

СОЧЕТАНИЕ РАДИАЦИОННОГО И ОЗОНОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ В ПРОЦЕССЕ СТЕРИЛИЗАЦИИ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ

В.В. Розанов^{1,2}, А.А. Николаева³, А.В. Белоусов¹, Д.С. Юров⁴,
А.П. Черняев^{1,4}, И.В. Матвейчук²

¹ Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва

² Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва

³ Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко Минздрава РФ, Москва

⁴ Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В. Скобельцына, Москва

Радиационная обработка костных имплантатов является одним из наиболее эффективных методов стерилизации. Однако дозы свыше 15 кГр негативно влияют на морфологию костного материала. В статье рассмотрен инновационный метод снижения необходимых для стерилизации доз путем использования комбинации радиационного и озонowego воздействий.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, костные имплантаты, озонговая стерилизация, радиационная стерилизация, снижение стерилизационной дозы

Введение

Заболевания и травматические повреждения костно-суставного аппарата вышли уже на четвертое по значимости место среди инфекционных болезней, уступая только сердечно-сосудистым заболеваниям, онкологическим болезням и диабету. В настоящее время во многих мировых исследовательских центрах и тканевых банках особое внимание уделяется совершенствованию технологий изготовления костных имплантатов из аллотканей, созданию современных пластических материалов [1, 2] Важная задача состоит в обеспечении стерильности, исключаяющей возможность инфицирования как персонала тканевого банка, так и будущих реципиентов. Технологический процесс

изготовления различных имплантатов должен сопровождаться и завершаться надежной и адекватной стерилизацией с максимально возможным сохранением пластических свойств ткани [3].

Одним из наиболее эффективных методов стерилизации уже многие годы является радиационная обработка. Радиационная стерилизация обладает рядом преимуществ: высокая проникающая способность, относительно низкий подъем температуры, что особенно важно, когда стерилизуются биологические материалы, чувствительные к нагреву, возможность стерилизации находящихся в упаковке имплантатов, что исключает их вторичное инфицирование [4].

Однако высокие дозы ионизирующего излучения могут оказать разрушающее воздействие на структуру имплантата. Выбор способа комбинированного воздействия может помочь избежать подобных проблем. В настоящее время есть исследования, а также опыт сочетания радиационного метода с химическим и газовым. Однако оба этих метода являются довольно токсичными и имеют ряд технологических недостатков, таких как сокращение продолжительности хранения, например.

В работе предложен новый уникальный метод комбинированного воздействия для стерилизации с применением озono-воздушной обработки и ионизирующего излучения.

Международный опыт использования радиационной стерилизации

Стерилизация гамма-излучением ^{60}Co , а также потоком быстрых электронов является наиболее распространенным методом радиационного воздействия в работе тканевых банков Европы и Америки [5–7]. В России этот метод стерилизации с использованием дозы поглощения 25 кГр применяется, например, в тканевом банке Самарского ГМУ. Перед стерилизацией спонгиозных имплантатов их предварительно обезжиривают, замораживают и проводят лиофилизацию [8].

Известен способ стерилизации деминерализованного костного матрикса в виде крошки [9] путем радиационного облучения гамма-квантами на установке ГУ-200 (ФГУП “НИИП”, Лыткарино). Значение поглощенной дозы при этом составляло 15 кГр. Данный метод стерилизации пригоден не во всех случаях, не исключает ряда нежелательных побочных эффектов, главным из которых следует считать снижение эффективности остеогенеза с увеличением радиационной дозы. При этом уменьшение дозы облучения может сопровождаться снижением эффективности процесса стерилизации.

Однако ряд отечественных и зарубежных исследователей утверждают, что при радиационной стерилизации минимально необходимая для полного уничтожения бактерий доза равна 20 кГр, а для спор и вирусов – 20–40 кГр. Авторы исследований указывают необходимые значения доз 25–30 кГр. Такие дозы уже могут являться критическими с точки зрения сохранения активности морфогенетических белков,

а нарушения морфологии образцов могут проявляться уже при величине поглощенной дозы выше 15 кГр.

