

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САРАТОВСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра материаловедения, технологии
и управления качеством

**ФОРМИРОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К УЛЬТРАЗВУКОВОМУ
ВОЗДЕЙСТВИЮ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОКАПСУЛ МЕТОДОМ
КОАКСИАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 3 курса 322 группы

по направлению 22.03.01 «Материаловедение и технология материалов»

факультета нано- и биомедицинских технологий

Некрашевича Павла Альбертовича

Научный руководитель

профессор, д.х.н

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

Д.А. Горин

инициалы, фамилия

Консультант

ведущий ученый, к.ф.-м.н.

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

Г.Б. Сухоруков

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой

профессор, д.ф.-м.н.

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

С.Б. Вениг

инициалы, фамилия

Саратов 2018

Введение. Разработка материалов и эффективных методов для диагностики и терапии заболеваний (в т.ч. онкологических) является одним из перспективных направлений в области науки исследований современной медицины. Проблематика, связанная с данным направлением, это создание эффективных систем для адресной доставки терапевтических веществ, а также способных осуществлять контролируемое высвобождение лекарственного препарата в очаге заболевания. При нахождении решения существующей проблемы, имеется возможность повысить терапевтический эффект лекарственных препаратов и значительно уменьшить нежелательные (побочные) эффекты от их применения [1].

Адресная доставка терапевтических препаратов может осуществляться при помощи разнообразных видов и типов контейнеров (капсул) микро-и субмикронного размера, физико-химические свойства которых соответствуют для инкапсуляции активных веществ: полимерные мицеллы; липосомы; микрокапсулы, изготовленные из полиэлектролитов по «layer-by-layer» технологии; рН-чувствительные носители; антитела, обеспечивающие селективную сорбцию капсул на поверхность раковых клеток [2-4]. Однако, использование данных наноструктурированных систем затруднено высокой стоимостью и существенными временными затратами на их изготовление, кроме того, данные объекты требуется хранить в особых условиях, чтобы сохранить структуру и стабильность микро-и нанокапсул [3]. В связи с этим, целесообразно использовать более стабильные материалы на основе биосовместимых и биodeградируемых полимеров и сополимеров, для формирования оболочки капсул микро-и субмикронного размера.

Исходя из предложенных в периодической литературе методик формирования микрокапсул наиболее актуальным является способ формирования микрокапсул из биodeградируемых полимеров, а также загрузки активных веществ в их объем, является метод коаксиального электrorаспыления (КЭ) [4, 5]. Данная методика позволяет регулировать размер формируемых микрокапсул, толщину оболочки, объем загружаемого вещества за счет

регулировки рабочих параметров (величина приложенного высокого напряжения, объемный расход компонентов, рабочее расстояние между форсункой и коллектором и т.д.), а также регулируя свойства используемых компонентов (вязкость, концентрация, молекулярный вес и пр.). Используя данную методику, можно оптимизировать процесс формирования микрокапсул и инкапсуляции в их объем активных веществ [5].

Потенциальное использование капсул микро-и субмикронного размера на основе данных полимеров в биомедицинских целях требует решение следующих задач: 1) возможность включения биологически-активных веществ и структур в объем или в оболочку микрокапсул с целью изоляции их от организма при неконтролируемом воздействии, а также обеспечение их возможного пролонгированного действия; 2) обеспечение дистанционно - контролируемого высвобождения инкапсулируемого вещества в непосредственной близости от пораженных участков органов, тканей, сосудов и др.; 3) модификация свойств микрокапсул с целью их адресной доставки к поврежденным органам, тканям, сосудам и др., а также их локализация в строго заданном объеме или области.

Для достижения результата необходимо иметь способ, технологию (механизм) высвобождения активного вещества из внутреннего объема (ядра) микрокапсул. Воздействовать оболочку микрокапсул, чтобы повысить ее проницаемость и снизить время деградации, можно различными способами, но среди них актуальным является ультразвуковое излучение. В медицине ультразвук актуален в качестве средства диагностики заболеваний различной природы и их терапии (сонодинамическая терапия, HIFU-хирургия неинвазивного типа и ультразвуковая гипертермия). Чтобы добиться разрушения капсул микро-и субмикронного размера при меньших мощностях и более высоких частотах ультразвука можно путем внедрения структур – соносенсибилизаторов в структуру оболочки (в том числе и варьировать их объемную фракцию), а также учитывать особенности используемых полимеров. Учитывая физико-химические свойства материалов и их прочностные

характеристики, можно управлять их чувствительностью к ультразвуку, а следовательно, их проницаемостью [7-11].

