

РАЗВИТИЕ ТЕХНОЛОГИЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПРИРОДНЫХ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МАТЕРИАЛОВ

© 2023 г. В. В. Розанов^{1,2,*}, И. В. Матвейчук², А. П. Черняев¹,
Н. А. Николаева³, А. О. Хуцистова¹

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

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

³Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Якутск, Россия

*E-mail: vrozanov@mail.ru

Поступила в редакцию 28.03.2023 г.

После доработки 28.03.2023 г.

Принята к публикации 17.04.2023 г.

Рассмотрены современные тенденции развития технологий стерилизации природного наноструктурированного биокомпозита – костной ткани. Отмечена эффективность комбинированных технологий стерилизации с сочетанным использованием радиационного и озонного воздействий для обработки такого сложного наноструктурированного природного биокомпозита, как костная ткань. Акцентировано внимание на необходимости дальнейшего совершенствования технологий стерилизации костных имплантатов, поиске альтернативных методов стерилизации, совместимых с радиационными при их сочетании в многостадийных комбинированных технологиях, решении приоритетных задач, связанных с разработкой эффективного метода определения реально поглощенной имплантатом дозы в процессе стерилизации. Отмечена реальная перспектива использования комбинированных радиационных технологий для консервации и стерилизации биотканей при решении задач судмедэкспертизы, а также при проведении исследований ископаемых фрагментов после многолетнего неконтролируемого хранения.

DOI: 10.56304/S1992722323040143

ВВЕДЕНИЕ

Костная ткань – уникальный природный биополимерный материал [1–4]. Существовавшие о ней ранее представления как брэдифитрофной ткани с незначительным участием в метаболических процессах были пересмотрены на основе полученных экспериментальных данных. Они подтвердили, что кость – не только элемент биомеханической системы с опорной функцией, депо фосфата кальция, но и активный участник ряда обменных процессов, определяющих состояние минерального гомеостаза.

Экспериментальные исследования костной ткани с использованием современных методов, в частности атомно-силовой микроскопии (АСМ) [3], позволили подтвердить не только ранее установленный ее статус как сложного, состоящего из органического и минерального компонентов биокомпозита [1, 2], но и иерархически организованную архитектуру от нанометрового до тканевого (макроскопического) уровня [3].

Несмотря на достоинства АСМ [3, 4], позволяющей изучать закономерности структуры и механические свойства костных тканей на наноуровне,

этот метод имеет ряд ограничений, в частности возможностью исследования только поверхностного слоя образца. Применение в остеологии методов компьютерного моделирования наряду с прямыми методами объективной регистрации позволяет получать дополнительную информацию о процессах, происходящих внутри объема [5], прогнозировать влияние микроструктуры на механические свойства костной ткани путем многовариантных вычислений, сократить экономические и временные затраты на определение переменных, влияющих на изучаемый результат реакции биосистемы. При проведении компьютерного моделирования следует учитывать, что ввиду использования упрощенных моделей исследуемого объекта правильность результата зависит от структурно-функционального соответствия модели выбранному прототипу.

Увеличение в последние десятилетия случаев травматизма ввиду ряда факторов (экология, техногенные катастрофы, военные конфликты, транспортные аварии), возрастные и патологические изменения костной ткани, регистрируемые в различные периоды онтогенеза, обусловили потребность в эффективном пластическом материа-

ле из-за увеличения объема реконструктивно-восстановительных операций.

Известно [1, 2, 6], что основной критерий любого лечебного процесса — его эффективность, означающая достижение необходимого результата при обеспечении безопасности здоровья пациента. Этот критерий является основным при разработке современных здоровьесберегающих технологий, учитывается при решении актуальных проблем биоимплантологии и биоматериаловедения, при определении основных направлений их развития, разработке тактики проведения реконструктивно-восстановительных операций с использованием биологических тканей, материалов синтетической природы в составе имплантатов, медицинских изделий и устройств, на различных стадиях изготовления материалов медицинского назначения.

