

## Оптимизация технологических подходов к получению деминерализованных костных имплантатов для создания на их основе имплантационных препаратов

### Аннотация

Представлены результаты оптимизации технологических подходов к получению и стерилизации костных имплантатов. Предложен усовершенствованный способ получения имплантационных препаратов на примере деминерализованного костного имплантата и субстанции антибактериального лекарственного средства растительного происхождения.

### Введение

Последние десятилетия характеризуются значительным ростом потребности в пластическом материале ввиду увеличения объема реконструктивно-восстановительных операций в травматологии и ортопедии.

Идеальный материал для имплантации, по мнению некоторых авторов, должен иметь способность к биодеградации, замещению новообразованной костью в течение 6 недель [1]. Имплантат из такого материала должен полностью резорбироваться, способствовать прорастанию кровеносных сосудов и костеобразованию, быть инертным по отношению к окружающим тканям [2]. Несмотря на разнообразие материалов, используемых при изготовлении имплантатов в мировой практике (металлы, полимерные композиции, керамика, кораллы) [3], деминерализованная кость остается предпочтительной и является объектом многочисленных исследований.

Материалом для имплантатов, в наибольшей степени отвечающим вышеуказанным требованиям, сочетающим в себе вышеперечисленные свойства, пористость и способность к быстрой биорезорбции, является деминерализованная кость. Деминерализованный костный матрикс (ДКМ) служит матрицей для роста ткани, резорбируется, а также активирует клетки ткани для репаративной регенерации [4]. Костный матрикс действует в качестве системы доставки и выхода веществ, активирующих клетки, а также усиливающих деление клеток и синтез внеклеточного матрикса кости [5]. Сорбционные свойства деминерализованной кости позволяют использовать этот материал для получения имплантационных препаратов, в которых ДКМ может являться носителем лекарственных средств, обеспечивая их адресную доставку в область оперативного вмешательства. Такие имплантаты с антибактериальными свойствами представляют интерес для гнойной хирургии, восстановления органотипичной структуры и утраченной функции кости при наличии инфицирования в зоне оперативного вмешательства. Предложенный в работе подход к получению имплантационных препаратов может способствовать уменьшению риска инфицирования и осложнений после радикального удаления гнойно-некротического патологического очага кости при замещении его имплантатом, обладающим антибактериальными свойствами.

При получении костных имплантатов для достижения наилучшего клинического результата необходимо одновременно решать несколько задач: сохранить остеодуктивные свойства имплантата, не разрушить при механическом воздействии поверхность образца и в то же время добиться стерильности, которая влияет на продолжительность хранения. Это обусловило необходимость настоящей оптимизации биомеханической обработки кости, разработки комбинированного способа стерилизации озono-кислородной смесью с последующим окончательным радиационным облучением [6] герметично упакованных изделий с относительно небольшой величиной поглощенной дозы 11...15 кГр.

**Целью работы** являлась оптимизация технологических подходов к получению стерильных деминерализованных костных имплантатов для создания на их основе имплантационных препаратов с антибактериальными свойствами.

### Материалы и методы

Для отработки и оптимизации технологических подходов к получению костных имплантатов в работе использовали компактное вещество диафиза бедренной кости клинически здоровых половозрелых животных (бык, возраст – 2 года, посмертный период – не более 6 ч).

Механическую обработку компактного вещества диафиза осуществляли с использованием инструментария, обеспечивающего технологичность при работе с минерализованной биологической тканью, сохранность ее свойств и микроструктуры, применимость в условиях ограниченного количества материала.

Для реализации предложенного способа получения образцов костных имплантатов использовали полую цилиндрическую фрезу и универсальное устройство (рис. 1) с шаровой опорой для обеспечения параллельности оси фрезы и обрабатываемого в охлаждающей среде костного фрагмента в случае конической формы используемого участка диафиза кости [7].