. Целью бакалаврской работы являлась апробация получения нанокompозитных микрокапсул, чувствительных к ультразвуковому воздействию, методом коаксиального электрораспыления.

Основными задачами бакалаврской работы являлись:

1. Анализ научной периодической литературы по следующим направлениями: природа ультразвука, описание процессов и его параметры; применение ультразвука в науке и медицине; способы получения нанокompозитных микрокапсул (недостатки и преимущества); получение нанокompозитных микрокапсул по технологии «layer-by-layer» и методом коаксиального электрораспыления (анализ и сравнение); факторы, влияющие на разрушение нанокompозитной оболочки микрокапсул под действием ультразвука; фоносенсбилизаторы и их параметры;

2. Создание лабораторно-экспериментальной установки для формирования нанокompозитных микрокапсул методом коаксиального электрораспыления и определение оптимальных параметров их получения;

3. Получение нанокompозитных микрокапсул методом коаксиального электрораспыления и инкапсуляция в их объем флуоресцентного агента, имитирующего терапевтическое вещество;

4. Создание лабораторно-экспериментальной установки для изучения влияния ультразвука на оболочку микрокапсул;

5. Изучение морфологии микрокапсул до и после воздействия на них ультразвука;

6. Определение эффективности выхода инкапсулируемого вещества (флуоресцентного агента) из объема микрокапсул после облучения их ультразвуком.

Бакалаврская работа состоит из введения, четырех разделов, заключения и списка использованных источников.

Первый раздел бакалаврской работы представляет собой описание перспективных методов формирования нанокompозитных микрокапсул.

Во втором разделе работы описана природа ультразвукового излучения, его параметры и применение в нанотехнологии и медицине. Приведено описание соносенсибилизаторов, их характеристики и цели их применения.

Третий раздел описывает основные параметры получения нанокompозитных микрокапсул методом коаксиального электрораспыления.

Четвертый раздел – результаты исследований, связанные с изучением влияния ультразвука на проницаемость и деградацию полимерной оболочки микрокапсул, полученных методом коаксиального электрораспыления.

Основное содержание работы

Методы формирования нанокompозитных микрокапсул. Существует два актуальных метода формирования нанокompозитных микрокапсул: 1) метод последовательной адсорбции полиэлектролитных слоев [1-9]; 2) метод коаксиального электрораспыления [12, 13].

Полиэлектролитные микрокапсулы имеют свои преимущества (регулирование морфологии и физико-химических свойств микрокапсул за счет толщины и состава слоев, способность внедрения активных веществ в промежуточные слои, а также регулируя состав полиэлектролитных слоев можно формировать микрокапсулы чувствительные к внешним воздействиям и др.), но и свои главные недостатки (сложный и дорогой технологический процесс, производительность полиэлектролитных микрокапсул крайне мала).

Развитие методологии инкапсуляции терапевтических препаратов позволили создать новый способ внедрения молекул активных веществ в объем нано-и микроразмерных структур, которые постепенно высвобождаются путем диффузии сквозь оболочку или ее деградацию, который получил название – метод коаксиального электрораспыления [12, 13]. Данный метод имеет конкретные преимущества перед технологией создания полиэлектролитных микрокапсул, которые заключаются в том, что технология коаксиального

электрораспыления подразумевает инкапсуляцию активного вещества в объем полимерной оболочки в процессе ее формирования, а также соотношение объема оболочки к объему инкапсулированного вещества крайне низко. Также, метод коаксиального электрораспыления является высокопроизводительным [12-13]

Ультразвук: классификация и применение. Звуковые волны классифицируют в соответствии с их частотой: ≤ 20 Гц – инфразвук; от 20 Гц до 20 кГц – слышимый звук; от 20 кГц до 1 ГГц – ультразвук; ≥ 1 ГГц – гиперзвук. Интенсивность ультразвуковых волн варьируется от 10^{-14} Вт/м² до 10^3 Вт/м² [15].

Ультразвуковые частоты подразделяются на несколько видов, в зависимости от их особенностей приема, генерации волн и их распространения:

- низкие (20 кГц - 100 кГц);
- средние (100 кГц - 10 МГц);
- высокие (10 МГц - 1 ГГц).

Движение частиц вещества (среды), при условии возникновения в нем продольных волн, происходит параллельно распространению первичной волны, за счет чего может образоваться зона сжатия и разрежения. Отсюда следует, что продольные волны – волны сжатия.