Аллогенные костнопластические материалы, используемые в мировой клинической практике при реконструктивно-восстановительных операциях, являются основной заменой аутокости и лучшей альтернативой любому синтетическому костезамещающему материалу [7] — этому во многом способствует совершенствование методов хранения, обработки и стерилизации материалов на основе костной ткани. Но отмеченные мероприятия не исключают решения одной из главных задач исследователей — исключение инфицирования и создание материала, сохраняющего биологические свойства кости.

В этой связи важным аспектом при изготовлении, проведении структурно-функционального анализа и последующем использовании костных фрагментов в качестве биологического пластического материала в реконструктивно-восстановительных операциях является обеспечение высокого уровня безопасности исследователей и персонала тканевых банков, находящихся в постоянном контакте с биоматериалом с момента его заготовки [6, 8–13].

Кроме того, существуют дополнительные требования и ограничения на технологии, используемые для стерилизации костных образцов, а также на допустимые параметры применяемых при этом технологических режимов. Они связаны с тем, что процесс стерилизующей обработки такого сложного природного наноструктурированного биокомпозита, как костная ткань, не должен отразиться ни на их морфологических и физическо-механических характеристиках, ни на химическом (элементном) составе. Все вносимые изменения могут существенным образом исказить результаты исследования нативного костного образца, а в случае дальнейшего использования в качестве костного имплантата ухудшить его остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства и даже сделать не-

возможным его применение в качестве костного пластического материала.

Учитывая эти особенности, работы по совершенствованию применяемых и созданию новых технологий стерилизации костных фрагментов не только не утратили своей актуальности, но и представляют особый интерес для самых различных медико-биологических приложений.

Цель исследования заключается в анализе результатов работ и определении перспектив развития комбинированных технологий стерилизации костной ткани — природного наноструктурированного материала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили образцы компактного и губчатого вещества, изготовленные по технологии [14] с учетом методических и биологических факторов из бедренных, плечевых костей человека (возраст — 19–89 лет), половозрелых животных (бык, свинья).

При изучении структуры костных фрагментов применяли световую, сканирующую электронную микроскопию с проведением морфометрического анализа отдельных элементов системы внутрикостных пространств [1, 9].

Механические испытания осуществляли на цилиндрических образцах с учетом анизотропии и уровней структурной организации костной ткани с определением предела прочности при сжатии (σ), показателя микротвердости по Виккерсу (H), плотности (ρ) костной ткани [15].

При определении композиционного состава использовали методы селективного химического выделения из костного образца одной из фаз (органической, минеральной) и дегидратации с применением гравиметрического анализа.

Исследования характеристик поверхностей костных фрагментов после различных физико-химических воздействий осуществляли с использованием метода растровой электронной микроскопии (РЭМ) на растровом электронном микроскопе высокого разрешения JSM-7800F фирмы “Japanese Electron Optics Laboratory” (Япония). Для определения элементного состава на поверхности исследуемых костных фрагментов применяли энергодисперсионный спектрометр OXFORD X-MAX-20 [16].

Озоновую обработку костных фрагментов проводили с применением генератора медицинского озона А-с-ГОКСф-5-02-ОЗООН [17]. Для радиационной стерилизации использовали пучки электронов с линейного ускорителя непрерывного действия с энергией 1 МэВ [3].

При проведении модельных расчетов использовали программный комплекс GEANT4, при постановке задачи — геометрию и основные параметры

реального эксперимента по радиационной обработке костных фрагментов [8]. Основные параметры костной ткани были взяты из стандартной библиотеки программного комплекса GEANT4 [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты многолетних научных разработок, представленных в [1, 19], а также данные исследований [2, 4, 7, 20–23] свидетельствуют о том, что с позиций биоматериаловедения костная ткань является сложным для стандартизации материалом. Это обусловлено объективными, включая биологические (пол, возраст, раса, вид, образ жизни, особенности трудовой деятельности и др.) факторы, и субъективными методическими особенностями, связанными с условиями хранения, пробоподготовки, проведения исследований — *in vivo*, *in vitro* и др., которые необходимо учитывать при проведении научных разработок.

