

УДК 539.1.047

## ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОВЕРХНОСТИ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ ПРИ КОМБИНИРОВАННОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ

© 2020 г. В. В. Розанов<sup>1,2,\*</sup>, И. В. Матвейчук<sup>2</sup>, А. П. Черняев<sup>1</sup>,  
Н. А. Николаева<sup>3</sup>, Л. Н. Саввинова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
“Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
“Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений”, Москва, Россия

<sup>3</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
“Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова”, Якутск, Россия

\*E-mail: vrozanov@mail.ru

Поступила в редакцию 18.06.2020 г.

После доработки 10.07.2020 г.

Принята к публикации 27.07.2020 г.

Представлены данные структурно-функционального анализа поверхностей костных имплантатов после озонowego воздействия при использовании комбинированной стерилизации (озон + радиация), а также полученные с применением современных методов результаты элементного анализа для опосредованной оценки исходных остеоиндуктивных свойств имплантатов.

DOI: 10.31857/S0367676520110241

### ВВЕДЕНИЕ

Современный этап развития биоимплантологии характеризуется постоянно возрастающей потребностью в пластическом материале высокого качества для проведения реконструктивно-восстановительных операций и создания здоровые сберегающих технологий [1]. Такая тенденция обусловлена рядом факторов, включающих возросший уровень производственного травматизма, увеличение на более ранних этапах онтогенеза заболеваний опорно-двигательного аппарата, в том числе остеопороза, тяжелые последствия локальных военных конфликтов, возрастание количества оперативных вмешательств, связанных с костной пластикой, первичным тотальным, а также (параллельно с этим) ревизионным эндопротезированием [2–4]. В результате количество производимых в настоящее время в мире операций, обусловленных вышеперечисленными причинами и связанными, соответственно, с применением костно-пластических материалов, превышает 4 млн в год [2] и имеет устойчивую тенденцию к постоянному росту [5]. Успешное решение этой проблемы возможно благодаря установлению роли факторов, определяющих эффективность выполнения оперативных вмешательств, созданию и практической реализации инновационных технологий на этапах изготовления биоимплантатов [6, 7], их

стерилизации [8–14], консервации и хранения до клинического использования [15].

В исследованиях последних лет особое внимание акцентируется на проблеме обеспечения высокого качества поверхности биоимплантатов, прямой связи этой характеристики с эффективностью применения костно-пластического материала в биоимплантологии [3, 4, 6, 16]. При этом понятие качества поверхности включает в себя как оптимальную степень ее шероховатости, так и морфо-функциональные особенности с учетом элементного состава. Хотя элементный анализ является одним из современных высокотехнологичных методов объективной регистрации, используемых в фундаментальных и прикладных медико-биологических исследованиях, наличие лишь отдельных исследований по данной проблеме [1, 17–19] свидетельствует о том, что широкого применения в биоимплантологии он до настоящего времени не получил. Вместе с тем, применительно к целям и задачам биоимплантологии, предъявляющей высокие требования к качеству и биобезопасности имплантатов на основе биологических тканей и материалов синтетической природы, такие исследования позволяют получить необходимую информацию о составе биологических тканей, существенно дополняющую результаты структурно-функционального анализа [1].

Наряду с обеспечением высокого качества поверхности, одним из важных аспектов является надежная стерилизация биоимплантатов, обеспечивающая безопасность как реципиента, так и медицинского персонала клиник и банков тканей. Значительные достижения в этой области связаны с развитием технологий комбинированной стерилизации биоимплантатов, позволяющих достичь синергетического эффекта стерилизующего воздействия физико-химических факторов различной природы – ионизирующего излучения и озонной обработки [13, 14]. При этом удается использовать известные преимущества указанных методик при одновременном снижении степени воздействия, а, следовательно, побочных эффектов каждого из этих мощных стерилизующих факторов в отдельности.

Важно отметить, что побочные действия стерилизующих факторов изучены в разной степени. В настоящее время имеются сведения о дозозависимых эффектах радиационного воздействия в широком диапазоне значений дозы поглощения, вплоть до 125 кГр [8, 17]. При этом реакция костной ткани на озонную обработку и возникающие при этом структурно-функциональные изменения биоимплантатов на сегодняшний день практически не изучены.