При распространении ультразвуковой волны в вязкой среде (например: жидкости) происходит смещение отдельных молекул относительно некоторого среднего равновесного положения. При этом продольный характер ультразвуковой волны вызывает образование в жидкости зон повышенной и пониженной плотности – зон сжатия и разрежения.

Зоны высоких сжатий и разрежений в жидкости, образуются в результате разности давлений, обусловленных распространением ультразвуковой волны. В результате резкого изменения гидростатического равновесия жидкость «разрывается», образуя многочисленные пузырьки газов и паров. Они образуются из мельчайших пузырьков растворенного в жидкости газа, которые являются зародышевыми центрами кавитации. В следующий момент, когда в жидкости наступает период высокого давления, образовавшиеся ранее пузырьки

схлопываются (рисунок 1). При схлопывании пузырьков газа возникают большие локальные давления порядка тысяч атмосфер, образуются сферические ударные волны и локальные микропотоки с высокой кинетической энергией. Данный процесс образования и схлопывания пузырьков газа, сопровождающийся выделением большого количества энергии, называется кавитацией. В дегазированной жидкости кавитация отсутствует.

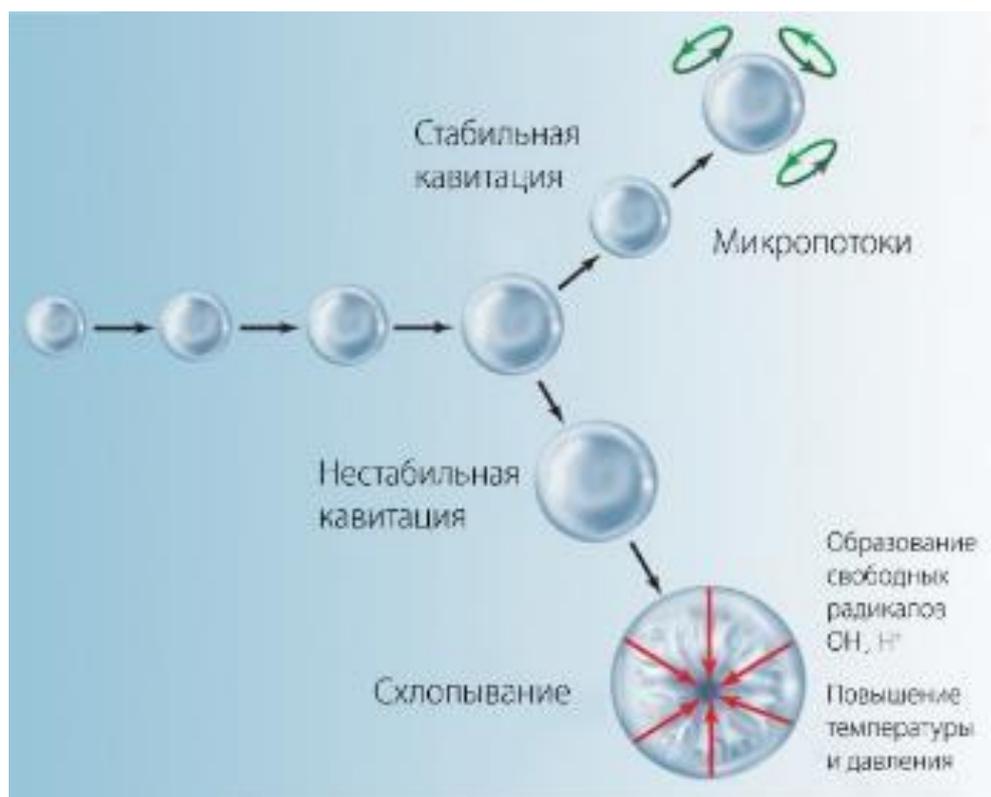


Рисунок 1 – Схема процесса кавитации

Кавитацию делят на кратковременную (при интенсивности ультразвука, превышающей 10 Вт/см^2) и постоянную (при малых интенсивностях, порядка $1 - 3 \text{ Вт/см}^2$).

Применение ультразвука в медицинских целях основывается на эффектах, возникающих в биологических системах при прохождении через них ультразвуковых волн. Ультразвук оказывает на биологические системы комплексное воздействие - тепловое, механическое, химическое, электрофизическое [14]. Тепло, которое выделяется в биологической среде при

поглощении ультразвуковой волны, может привести к точечному повышению температуры живой ткани, изменению скорости протекания биохимических процессов и даже к деградации ткани от воздействия тепла. Интенсивность ультразвуковой волны порядка 1 Вт/см^2 и рабочей частоте 1 МГц за промежуток времени 0.5 — 5 мин (в зависимости свойств ткани и условий теплообмена) мышечная ткань может нагреться на $5 - 7^\circ$. Действие ультразвука при данных параметрах, оказывается весьма существенным для облучаемой биологической (живой) системы.