При осуществлении структурно-функционального анализа *in vitro* важно обеспечить одно из главных требований — стабилизацию состава, структуры и физико-механических свойств с целью получения исследуемых величин, близких к реальным для костной ткани *in vivo*.

Особое внимание в исследованиях минерализованных тканей следует уделять композиционному и элементному анализу [1, 20]. Их применение представляет интерес при решении задач, связанных с подбором потенциальных доноров, опосредованной оценкой исходных остеоиндуктивных свойств, определением состава костных фрагментов на различных стадиях изготовления (заготовка, отмывка, деминерализация, деорганификация, стерилизация, консервация, хранение и др.) и готового продукта — биоимплантатов. Соотношение основных компонентов в костной ткани — природном композите во многом определяет выбор параметров в применяемых технологиях изготовления и стерилизации.

Актуальность создания эффективных способов стерилизации костных фрагментов подтверждают собственные экспериментальные данные [8–11, 13, 18, 19, 24, 25] и анализ современного состояния осуществляемых разработок по рассматриваемой проблеме [6, 26, 27]. Сравнение методик стерилизации (жидкие среды, обработка оксидом этилена, озонная стерилизация, радиационное воздействие и др.), используемых в настоящее время, позволяет сделать вывод о преимуществах радиационной стерилизации. Однако при таком выборе возникает дилемма: повышение дозы облучения усиливает стерилизационный эффект радиационной обработки, но вызывает морфологические изменения тканей, ухудшение их механических характеристик, разрушение морфогенетических белков. Отмеченные изменения мо-

гут стать причиной непригодности пластического материала для клинического применения. Необходимо также учитывать, что наблюдаемые негативные последствия после радиационных воздействий на костные ткани являются дозозависимыми. Несмотря на то что общепринятая, необходимая для надежного подавления большинства патогенов, величина поглощенной дозы составляет 25 кГр [28], по результатам экспериментальных исследований морфологические изменения костной ткани регистрируются, начиная с 15 кГр [26].

Существуют различные подходы к практическому решению указанной проблемы. Одним из них является снижение дозы поглощения в процессе радиационной обработки до величины менее 15 кГр. Разработки [8, 10, 19, 24] обеспечили достижение такого результата при использовании комбинированных технологий, основанных на сочетанном воздействии на стерилизуемый пластический материал физических (ионизирующее излучение) и химических (озон) факторов.

При взаимном усилении их стерилизующего воздействия создаются предпосылки для обеспечения синергетического эффекта со снижением интенсивности воздействия и степени вредного побочного влияния каждого из факторов. В частности, воздействие на первом этапе озон-кислородной смеси в силу выраженного бактерицидного действия приводит к значительному ослаблению популяции патогенов. В результате снижается их радиорезистентность, а в совокупности с увеличением содержания кислорода [16] возрастает эффективность радиационной обработки, и необходимый уровень стерильности достигается уже при величине поглощенной дозы 12 кГр [8].

При решении задач, связанных с оптимизацией процесса радиационной стерилизации костных имплантатов, важно располагать базовой информацией о закономерностях распределения поглощенной дозы в костном имплантате в зависимости от условий и параметров радиационной обработки. Объективное представление о распределении стерилизующей дозы в объеме костного образца необходимо по двум причинам. Для достижения требуемого качества костного имплантата дозовая нагрузка, с одной стороны, должна быть минимальной с целью сохранения исходных остеоиндуктивных свойств биоимплантатов, с другой — она должна обеспечивать полное устранение обсемененности образца, что может быть достигнуто в случае максимально допустимой величины поглощенной дозы при однородности ее распределения по всей толщине костного фрагмента.

Проблема равномерности дозового распределения в костных фрагментах в литературе практически не освещена, что обусловило необходимость проведения [18, 25] изучения условий обеспечения равномерного распределения дозы радиационного

воздействия по толщине костного фрагмента при моделировании процесса стерилизации биоимплантатов с помощью программного комплекса GEANT4. Он используется для решения фундаментальных задач в различных областях физики высоких энергий, медицине, биологии. В нем реализовано значительное количество алгоритмов, в которых заложен базовый подход, основанный на методе Монте-Карло.