Целью настоящего исследования является изучение структурно-функциональных характеристик поверхности костных имплантатов после озонного воздействия при комбинированной (озон + радиация) стерилизации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работы выполнены на базах совместной (МГУ – ВИЛАР) Научно-исследовательской лаборатории биомедицинских технологий, созданной в 2013 г. при непосредственном участии ученых и специалистов физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий ФГБНУ ВИЛАР, а также Физико-технического института Северо-восточного федерального университета им. М.К. Аммосова.

Объектом исследования служили образцы костной ткани, полученные из бедренных костей мужчин различных возрастных групп, а в модельных экспериментах (для отработки методических факторов) – образцы из аналогичных костей быка (возраст животных – 1.5–2 г.). Характеристика исследованного материала, описание методик изготовления и структурно-функционального анализа представлены в [20–22].

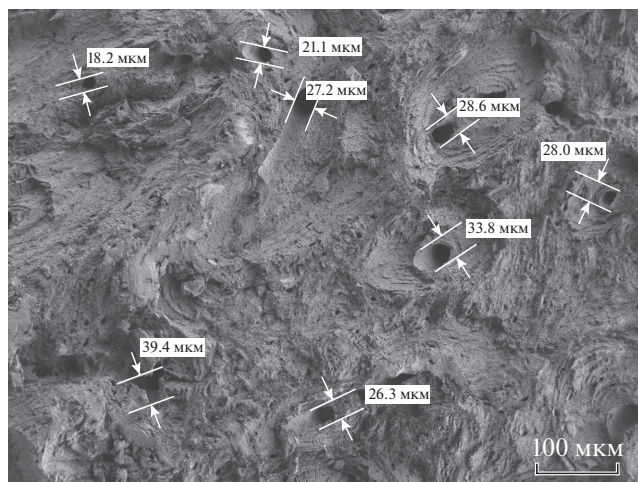
В экспериментах использован научно-технологический потенциал и оборудование указанных выше организаций, в частности, промышленная установка Flow Water Jet (Flow International Corpo-

ration, США) для гидродинамической резки с диаметром гидроабразивной струи 0.76–1.01 мм и диапазоном автоматического регулирования давления до 400 МПа, универсальная многофункциональная рабочая станция на базе двухлучевого сканирующего электронно-ионного микроскопа “Quanta 3D FEG” (производства FEI Europe B.V, Нидерланды), инфракрасная камера SAT-S160 с неохлаждаемым детектором (спектральный диапазон – 7.5–14 мкм, температурный – 20–250°C, точность измерения – 2%).

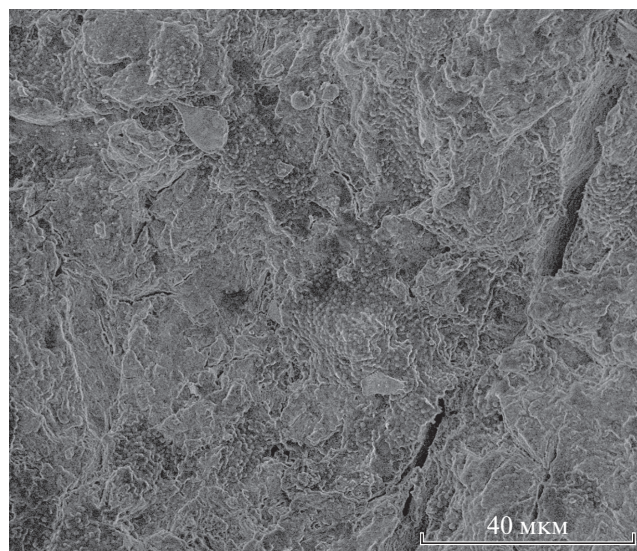
Морфологические исследования поверхности костных фрагментов осуществляли методом растровой электронной микроскопии (РЭМ). Для этого образцы костной ткани помещали на специальный углеродный токопроводящий скотч для обеспечения необходимого электрического контакта с предметным столиком микроскопа и для фиксации образцов при наклоне столика. Затем на исследуемую поверхность костного образца наносили тонкую электропроводящую пленку путем распыления графита в условиях вакуумного поста. Образцы были разделены на группы – без озонного воздействия (нативные) и с озонной обработкой, различной по времени. Работы выполнены на растровом электронном микроскопе высокого разрешения JSM-7800F фирмы “Japanese Electron Optics Laboratory” (Япония) с термополюсовым эмиссионным катодом Шоттки и супергибридной объективной линзой, позволяющей значительно уменьшить хроматические и сферические aberrации и тем самым существенно повысить разрешение, что особенно важно при малых ускоряющих напряжениях. Определение элементного состава исследуемых образцов проводили непосредственно в области изучения структуры их поверхности с использованием энергодисперсионного спектрометра OXFORD X-MAX-20.