Итак, ряд работ дает убедительные доказательства серьезных изменений, происходящих в биологических тканях и на макроуровне при радиационном облучении биоимплантатов с величиной поглощенной дозы выше 15 кГр. В частности, на основании данных сравнительного морфологического анализа убедительно показано, что у обрабатываемых фрагментов сухожилия при дозе облучения 15 кГр имеет место выраженная фрагментация коллагеновых волокон в рыхлой сети эндо- и перитенония. Этот процесс сопровождается продольным расщеплением коллагеновых пучков на более тонкие. Однако при этом выделенная однопавленная ориентация волокон сохраняется. При повышении дозовой нагрузки от стерилизующего гамма-излучения до величин 25–60 кГр наблюдаются деструктивные изменения ткани в виде ее локальной гомогенизации и образования на поверхности волокон экранирующего аморфного матрикса [10–14].

Анализ показывает, что выходом из этой ситуации может быть разработка новой инновационной комбинированной технологии, основанной на сочетанном воздействии на стерилизуемый пластический материал совокупности физических и химических факторов. В том случае, когда удастся получить взаимное усиление стерилизующего воздействия этих факторов, создаются предпосылки для синергетического эффекта их взаимного действия. При этом интенсивность воздействия каждого из факторов может быть снижена, что позволяет уменьшить и степень вредного побочного действия каждого из них при усилении суммарного эффекта.

Рассматриваемый подход был апробирован группой авторов [15], которым удалось снизить дозу с 25 до 12 кГр путем предварительной химической обработки костной ткани в растворе, содержащем семидесятипроцентный этанол (15 % по массе), димексид (10 %), тимол (0,25 %), остальное – дистиллированная вода и последующем облучении гама-квантами. Это поспособствовало “лучшему сохранению их морфологических и биопластических качеств, усилению стерилизующей активности способа за счет комбинированного использования гамма-лучей и антисептических средств химического происхождения”.

Материал и методы

Для решения задачи поиска эффективно-го комбинированного метода стерилизации было предложено использовать на первом этапе, перед радиационной обработкой, воздействие на костный имплантат озono-кислородной смеси [16, 17]. Это позволяет устранить указанные выше недостатки методики комбинированного стерилизующего воздействия, т.к. обработка осуществляется в газовой, а не жидкой среде при комнатной температуре, а также озон имеет ряд преимуществ перед другими химическими воздействиями. К очевидным преимуществам стерилизации озоном следует, в первую очередь, отнести низкотемпературный режим обработки, относительно короткую экспозицию, глубокое проникновение в материал, возможность стерилизации неустойчивых к воздействию температуры изделий, возможность работы со стерилизационными камерами большого объема, отсутствие токсичности, а также безопасность для окружающей среды [18].

В качестве экспериментального материала в проведенных исследованиях были использованы образцы костной ткани быка. Из нативной компактной костной ткани механическим способом были вырезаны образцы прямоугольной формы размером 18×8×6 мм массой по 2 г. До стерилизации образцы были контаминированы смешанной микрофлорой.

На первом этапе осуществлялась обработка части образцов (с номерами 1.1–1.4) костных фрагментов озono-кислородной смесью с концентрацией (6–8) мг/л в течение 10–20 мин с последующей герметичной упаковкой в термопленку, стерилизованную той же газовой смесью. Для герметичной упаковки использовали термоаппарат типа F70-400 (Нидерланды), позволяющий осуществлять герметизацию двухслойной термопленки DGM Steriguard. Обработка образцов озono-кислородной смесью осуществлялась в предварительно изготовленных пакетах из термопленки, которые запаивались сразу после завершения озонowego воздействия. Для получения озono-воздушной смеси использовали промышленный генератор медицинского озона типа А-с-ГОКСф-5-02-ОЗОН (производство ОАО “Электромашиностроительный завод “Лепсе” (г. Киров, Россия), а также концентратор кислорода Vision Aire (США). Для контроля реального текущего значения концентрации озono-воз-