Проведенные расчеты подтвердили, что при использовании потока быстрых электронов характерно наибольшее распределение дозы в поверхностной зоне, что указывает на необходимость вращения или переворачивания образца для его равномерного облучения. Анализ полученных данных показал, что оптимальные значения энергии частиц составляют 1 МэВ при толщине образца 4 мм, 1.5 МэВ – при толщине 6 мм, 2 МэВ – при толщине 8 мм и 2.5 МэВ – при толщине 10 мм при условии двустороннего облучения или вращения костного образца.

Модельное рассмотрение показывает, что оптимизация технологии радиационного воздействия с учетом геометрии, энергетических параметров процесса позволяет обеспечить равномерность распределения дозы в костном образце. Несмотря на то что радиационные технологии с использованием потока быстрых электронов занимают меньшую долю в общем мировом объеме рынка стерилизации [13], при такой оптимизации появляются условия для расширения использования пучков электронов для промышленной стерилизации костных имплантатов.

Среди причин, сдерживающих ускоренное развитие комбинированных технологий стерилизации, есть ограничения, связанные с применением каждого из существующих способов в отдельности и при их сочетанном использовании в комбинированных технологиях. Эти вопросы нуждаются в обстоятельном изучении в последующих разработках.

Не вызывает сомнений необходимость дальнейшего совершенствования технологий стерилизации костных имплантатов. Среди приоритетных задач можно выделить следующие:

- разработка эффективного метода определения реально поглощенной имплантатом дозы в процессе стерилизации, использование расчетных методов с помощью общепринятых моделей;
- создание новых и модернизация применяемых установок озонной стерилизации с наличием функций автоматического контроля продолжительности процесса стерилизации;
- поиски альтернативных методов стерилизации, совместимых с радиационными при их сочетанном использовании в многостадийных комбинированных технологиях.

Отметим, что вопросы создания новых методов стерилизации, совершенствование применяемых на практике способов представляют интерес для различных медико-биологических приложений. Так, применяемые технологии стерилизации с использованием озона могут найти достойное применение при обработке лабораторных и медицинских помещений, складов растительного сырья при изготовлении лекарственных средств, тары, не создавая при этом проблем для персонала.

Успешное развитие технологий стерилизации базируется на результатах современных фундаментальных и поисковых исследований структурно-функциональных закономерностей костной ткани в норме и при различных патологических состояниях [1–4, 21, 29, 30, 34]. Об этом свидетельствует тот факт, что даже несмотря на появление высокотехнологичных методов структурно-функционального анализа, композиционного и элементного состава, многие аспекты рассматриваемой проблемы не могут быть решены на данном этапе. Так, появление метода объективной регистрации, основанного на применении АСМ [3, 5], позволяет изучать морфологию и механические свойства костных тканей на наноуровне. Но при этом имеется ряд ограничений, обусловленных, в частности, возможностью исследования только поверхностного слоя образца. Использование компьютерного моделирования в дополнение к прямым объективным методам позволяет получать информацию о процессах, происходящих внутри объема, а также изучать влияние микроструктуры на механические свойства костной ткани путем проведения многовариантных вычислительных экспериментов. Применение в остеологии расчетных моделей позволяет при меньших экономических и временных затратах определить переменные, влияющие на конкретный результат реакции биосистемы [5]. Однако необходимо учитывать, что при проведении компьютерного моделирования используются упрощенные модели исследуемого объекта и правильность результата определяется структурно-функциональным соответствием модели ее естественному прототипу.

Необходимость создания современных комбинированных технологий стерилизации обусловлена также появлением новых тенденций в биоимплантологии, связанных с развитием тканевой инженерии с использованием скаффолдов, аутологичных стволовых клеток, биоактивных веществ и др. [22, 31–37]. При синтезе скаффолдов – трехмерных пористых или волокнистых матриц из натуральных (синтетических) полимеров, выполняющих функцию механического каркаса для клеток, необходимо учитывать, что они обладают рядом несомненных преимуществ, но не лишены определенных недостатков по сравнению с применяемыми костнопластическими материалами. В этой

связи при их создании и дальнейшем совершенствовании вопросы обеспечения эффективности и безопасности являются особенно актуальными, так как используемые в них матрицы могут быть использованы не только в качестве носителей клеток, но и биоактивных веществ для индуцирования остеогенной дифференцировки, привлечения собственных стволовых клеток организма и стимуляции ангиогенеза [33].