В медицине ультразвук используют в зависимости от цели применения. Так, в физиотерапии, в основном, применяют непрерывный и импульсный ультразвук с частотой в пределах 0.8 - 3 МГц и интенсивностью $0.05 - 1 \text{ Вт/см}^2$. В диагностических целях применяют ультразвук с частотой 1 — 10 МГц в непрерывном режиме при интенсивности ультразвука, не превышающей 0.05 Вт/см^2 , либо в импульсном режиме при интенсивности ультразвука, измеряемого десятками и сотнями Вт/см^2 . В ультразвуковой хирургии применяют инструменты, режущий край которых непрерывно колеблется с частотами 10 - 100 кГц и амплитудой 5 – 50 мкм. Используют так же импульсный и непрерывный фокусированный ультразвук с частотами 0.5 - 5 МГц и интенсивностью в фокальной области от единиц до десятков тысяч Вт/см^2 [14, 15].

С точки зрения физики ультразвука, ткани человеческого тела близки по своим свойствам жидкой среде. При температуре тела скорость ультразвука во всех мягких тканях составляет примерно 1450 - 1650 м/с в зависимости от природы и концентрации веществ в единице объема ткани. Наименьшая скорость наблюдается в жировых тканях, а наибольшая — в коже. Во многих мягких тканях, включая мышцы, кровь, печень и почки, диапазон скоростей достаточно близок к среднему значению (таблица 1). Поэтому во всех системах диагностики используется скорость 1540 м/с, предложенная для калибровки. Дисперсия скорости ультразвука в мягких тканях весьма незначительна и, как правило, составляет 0.1 % [14, 15].

Таблица 1 – Скорости распространения ультразвука в различных тканях

Тип ткани	Скорость распространения (м/с)
Мягкие ткани (в среднем)	1540
Головной мозг	1541
Жировая ткань	1450
Печень	1549
Мышцы	1585
Кости черепа	4080

Все работы, проводимые в области терапии онкологических заболеваний, можно разделить на три направления: применение ультразвука; применение ультразвука в сочетании с химиотерапией; использование ультразвука в комбинации с ионизирующим излучением. Наиболее успешно развивалось первое направление, которое в настоящее время оформилось в отдельные области - ультразвуковую гипертермию, неинвазивную HIFU-хирургию, сонодинамическую терапию и «ультразвуковую наномедицину» [14, 15].

Соносенсибилизаторы широко известны в области науки и биомедицины, одни используются в качестве контрастных агентов при ультразвуковом исследовании, другие же для неинвазивной HIFU-хирургии [14, 15]. Обычно, в качестве соносенсибилизаторов используются микропузырьки газа, наночастицы металлов и неорганических соединений или их солей, а также комплексы, получаемые в результате химического синтеза [15]. Разрушающее действие ультразвука на опухолевую ткань, модифицированную твердыми соносенсибилизаторами, определяется одновременным вкладом различных факторов: физической дестабилизацией клеточных структур, обеспечивающей повышение их чувствительности к сдвиговым напряжениям; тепловыми эффектами, влияющими на механическую прочность и проницаемость биомембран; механическим разрушением биомембран наночастицами;

локальным снижением кавитационной прочности среды и, как следствие, повышением интенсивности кавитационных процессов.

Формирование чувствительных к ультразвуковому воздействию полимерных микрокапсул методом коаксиального электрораспыления.

Процесс коаксиального электрораспыления основан на получении частиц «ядро-оболочка» из расплава или раствора полимера и инкапсулируемого вещества (раствора, суспензии, эмульсии, частиц и др.). В результате подачи компонентов на выходное отверстие коаксиального дозирующего сопла, соединенного с источником высокого напряжения, образуется стабильная концентрическая струя, которая расщепляется на отдельные мелкодисперсные капли, которые дрейфуют за счет сил гравитационного и электростатического взаимодействия, и осаждаются на поверхность осадительного электрода (коллектора). Вещества на выходное отверстие коаксиального дозирующего сопла подаются прецизионными или перистальтическими системами [12, 13].

Формирование микрокапсул методом коаксиального электрораспыления было осуществлено на лабораторно-экспериментальной установке (рисунок 2).