В экспериментах, связанных со стерилизацией костных фрагментов озонно-воздушной смесью, использовали оборудование производства ОАО “Электромашиностроительный завод “Лепсе” (г. Киров, Россия) – промышленный генератор медицинского озона А-с-ГОКСф-5-02-ОЗОН, измеритель концентрации озона ИКО – 50, а также концентратор кислорода Vision Aire (США). Облучение образцов проводили на линейном ускорителе электронов непрерывного действия на энергию 1 МэВ с мощностью пучка до 25 кВт.

В процессе стерилизации и при последующем хранении костных образцов (имплантатов) использовали пакеты из двухслойной термопленки DGM Steriguard, герметизацию которых осуществляли с применением термоаппарата F70-400 (Нидерланды).



**Рис. 1.** Общий вид поверхности образца бедренной бычьей кости на поперечном срезе после механической обработки. СЭМ. Увеличение 150.



**Рис. 2.** Общий вид поверхности образца бедренной бычьей кости на поперечном срезе после гидродинамической инцизии. СЭМ. Увеличение 2500.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

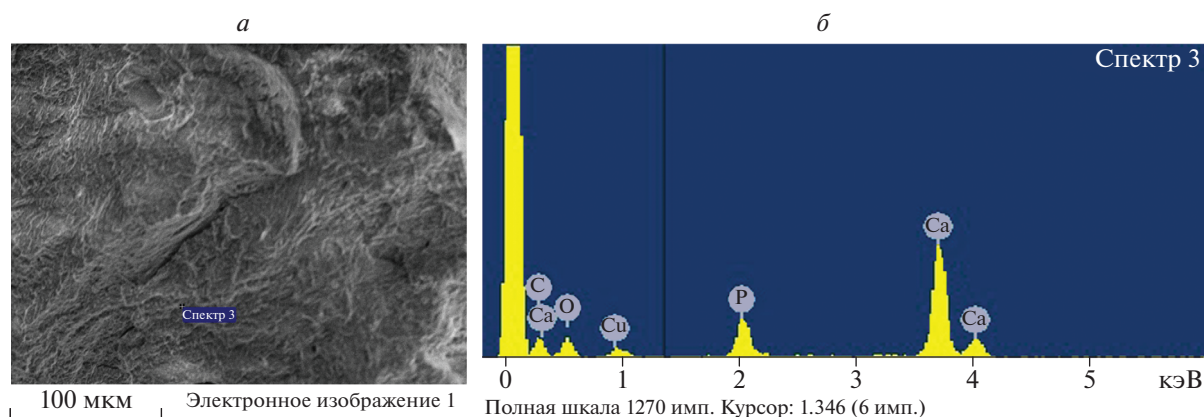
Разработки авторов в области разделения (резки) биологических тканей позволили усовершенствовать ряд физико-механических способов пробоподготовки для получения требуемого качества имплантатов в целом и их поверхностного слоя. К таким технологиям следует отнести, прежде всего, гидродинамическую инцизию минерализованных биологических тканей [23, 24]. Многолетние экспериментальные исследования процесса резания кости [23] позволили установить его значительные преимущества по сравнению с другими видами резки, что существенно расширяет возможности разделения минерализованных биологических тканей и их синтетических аналогов. Анализ структуры поверхностного слоя костных фрагментов после различных методов резки показал, что при использовании традиционных способов механического разделения кости с применением хирургических пил, сверл, долот и проч. на ее поверхности образуются сколы, микро- и макротрещины. При физико-механических способах резания, предложенных авторами, включая гидродинамическую инцизию, при условии соблюдения разработанных технологических режимов, поверхность кости гладкая, ровная, без видимых морфологических изменений костных структур при изучении их не только на макро-, но и микроскопическом уровнях [24], что подтверждается результатами электронной микроскопии (рис. 1 и 2). Это создает условия для получения высококачественного костного имплантата с необходимыми морфо-механическими характеристиками его поверхностного слоя. Благодаря визуализации органотипичных структур существует возможность проведения их морфометрического