Еще одно актуальное направление, где рассматриваемые комбинированные технологии могут найти свое применение, связано с развитием исследований свойств и характеристик биотканей при решении задач судмедэкспертизы, а также при проведении исследований ископаемых фрагментов после многолетнего неконтролируемого хранения.

Последнее направление представляется особенно перспективным, так как решение вопросов надежной консервации таких тканей должно обеспечить возможность их долговременного хранения без изменения реальных свойств, состава и структуры. Эффективная стерилизация при проведении таких работ необходима для надежной гарантии безопасности персонала исследовательских лабораторий при возможном наличии неизвестных патогенов на ископаемых образцах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При практической реализации предложенной стратегии развития технологий стерилизации природных наноструктурированных материалов важно уделять особое внимание не только созданию эффективных методов стерилизации, консервации и хранения имплантатов, медицинских изделий и устройств, не оказывающих существенного влияния на их первоначальные (исходные) функциональные характеристики, но и обеспечению высокого качества стерилизуемого материала. Сочетание таких способов обработки, как озоновый (с мощным бактерицидным потенциалом) и радиационный (с высокой эффективностью воздействия), делает подобные комбинированные технологии уникальным инструментом для консервации и стерилизации таких сложных природных биоконструктов, которыми являются костные ткани. Синергизм их сочетанного воздействия позволяет достигать высокой степени стерильности обрабатываемого образца при минимальном негативном влиянии на морфомеханические характеристики за счет снижения нагрузки от каждой из компонент воздействия. Применение представленных подходов открывает новые возможности их успешного использования в таких актуальных направлениях, как консервация и стерилизация ископаемых объектов с максимально возможным сохранением их исходной структуры, свойств и характеристик.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Денисов-Никольский Ю.И., Миронов С.П., Омеляненко Н.П. и др. Актуальные проблемы теоретической и клинической ортопедии. М.: ОАО «Типография «Новости», 2005. 336 с.
2. Омеляненко Н.П., Слуцкий Л.И. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). В 2 т. Под ред. академика РАН и РАМН С.П. Миронова. М.: Известия, 2009. Т. I. 380 с. Т. II. 600 с.
3. Кузнецова Т.Г. // Проблемы здоровья и экологии. 2006. Т. 8. № 2. С. 107.
4. Смирнов А.В., Румянцев А.Ш. // Нефрология. 2014. Т. 18. № 6. С. 9.
5. Семёнов А.С., Грищенко А.И., Мельников Б.Е. // Современ. технол. мед. 2015. Т. 7. № 4. С. 22. <https://doi.org/10.17691/stm2015.7.4.03>
6. Воробьев К.А., Божкова С.А., Тихилов Р.М., Черный А.Ж. // Травматология и ортопедия России. 2017. Т. 23. № 3. С. 134.
7. Schnettler R., Franke J., Rimashevskiy D. et al. // Травматология и ортопедия России. 2017. Т. 23. № 4. С. 92. <https://doi.org/10.21823/2311-2905-2017-23-4-92-100>
8. Розанов В.В., Матвейчук И.В., Черняев А.П. и др. // Технологии живых систем. 2018. Т. 15. № 1. С. 41.
9. Розанов В.В., Матвейчук И.В., Пантелеев И.В., Черняев А.П. // Биорадикалы и антиоксиданты. 2018. Т. 5. № 3. С. 252.
10. Розанов В.В., Матвейчук И.В., Черняев А.П., Николаева Н.А. // Медицинская физика. 2019. № 1. С. 54.
11. Хуцистова А.О., Николаева А.А., Розанов В.В. и др. // Ученые записки физического факультета Московского университета. 2022. № 3. С. 1.
12. Стогов М.В., Смоленцев Д.В., Киреева Е.А. // Травматология и ортопедия России. 2020. Т. 26. № 1. С. 181.
13. Черняев А.П. Радиационные технологии. Наука. Народное хозяйство. Медицина. М.: Книжный дом «Университет», 2018. 310 с.
14. Матвейчук И.В., Розанов В.В., Литвинов Ю.Ю. // Альманах клинической медицины. 2016. Т. 44. № 2. С. 193.
15. Литвинов Ю.Ю., Матвейчук И.В., Розанов В.В., Краснов В.В. // Российский журнал биомеханики. 2021. Т. 25. № 2. С. 186. <https://doi.org/10.15593/RZhBiomeh/2021.2.06>
16. Розанов В.В., Матвейчук И.В., Черняев А.П. и др. // Изв. РАН. Сер. физ. 2020. Т. 84. № 11. С. 1589. <https://doi.org/10.31857/S0367676520110241>
17. Розанов В.В., Матвейчук И.В., Пантелеев И.В. // Медицинская техника. 2022. № 5. С. 34.
18. Хуцистова А.О., Розанов В.В., Матвейчук И.В., Черняев А.П. // Вестн. МГУ. Сер. 3. Физика. Астрономия. 2022. № 1. С. 67.
19. Николаева Н.А., Розанов В.В., Матвейчук И.В., Черняев А.П. // Гены и клетки. 2022. Т. 17. № 3. С. 162.
20. Герк С.А., Голованова О.А. // Вестник Омского университета. 2015. № 4. С. 39.
21. Костив Р.Е., Калинин С.Г., Матвеева Н.Ю. // Тихоокеанский медицинский журнал. 2017. № 1. С. 10.