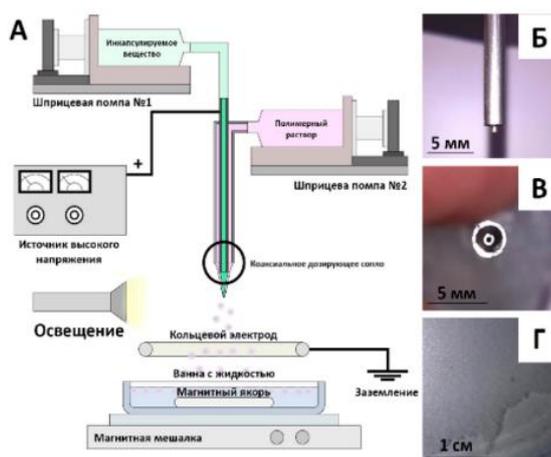


Рисунок 2 – Лабораторно-экспериментальная установка для формирования микрокапсул методом электрораспыления: А – схематическое описание установки; Б, В – коаксиальное дозирующей сопло; Г – результат формирования микрокапсул

Для формирования оболочки капсул микро-и субмикронного размера был использован раствор биodeградируемого сополимера - поли (D,L-лактид – со – гликолид с добавлением коллоидных частиц серебра, используемых в качестве соносенсибилизаторов, для увеличения чувствительности оболочки к ультразвуковому воздействию.

Наночастицы серебра были получены методом химического синтеза, и были охарактеризованы методом спектрофотометрии и динамического рассеяния света.

Результат был охарактеризован методом конфокальной (рисунок 3) и сканирующей электронной микроскопии с функцией обратно отраженных электронов (рисунок 4).

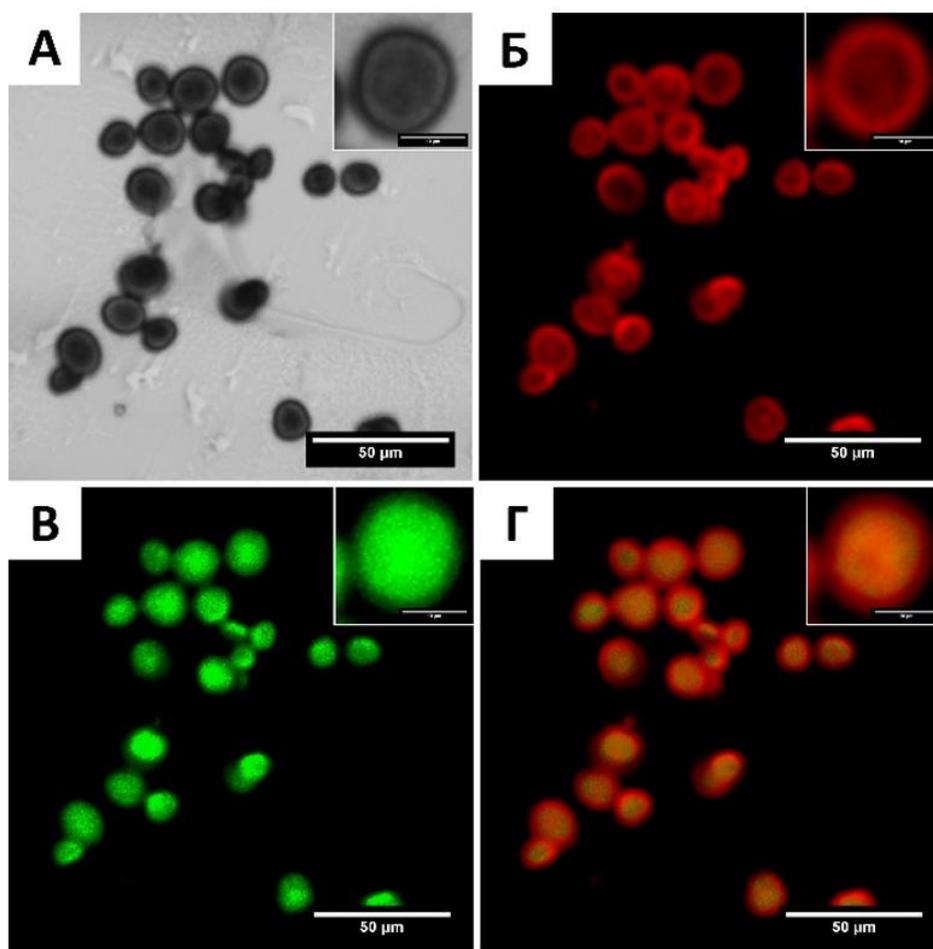


Рисунок 3 – Охарактеризование сформированных полимерных микрокапсул методом конфокальной микроскопии