Рис. 1. Образцы имплантатов в индивидуальных упаковках

душной смеси во время обработки костных образцов использовали измеритель концентрации озона ИКО-50 (производство ОАО “Электромашиностроительный завод “Лепсе” (г. Киров, Россия). Обработанные таким образом образцы вместе с остальными (2.01–2.4) затем были отправлены на радиационную обработку. Такая технология озоновой обработки является отработанной лабораторией ВИЛАР [17] и позволяет значительно снизить исходный уровень обсеменения имплантата, что в свою очередь приводит к снижению резистентности патогенов к воздействию радиации.

Радиационное облучение проводилось на третий день после первого этапа на линейном ускорителе электронов непрерывного действия в Научно-исследовательском институте ядерной физики МГУ имени М.В. Ломоносова. Энергия пучка электронов составляла 1 МэВ, мощность пучка до 25 кВт. Дозиметрический контроль поглощенной дозы ионизирующего излучения выполнялся с помощью пленочного детектора-дозиметра СО ПД (Ф)Р-5/50 (ГСО 7865-2000) по методике, приведенной в паспорте детектора. Детектор представляет собой полимерные пленки размером (10–12)×(30–35) мм, герметично упакованные по 3 штуки. После облучения измерялась оптическая плотность детекторов при длине волны $\lambda=512$ нм относительно опорного необлученного образца. В данном эксперименте для определения оптической плотности детекторов использовался двухлучевой спектрофотометр Shimadzu UV-3600. В соответствии с полученным значением оптической плотности по формуле (1), приведенной в паспорте, вычисляется поглощенная доза, где D – поглощенная доза, а A – оптическая плотность:

Таблица 1

Параметры и результаты эксперимента по радиационной стерилизации

№ образца	Q, мкКл	I, мкА	$D_{\text{кост(эксп)}}$, кГр	ΔD , кГр
2.02	1113	2,7	1,18	0,18
1.1; 2.1	2640	2,6	2,6	0,39
1.2; 2.2	3975	2,4	3,54	0,53
1.3; 2.3	5301	33	5,52	0,83
1.4; 2.4	6625	33	6,49	0,97

$$D = 45,89 \times A^{1,05}. \quad (1)$$

Погрешность определения поглощенной дозы с помощью детекторов, согласно паспорту, не превышает 12 %. Погрешность значений дозы складывается из заданной неопределенности, которая заявлена производителем пленки и исправленной выборочной дисперсии по трем измерениям.

Результаты и обсуждение

Во время облучения две упаковки с образцами помещались на пластину размером 5,1*35 см. В настоящем эксперименте поглощенные дозы по оценкам пленочных детекторов-дозиметров составили 2,5, 5, 11, 15, 23 и 27 кГр.

Предварительно была произведена оценка времени облучения по известному желаемому значению поглощенной дозы. Значения накопленного пластиной заряда и тока при проведении каждого из экспериментов указаны в табл. 1.

Для того чтобы оценить поглощенную дозу непосредственно в образце костного имплантата, необходимо найти коэффициент пересчета дозы, измеренной с помощью пленки, в дозу в образце. С этой целью был смоделирован этап радиационного облучения в программе GEANT 4, где были учтены параметры ускорителя, спектр пучка электронов, геометрия эксперимента, материалы и размеры пленок и образцов. Доза в пленке и в кости в процессе моделирования была усреднена по всему объему объектов. Найден коэффициент пересчета дозы в пленке в эксперименте в дозу в образце $K=0,236$ и пересчитаны полученные в эксперименте значения средней по образцу дозы по формуле (2), результаты представлены в

табл. 1. В качестве образца были использованы материалы из библиотеки GEANT4 для кортикальной кости. Построен график глубинного распределения дозы в кости (рис. 2).