22. Чекишева Т.Н. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2019. Т. 8. № 4. С. 19.
23. Шумилова А.А., Шишацкая Е.И. // Журн. Сибирского федерального университета. 2014. Т. 7. № 2. С. 209.
24. Николаева Н.А., Розанов В.В., Черняев А.П. и др. // Медицинская физика. 2022. № 3. С. 35.
25. Розанов В.В., Хуцистова А.О., Матвейчук И.В., Черняев А.П. // Изв. РАН. Сер. физ. 2022. Т. 86. № 8. С. 1099.
26. Шангина О.Р., Нигматуллин Р.Т. // Морфология. 2006. Т. 129. № 3. С. 44.
27. Sterilization Pouches Market Analysis By Type, Regional Analysis And Forecasts 2021–2026 / Market Research Update. 2021. <https://www.fortunebusinessinsights.com/sterilization-pouches-market-103282>
28. Singh R., Singh D., Singh A. // World J. Radiol. 2016. V. 8. № 4. P. 355. <https://doi.org/10.4329/wjr.v8.i4.355>
29. Пинчук П.В., Левандровская И.А. // Судебно-медицинская экспертиза. 2017. № 5. С. 49.
30. Резник Л.Б., Ерофеев С.А., Стасенко С.А. и др. // Генный ортопедии. 2019. Т. 25. № 3. С. 318.
31. Иванов А.Н., Козадаев М.Н., Богомолова Н.В. и др. // Фундаментальные исследования. 2015. № 1–2. С. 275.
32. Корель А.В., Кузнецов С.Б. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2019. № 4. С. 228.
33. Кузнецова Д.С., Тимашев П.С., Баграташвили В.Н., Загайнова Е.В. // Современные технологии в медицине. 2014. Т. 6. № 4. С. 201.
34. Николаева Е.Д. // Журн. Сибирского федерального университета. 2014. Т. 7. № 2. С. 222.
35. Садовой М.А., Ларионов П.М., Самохин А.Г. и др. // Хирургия позвоночника. 2014. № 2. С. 79.
36. Терещенко В.П., Кирилова И.А., Ларионов П.М. // Успехи современного естествознания. 2015. № 8. С. 66.
37. Щаницын И.Н., Иванов А.И., Ульянов В.Ю. и др. // Цитология. 2019. Т. 61. № 1. С. 16.