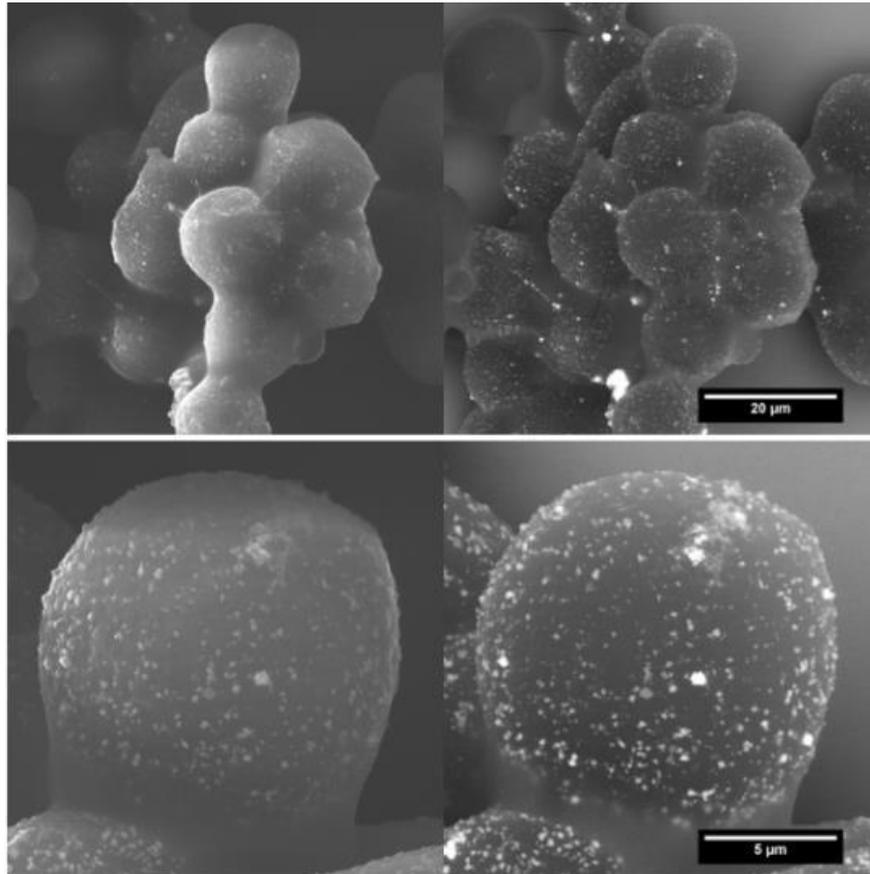


Рисунок 4 – Изображение сформированных микрокапсул, полученное методом сканирующей электронной микроскопии, с функцией обратно отраженных электронов

По изображениям конфокальной микроскопии была изучена толщина оболочки микрокапсул (рисунок 3), которая составляет $1,72 \pm 0,59$ мкм, а изображениям сканирующей электронной микроскопии, был изучен диаметр капсул (рисунок 4), который составляет $10,51 \pm 2,24$ мкм.

Изучение чувствительности сформированных микрокапсул к ультразвуковому воздействию. Чувствительность микрокапсул к ультразвуковому воздействию была изучена на лабораторно-экспериментальной установке (рисунок 2). При параметрах воздействия ,5 МГц; интенсивность – 20 В/см², а время воздействия на образец – 10 секунд.

Результат воздействия представлен на рисунке 5, 6.

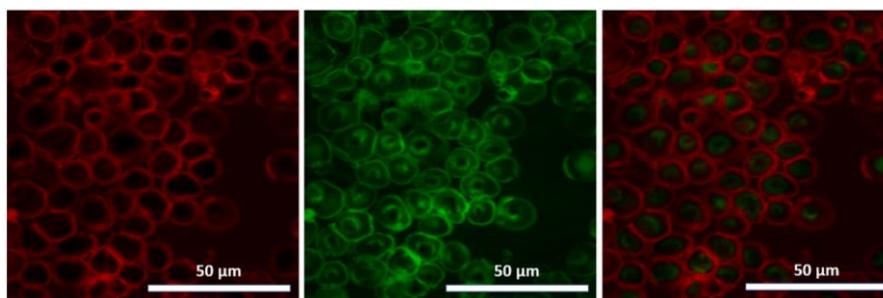


Рисунок 5 – Результат воздействия ультразвука на оболочку микрокапсул.