анализа на поверхности костных образцов и использования его в качестве контроля для регистрации возможных изменений при различных физико-химических воздействиях, связанных в том числе и с процессами стерилизации.

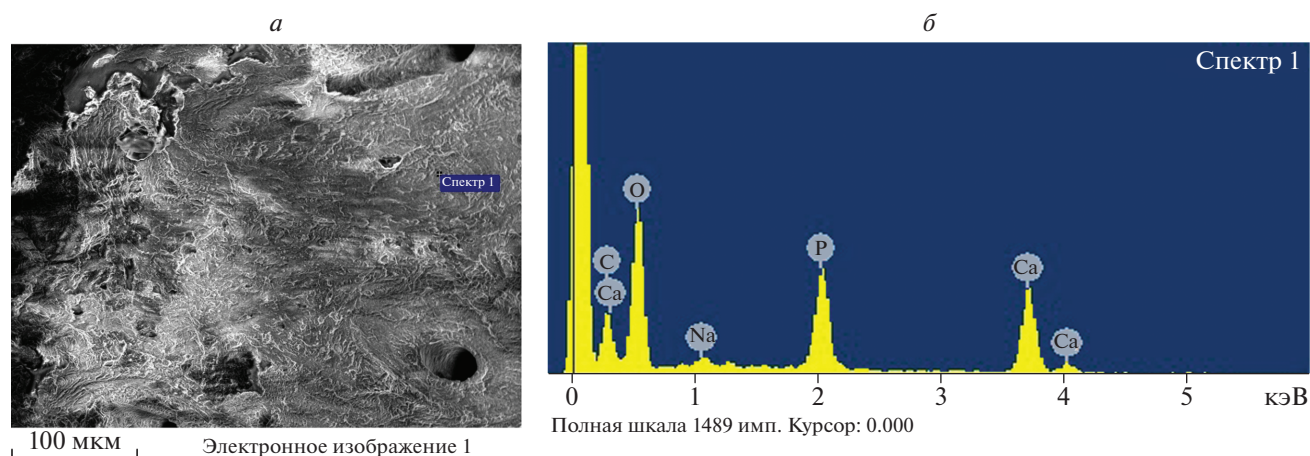
Надежная стерилизация биоимплантатов, которая должна обеспечить безопасность не только реципиента, но и медицинского персонала при работе с костным пластическим материалом, является не менее важной задачей. Для этих целей авторами созданы установки для стерилизации биоматериалов [11], предложены и экспериментально апробированы технологии озоновой [10], радиационной [8, 9] стерилизации, комбинированных воздействий [1, 12, 14].

Одним из важных направлений исследований является разработка новых подходов к опосредованной оценке исходных остеоиндуктивных свойств имплантатов, в качестве которого может быть использован элементный анализ [25–28]. Результаты немногочисленных исследований [17–19] дают основания рассматривать элементный анализ как информативный экспериментальный метод оценки качества костного вещества еще на стадии отбора костных фрагментов и на последующем этапе изготовления из них имплантатов.

В проведенных экспериментах получены предварительные данные о влиянии озоновой обработки на морфологию поверхностного слоя и элементный состав биоимплантата. Использование энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDX) непосредственно в ходе исследования структуры поверхности костных образцов на



**Рис. 3.** Характеристики поверхности образцов бедренной кости быка без озонной обработки: СЭМ-изображение поверхности костного образца (а). Спектр участка поверхности (б).



**Рис. 4.** Характеристики поверхности образцов бедренной кости быка после озонной обработки (8 мг/л, 10 мин): СЭМ-изображение поверхности костного образца (а). Спектр участка поверхности (б).

