 2005. V. 77. № 24. P. 7958–7965.
18. *Timchenko E.V., Timchenko P.E., Volova L.T., Pershuthkina S.V., Shalkovsky P.Y.* Optical analysis of aortic implants // Optical Memory and Neural Networks. 2016. V. 25. № 3. P. 192–197.
19. *Zhao J., Lui H., McLean D.I., Zeng H.* Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy // Appl. Spectrosc. 2007. V. 61. P. 1225–1232.
20. *Timchenko E.V., Timchenko P.E., Volova L.T., Dolgushkin D.A., Shalkovsky P.Y., Pershuthkina S.V.* Detailed spectral analysis of decellularized skin implants // J. Phys.: Conf. Series. 2016. V. 737. № 012050. P. 1–4.
21. *Motulsky H.J., Christopoulos A.* Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. GraphPad Software Inc. San Diego CA., 2003. 352 p.
22. *Thomas G.J.* Raman spectroscopy of viruses and protein-nucleic acid interactions // The SPEX Speaker Industries Inc. 1976. V. 21 № 4. P. 1–12
23. *Shetty G., Kedall C., Shepherd N., Stone N., Barr H.* Raman spectroscopy: Evaluation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus // British J. Cancer. 2006. V. 94. P. 1460–1464.
24. *Cristina M.M., Halmagyi A., Mircea D.P., Ioana P.* FT-Raman signatures of genomic DNA from plant tissues // Spectroscopy. 2009. V. 23. P. 59–70.
25. *Rudd T.R., Hussain R., Siligardi G., Yates E.A.* Raman and Raman optical activity of glycosaminoglycans // Chem. Commun. 2010 V. 46. № 23 P. 4124–4126.
26. *Malini R., Venkatakrishma K., Kurien J.* Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study // Biopolymers. 2006. V. 81. № 3. P. 179–193.
27. *Lakshimi R.J., Kartha V.B., Krishna C.M., Solomon J.G.R., Ullas G.* Tissue Raman spectroscopy for the study of radiation damage: Brain irradiation of mice // Radiation Research. 2002. V. 157. P. 175–182.
28. *Krafft C., Neudert L., Simat T., Salzer R.* Near infrared Raman spectra of human brain lipids // Spectrochimica. 2005. V. 61. P. 1529–1535.
29. *Ruiz-Chica A.J., Medina M.A., Sanchez-Jimenez F., Ramirez F.J.* Characterization by Raman spectroscopy of conformational changes on guanine-cytosine and adenine-thymine oligonucleotides induced by aminoxy analogues of spermidine // J. Raman Spectroscopy. 2004. V. 35. P. 93–100.
30. *Cheng W.-T., Liu M.-T., Liu H.-N., Lin S.-Y.* Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatricoma // Microscopy Research and Technique. 2005. V. 68. P. 75–79.
31. *Martens H., Naes T.* Multivariate calibration. Wiley, 1991. 419 p.