Изображение получено методом конфокальной микроскопии

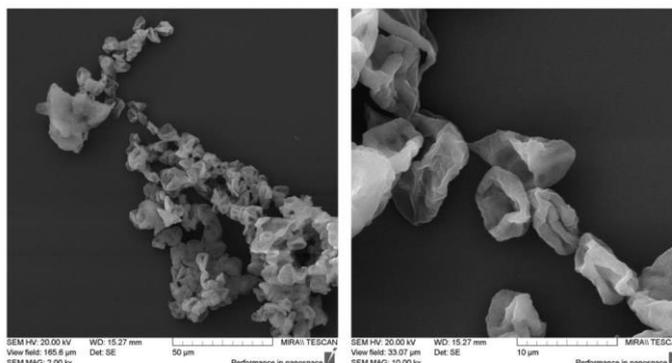


Рисунок 6 – СЭМ – изображения результата воздействия ультразвука на оболочку микрокапсул.

По результатам исследования воздействия ультразвука на оболочку, была проведена оценка выхода инкапсулируемого вещества в супернатант. Оценка осуществлялась спектрофотометрическим методом, результат представлена на рисунке 7.

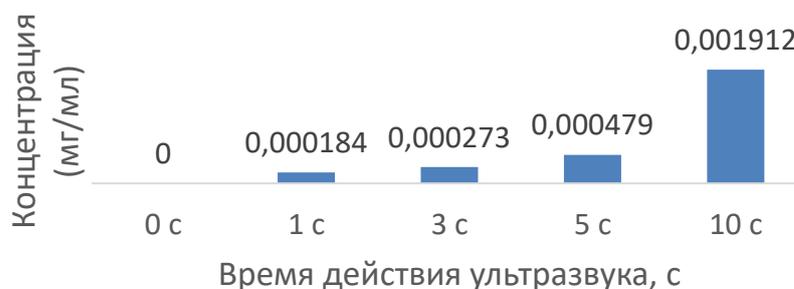


Рисунок 7 – Оценка выхода изоцианата флуоресцеина от времени действия ультразвука

Заключение. В ходе выполнения бакалаврской работы были изучены материалы по следующим направлениям:

1. Методы формирования нанокompозитных микрокапсул;
2. Природа ультразвукового излучения и его применение нанотехнологии в медицине;
3. Параметры ультразвукового излучения и его воздействия на плотные среды, в том числе и на нанокompозитные микрокапсулы;
4. Соносенсибилизаторы: описание и применения;
5. Способы получения микрокапсул из биосовместимых (в т.ч. биodeградируемых) материалов методом коаксиального электрораспыления;
6. Параметры, процессов коаксиального электрораспыления.

А также получены следующие результаты:

1. Создана лабораторно-экспериментальная установка для формирования полимерных микрокапсул методом коаксиального электрораспыления;
2. Синтезированы наночастицы серебра, с целью их внедрения в полимерную оболочку микрокапсул для увеличения ее чувствительности к ультразвуковому воздействию. Наночастицы были охарактеризованы методом динамического рассеяния света, согласно данным которого их средний размер составляет - 6.487 ± 1.4547 нм;
3. На лабораторно-экспериментальной установке были получены полимерные микрокапсулы методом коаксиального электрораспыления (параметры получения: рабочее расстояние – 15 см; напряжение – 11,5 кВ; объемный расход полимерного раствора – 1,2 мл/час; объемный расход инкапсулируемого вещества – 0,3 мл/час; время электрораспыления – 1 час);
4. Сформированные микрокапсулы были охарактеризованы методом конфокальной и сканирующей электронной микроскопии, согласно данным которых, толщина их оболочки составляет $1,72 \pm 0,59$ мкм, а диаметр - $10,51 \pm 2.24$ мкм;

5. Создана лабораторно-экспериментальная установка для изучения влияния ультразвука на оболочку микрокапсул, полученных методом коаксиального электрораспыления;

6. Капсулы, поле воздействия на них ультразвука, были охарактеризованы методом конфокальной и сканирующей электронной микроскопии;

7. Проницаемость оболочек микрокапсул, а также выход инкапсулируемого вещества из объема микрокапсул в зависимости от времени воздействия ультразвука, было изучено методом спектрофотометрии.

Компоненты и используемые параметры для формирования микрокапсул методом коаксиального электрораспыления, позволили сделать их чувствительными к ультразвуковому воздействию. Это было доказано на лабораторно-экспериментальном устройстве, по параметрам близкого к медицинским инструментам ультразвуковой неинвазивной терапии.