растровом электронном микроскопе высокого разрешения JSM-7800F позволяет одновременно получать, анализировать и фиксировать изображения и спектры. При этом пики соответствующих элементов на полученных спектрах свидетельствуют не только о наличии имеющихся элементов в исследуемом костном веществе, но и позволяют получить количественную информацию о концентрации каждого из них.

Исследования проводили на образцах костной ткани как подвергавшихся озонному воздействию, так и не проходивших такую обработку. На рис. 3 и 4 приведены характерные примеры результатов таких экспериментов, дающие представление о морфологических особенностях поверхностного слоя и элементном составе различных

участков костных фрагментов. Их предварительный сравнительный анализ свидетельствует о том, что существенных изменений структуры после озонного воздействия с использованными параметрами не наблюдается, а элементный состав заметно отличается. В частности, отмечено повышение содержания фосфора при одновременном значительном росте концентрации кислорода. Последний факт может иметь существенное значение для эффективности последующего процесса радиационной обработки на втором этапе комбинированной стерилизации костных имплантатов.

Сравнительный анализ полученных данных с результатами исследования характеристик образцов кости быка, подвергавшихся радиационному воздействию гамма-излучением в диапазоне доз

поглощения от 0 до 125 кГр [17], проведенного с использованием аналогичных экспериментальных методик, показал, что в отличие от озонowego воздействия радиационная обработка характеризуется выраженными дозозависимыми изменениями морфологии костных фрагментов. При этом отчетливо прослеживается тенденция усиления разрыва структурных связей, увеличение пористости, явление деминерализации поверхностного слоя. Эти изменения особенно выражены при высоких значениях доз поглощения. Однако известно, что даже небольшая доза гамма-излучения 10 кГр вызывает усиление биологической активности коллагена и ускоряет деградацию. При этом в качестве возможного механизма рассматривается образование высокоактивных гидроксильных свободных радикалов в результате радиолитической молекулы воды во влажном образце кости, что ускоряет образование сшивок коллагена [29, 30].

Результаты элементного анализа [17] позволили установить, что с увеличением дозы поглощения существенно изменяется и относительное содержание элементов. В частности, значительно уменьшается содержание кальция и фосфора, что представляет особый интерес для разработки критериев оценки качества имплантатов. Вывод авторов о деградации костного минерала и снижении механической прочности костных имплантатов при увеличении дозы поглощения служит дополнительным подтверждением актуальности разработки новых подходов к изготовлению и комплексному структурно-функциональному анализу костных имплантатов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом полученные в данном исследовании результаты убедительно свидетельствуют о перспективности использования технологий комбинированной стерилизации костных имплантатов. В предлагаемой авторами технологии с применением на первом этапе озонowego воздействия не установлены изменения морфо-механических характеристик костных образцов. При этом обеспечивается возможность снижения дозовой нагрузки при радиационном воздействии на втором этапе процесса комбинированной стерилизации до значений 11–12 кГр, что также не вызывает существенных структурно-функциональных изменений при обеспечении необходимого уровня стерильности костных имплантатов. Дальнейшие исследования морфо-функциональных характеристик костных имплантатов, их композиционного и элементного состава при селективном озонowym и радиационном воздействиях, а также после последовательной обработки (озон + радиация) в процессе комбинированной стерилизации позволят