$$D_{\text{кост(эксп)}} = K \times D_{\text{пл(эксп)}}. \quad (2)$$

Далее осуществлялось микробиологическое исследование стерильности контрольного и экспериментальных образцов. Исследование стерильности образцов костной ткани проводилось в соответствии с ОФС 42-0066-07 (Государственная фармакопия РФ. XII, часть 1., стр. 131–139). Исследование осуществлялось на наличие на образцах костной ткани аэробных и анаэробных бактерий с использованием тиогликолевой среды и микроскопических грибов с использованием среды Сабуро. Образцы костной ткани в стерильных условиях помещали в пробирки с культуральными средами. Инкубация образцов проводилась в течение 14 сут при температуре 26°C на среде Сабуро и 37°C на тиогликолевой среде. Наличие роста микро-

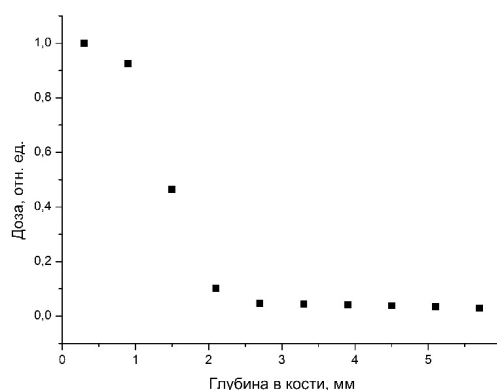


Рис. 2. График глубинного распределения дозы в кости

организмов определялось визуально в ходе регулярного контроля по наличию помутнения среды. По результатам микробиологических полную стерильность на обеих культуральных средах через 14 сут эксперимента продемонстрировали только образцы, подвергавшиеся комбинированному воздействию – последовательной обработке озон-воздушной смесью и радиационному облучению с величиной поглощенных доз по оценке пленочных детекторов 11, 15 и 27 кГр (образцы 2.1, 2.2 и 2.4). В свою очередь контрольные образцы, не прошедшие никакой обработки, а также образцы, подвергавшиеся только обработке озон-кислородной смесью, показали наличие обсеменения уже на 3 сут культивирования на выбранных культуральных средах.

По результатам математического моделирования, доза ионизирующего излучения 2,6 кГр, поглощенная образцом костной ткани, явилась достаточной для полной стерильности образца. Такая эффективная комбинированная стерилизация гарантирует стерильность с одновременным сохранением биопластических свойств материала в течение длительного хранения при значительно более низких поглощенных дозах, чем при воздействии ионизирующим излучением отдельно.

Заключение

В работе была предложена и реализована задача, состоящая в комбинировании озонной обработки с радиационной стерилизацией. Микробиологический анализ обработанных образцов показал, что инновационная технология, основанная на синергетике стерилизующих воздействий различной природы позволяет обеспечить стерильность при значительном снижении величины дозы от радиационной обработки и избежать ухудшения остеоиндуктивных свойств образца.

По результатам данного исследования получен Патент Российской Федерации на “Комбинированный способ стерилизации костных имплантатов” [13].