Предполагается, что для более тщательного исследования необходимо исследовать прочностные характеристики микрокапсул, в зависимости от параметров их формирования, а также изучить влияние на них ультразвука, в зависимости от параметров излучателя (частоты, мощности, интенсивности и пр.).

Для применения сформированных микрокапсул в биологических средах, необходимо изучить токсичность микрокапсул, и параметры их деструкции от воздействия ультразвука в данной среде. В конечной цели, микрокапсулы сформированные в данной работе, потенциально могут быть использованы для адресной доставки терапевтических веществ.

Работа была выполнена при поддержке гранта от Фонда Содействия Инновациям по программе «УМНИК», договор №11499ГУ/2017 от 17.05.2017 года.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Li, X. Design of controlled release drug delivery systems / X. Li, B. R. Jasti // N.Y.: McGraw-Hill. 2006. 435p.
- 2 Nastruzzi, C. Lipospheres in drug targets and delivery: approaches, methods, and applications / C. Nastruzzi // N.Y.: CRC Press LLC. 2005. 159 p.
- 3 Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites / G. Decher // Science. 1997. Vol. 277. P. 1232-1237.
- 4 Zhang, L. Coaxial electrospray of microparticles and nanoparticles for biomedical application / L. Zhang // Journal of Expert Rev. Med. Devices. 2012. Vol. 9. P. 595 – 612.
- 5 Pandey, J. Handbook of Polymernanocomposites, processing, performance and application // J. Pandey, K. Reddy. W.: Springer. 2014. 423p..
- 6 Borodina, T. Controlled release of DNA from self-degrading microcapsules / T. Borodina, E. Markvicheva, S. Kunizhev, H. Möhwald, G.B. Sukhorukov, O. Kreft // Macromol. Rapid Commun. 2007. Vol. 28, №18-19. P. 1894-1899.
- 7 Gorin, D.A. Effect of microwave radiation on polymer microcapsules containing inorganic nanoparticles / D.A. Gorin, D.G. Shchukin, A.I. Mikhailov, K. Köhler, S.A. Sergeev, S.A. Portnov, I.V. Taranov, V.V. Kislov, G.B. Sukhorukov // Tech. Phys. Lett. 2006. Vol. 32, №1. P. 70-72.
- 8 Bukreeva, T.V. Preparation of polyelectrolyte microcapsules with silver and gold nanoparticles in a shell and the remote destruction of microcapsules under laser irradiation / T.V. Bukreeva, B.V. Parakhonsky, A.G. Skirtach, A.S. Sussha, G.B. Sukhorukov // Crystallography Reports. 2006. Vol. 51, №5. P. 863-869.
- 9 Skirtach, A.G. Laser-induced release of encapsulated materials inside living cells / A.G. Skirtach, A.M. Javier, O. Kreft, K. Köhler, A.P. Alberola, H. Möhwald, W.J. Parak, G.B. Sukhorukov // Journal of Angew. Chem. 2006. Vol. 118. P. 4728-4733.
- 10 Shchukin, D.G. Ultrasonically induced opening of polyelectrolyte microcontainers / D.G. Shchukin, D.A. Gorin, H. Möhwald // Langmuir. 2006. Vol. 22. P. 7400-7404.

11 Skirtach, A.G. Ultrasound stimulated release and catalysis using polyelectrolyte multilayer capsules / A.G. Skirtach, B.G. De Geest, A.A. Mamedov, A.A. Antipov, N.A. Kotov, G.B. Sukhorukov // J. Mater. Chem. 2007. Vol. 17. P. 1050-1054.

12 Bock, N. Electro spraying, a Reproducible method for production of polymeric microspheres for biomedical application / N. Bock, M. Woodruff, D. Huttmacher // Polymers. 2011. Vol. 3. P 131 – 149.

13 Zhao, S. Coaxial electro spray of liquid core-hydrogel shell microcapsules for encapsulation and miniaturized 3D culture of pluripotent stem cells // S. Zhao, P. Agarwal, W. Rao, H. Huang. Journal of Integrative Biology. 2014. Vol. 6. P. 874 – 884.

14 Балдев, Р. Применение ультразвука / Р. Балдаев, В. Раджендран, П. Паланичами // М.: Техносфера. 2006. 576 с.

15 Голямина, И. Ультразвук: Маленькая энциклопедия / И. Голямина // М.: Сов. Энциклопедия. 1979. С. 50 – 100.