получить новые сведения для оптимизации их качества и повышения эффективности использования в биоимплантологии.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Николаева Н.А., Розанов В.В., Матвейчук И.В. и др. // Гены и клетки. 2019. Т. 14. (Прил.) С. 167.
2. Воробьев К.А., Божкова С.А., Тихилов Р.М., Черный А.Ж. // Травмат. ортопед. России. 2017. Т. 23. № 3. С. 134.
3. Лекишвили М.В., Скляничук Е.Д., Акатов В.С. и др. // Гений ортопед. 2015. № 4. С. 61.
4. Vokov A.E., Mlyavukh S.G., Shirokova N.Y. et al. // Современ. технол. мед. 2018. Т. 10. № 4. С. 203.
5. <http://www.transplant-observatory.org>.
6. Краснов В.В., Матвейчук И.В., Розанов В.В. и др. // Гены и клетки. 2019. Т. 14. (Прил.) С. 125.
7. Матвейчук И.В., Денисов-Никольский Ю.И., Омеляненко Н.П. и др. // Матер. всерос. конф. с междунар. участ. "Инновационные технологии в трансплантации органов, тканей и клеток (Самара, 2008). С. 72.
8. Розанов В.В., Матвейчук И.В., Черняев А.П. и др. // Изв. РАН. Сер. физ. 2019. Т. 83. № 10. Р. 1435; Rozanov V.V., Matveychuk I.V., Chernyaev A.P. et al. // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2019. V. 83. № 10. Р. 1311.
9. Розанов В.В., Николаева А.А., Матвейчук И.В. и др. // Гены и клетки. 2019. Т. 14. (Прил.) С. 197.
10. Пантелеев В.И., Розанов В.В., Матвейчук И.В. и др. // Биомед. радиоэлектрон. 2013. № 2. С. 3.
11. Пантелеев В.И., Розанов В.В., Матвейчук И.В. и др. Установка для стерилизации биоматериалов. Пат. РФ № 180532. 2018.
12. Розанов В.В., Матвейчук И.В., Черняев А.П. и др. // Мед. физ. 2019. № 1. С. 52.
13. Розанов В.В., Матвейчук И.В. // Альм. клин. мед. 2019. Т. 47. № 7. С. 634.
14. Матвейчук И.В., Розанов В.В., Гордонова И.К. и др. Комбинированный способ стерилизации костных имплантатов. Пат. РФ № 2630464. 2017.
15. Розанов В.В., Быков В.А., Матвейчук И.В. и др. // Мед. альм. 2013. Т. 27. № 3. С. 24.
16. Кури Ф., Ханзер Т., Кури Ч. Регенеративные методы в имплантологии. СПб: Азбука, 2013. 514 с.
17. Rahman N., Khan R., Hussain T. et al. // Cell. Tissue Bank. 2020. V. 21. P. 249.
18. Кирилова И.А., Подорожная В.Т., Легостаева Е.В. и др. // Хир. позвон. 2010. № 1. С. 81.
19. Лунева С.Н., Талашова И.А., Осипова Е.В. и др. // Междунар. журн. прикл. фонд. исслед. 2014. № 8-3. С. 95.
20. Матвейчук И.В., Розанов В.В., Денисов-Никольский Ю.И. // Технол. жив. сист. 2013. Т. 10. № 8. С. 25.
21. Матвейчук И.В., Розанов В.В., Литвинов Ю.Ю. // Альм. клин. мед. 2016. Т. 44. № 2. С. 193.

22. Розанов В.В., Матвейчук И.В., Денисов-Никольский Ю.И. и др. // Технол. жив. сист. 2016. Т. 12. № 1. С. 25.
23. Розанов В.В. // Научное издание. 2003. № 6. С. 35.
24. Розанов В.В., Денисов-Никольский Ю.И., Матвейчук И.В. и др. // Технол. жив. сист. 2005. Т. 2. № 4–5. С. 28.
25. Денисов-Никольский Ю.И., Скальный А.В., Матвейчук И.В. и др. // XIII междунар. симп. “Эколого-физиологич. проблемы адаптации” (Москва, 2009). С. 165.
26. Леонов Б.И., Беняев Н.Е., Макеев Е.В. и др. // Биомедицинские технологии (Репродукция тканей и биопротезирование). Сб. науч. труд. М.: НИЦ БМТ, 2000. С. 20.
27. Денисов-Никольский Ю.И., Матвейчук И.В., Леонов Б.И. и др. // Симпоз. по проблемам тканевых банков с междунар. участ. “Биоимплантология на пороге XXI века” (Москва, 2001). С. 41.
28. Матвейчук И.В., Розанов В.В., Скальный А.В. и др. // XV научно-техн. конф. “Медико-техн. технологии на страже здоровья “Медтех-2013” (Мадейра, 2013). С. 108.
29. Avery N.C., Bailey A.J. // Scand. J. Med. Sci. Sports. 2005. V. 15. № 4. P. 231.
30. Akkus O., Belaney R.M., Das P. // J. Orthop. Res. 2005. V. 23. № 4. P. 838.