Список литературы

1. Матвейчук И.В., Розанов В.В., Денисов-Никольский Ю.И. Сравнительная структурно-функциональная характеристика костных алло- и ксеноимплантатов // Технологии живых систем, 2013. Т. 10. № 8. С. 25–30.
2. Денисов-Никольский Ю.И., Матвейчук И.В., Розанов В.В. Инновационные подходы к структурно-функциональному анализу костной ткани для решения фундаментальных и прикладных задач в биоимплантологии и биоматериаловедении // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2012. № 1. С. 223–228.
3. Пантелеев В.И., Розанов В.В., Матвейчук И.В. и соавт. Медицинские озонные технологии. Новые задачи, возможности, оборудование // Биомедицинская радиоэлектроника, 2013. № 2. С. 3–11.
4. Dziedzic-Goclawska A. The effect of radiation sterilization on connective tissue allografts // In: Allograft against disability. Mat. 2 World Congress on Tissue Banking. – Warsaw, 1999. P. 48.
5. Trends in radiation sterilization of health care products // Vienna: International Atomic Energy Agency, 2008.
6. Перова Н.В., Довжик И.А., Севастьянов В.И. Роль ионизирующего излучения в изготовлении медицинских изделий // В сб.: “Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии”. Матер. V Всероссийского симпозиума с международным участием. – Уфа, 2012. С. 99–100.
7. Cornu O., Banse X., Docquier P.L. et al. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on the mechanical properties of human cancellous bone // J. Orthop. Res. 2000. Vol. 18, № 3. P. 426–431.
8. Комаров Г.С., Нагога А.Г., Давыдов В.М. Репаративный остеогенез при остеосинтезе многооскольчатых переломов длинных трубчатых костей с использованием аллогенных трансплантатов // В сб. “Новое в решении актуальных проблем травматологии и ортопедии”. Сб. науч. тр. – М., 2000. С. 147–148.
9. Лунин В.Г., Карягина-Жулина А.С., Шарпова Н.Е. и соавт. Способ получения деминерализованного костного матрикса в виде крошки. Патент РФ 2456003 от 20.07.2012, Бюлл. №20.
10. Шангина О.Р. Влияние радиационной стерилизации на структуру биоматериалов. Аллоплант: Экспериментально-морфологическое исследование. Дисс. канд. биол. наук. Уфа, 1999. 130 с.

11. Dux S.J., Ramsey D., Chu E.H. et al, Alterations in damage processes in dense cancellous bone following gamma-radiation sterilization // *J. Biomech.* 2010. Vol. 43. P. 1509–1513.
12. Nguyen H., Cassady A.I., Bennett M.B. et al. Reducing the radiation sterilization dose improves mechanical and biological quality while retaining sterility assurance levels of bone allografts // *Bone.* 2013. Vol. 57. P. 194–200.
13. Матвейчук И.В., Розанов В.В., Гордонова И.К. и соавт. Комбинированный способ стерилизации костных имплантатов. Патент РФ № 2630464 от 08.09.2017, Бюл № 25. 3 с.
14. Nguyen H, Morgan D.A.F. et al. Validation of 11 kGy as a Radiation Sterilization Dose for Frozen Bone Allografts // *J. Arthroplasty.* 2011. Vol. 26. № 2. P. 303–308.
15. Савельев В.И., Булатов А.А., Рыков Ю.А. Комбинированный способ стерилизации костных трансплантатов. Патент РФ № 2356224 от 21.12.2007.
16. Ehrler D.M., Vaccaro A.R. The use of allograft bone in lumbar spine surgery // *Clin. Orthop.* 2000. Vol. 371. P. 38–45.
17. Быков В.А., Розанов В.В., Матвейчук И.В. и соавт. Способ изготовления костных имплантатов. Патент РФ № 2526429 от 20.08.2014.
18. Сибельдина Л.А. Стерилизация озоном // *Медицина и здоровье.* 2007. Т. 19. № 11. С. 24–25.

COMBINATION OF RADIATION AND OZONE EXPOSURE IN THE PROCESS OF STERILIZATION OF BONE IMPLANTS

V.V. Rozanov^{1,2}, A.A. Nikolayeva³, A.V. Belousov¹, D.S. Yurov⁴, A.P. Chernyayev^{1,4}, I.V. Matveychuk²

¹ Physics Department of M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Scientific and Educational Center of Biomedical Technologies VILAR, Moscow, Russia

³ N. N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow, Russia

⁴ D.V. Skobeltsyn Research Institute of Nuclear Physics, Moscow, Russia

Radiation exposure to bone implants is one of the most effective sterilization methods. However, doses above 15 kGy cause serious damages in biological tissues of bones. In this study the innovative approach of using a combined method for sterilizing bone implants, including initial impact on the samples by an ozone-air mixture and subsequent irradiation with fast electrons, is described.

Key words: *ionizing radiation, bone implants, ozone sterilization, radiation sterilization, dose reduction*

E-mail: aa.nikolaeva@physics.msu.ru