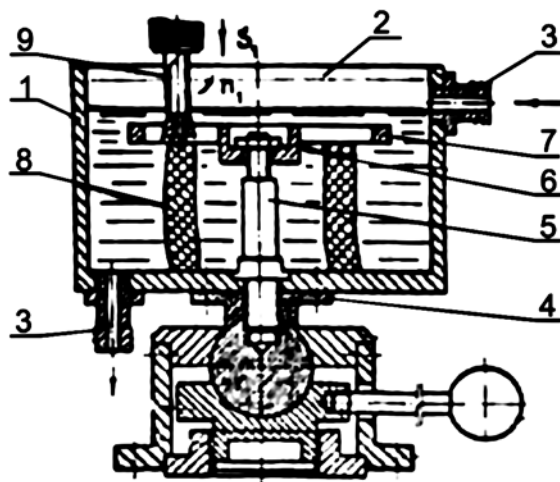


Рис. 1. Универсальное устройство для получения костных образцов в охлаждающей среде: 1 – корпус; 2 – крышка корпуса; 3 – штуцер корпуса; 4 – шаровая опора; 5 – крепежная шпилька; 6 – гайка; 7 – специальная прижимная пластина для крепления и разметки фрагмента диафиза на переднюю, заднюю, латеральную и медиальную зоны; 8 – обрабатываемый фрагмент диафиза; 9 – полая цилиндрическая фреза

Механическую обработку фрагмента диафиза кости проводили с учетом экспериментально установленных оптимальных параметров фрезерования: скорость вращения шпинделя станка – 600 об/мин; скорость подачи фрезы – 5 мм/мин. В качестве охлаждающей среды использовали охлажденный до  $t = +4^{\circ}\text{C}$  раствор натрия хлорида 0,9%. Торцевую поверхность цилиндрических костных фрагментов обрабатывали с использованием прецизионного отрезного станка «IsoMet 4000 LineaPrecisionSaws» («Buehler», Германия), отрезными фрезами с алмазным напылением режущей части. Обработку осуществляли за один проход со следующими оптимальными па-

раметрами резания [8] компактного вещества кости в охлаждающей среде: скорость вращения шпинделя станка – 2000 об/мин; скорость подачи фрезы – 5 мм/мин. Охлажденный до  $t = +4$  °С раствор 0,9%-ного натрия хлорида подавали в зону резания в виде струи, при этом расход охлаждающей жидкости составлял 3 л/мин.

На рис. 2 представлена последовательность биомеханической обработки кости при получении образцов.

В рамках оптимизации технологии получения костных имплантатов был использован комбинированный способ стерилизации образцов и упаковки, основанный на предварительном воздействии озono-кислородной смеси и последующем радиационном облучении. Первый этап: стерилизация озono-кислородной смесью в проточном режиме с концентрацией озона 8 мл/л кислорода; второй этап: радиационная обработка потоком быстрых электронов герметично упакованных образцов с величинами поглощенной дозы 10, 15, 20, 25 кГр.

Для проверки микробной контаминации имплантатов аэробными, анаэробными бактериями и микроскопическими грибами после комбинированной стерилизации проводили микробиологический контроль с использованием питательных сред: тиогликолевая среда и среда Сабуро.

В целях улучшения сорбционных и остеоиндуктивных свойств костных имплантатов проводили их деминерализацию. Минеральную фазу кости удаляли с использованием раствора соляной кислоты (нормальность – 0,8 н), которая обеспечила шадящую деминерализацию в оптимальные сроки экспозиции (72 ч) при соотношении объемов образец/раствор – 1/100. Это позволило исключить смену раствора в процессе деминерализации.

Для отработки и оптимизации технологии получения имплантационного препарата с антибактериальными свойствами проводили иммобилизацию субстанции сангвиритрина [9] на деминерализованном костном матриксе. Лекарственное средство растительного происхождения представляет собой сумму бисульфатов двух близких по структуре и физико-химическим свойствам четвертичных бензо[с]фенантридиновых алкалоидов сангвинарина ( $I 2R = CH_2$ ) и хелеритрина ( $II R = Me$ ) (в виде моногидратов), от которых происходит торговое название медицинского препарата – Сангвиритрин® [9].

Для иммобилизации антимикробного лекарственного средства после отмывки от раствора соляной кислоты образцы инкубировали в раствор 0,9%-ный натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2 % при  $t = +37$  °С, так как, согласно имеющимся данным, ингибирующее действие сангвиритрина на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы проявляется при концентрациях 2...100 мкг/мл [10]. Инкубацию образцов проводили в течение 72 (опыт № 1) и 144 ч (опыт № 2).

Количественное высвобождение иммобилизованного лекарственного средства из полученных деминерализованных имплантатов в раствор 0,9%-ный натрия хлорида контролировали измерением оптической плотности отмывочного раствора при длине волны 321 нм [11], [12] в течение 42 ч с использованием спектрофотометра UV-1800 («Shimadzu», Япония). Данные сравнивали с ранее построенной калибровочной кривой для количественного определения содержания сангвиритрина.

## Результаты

Микробиологический контроль контаминации образцов показал, что одновременная стерилизация образцов и упаков-

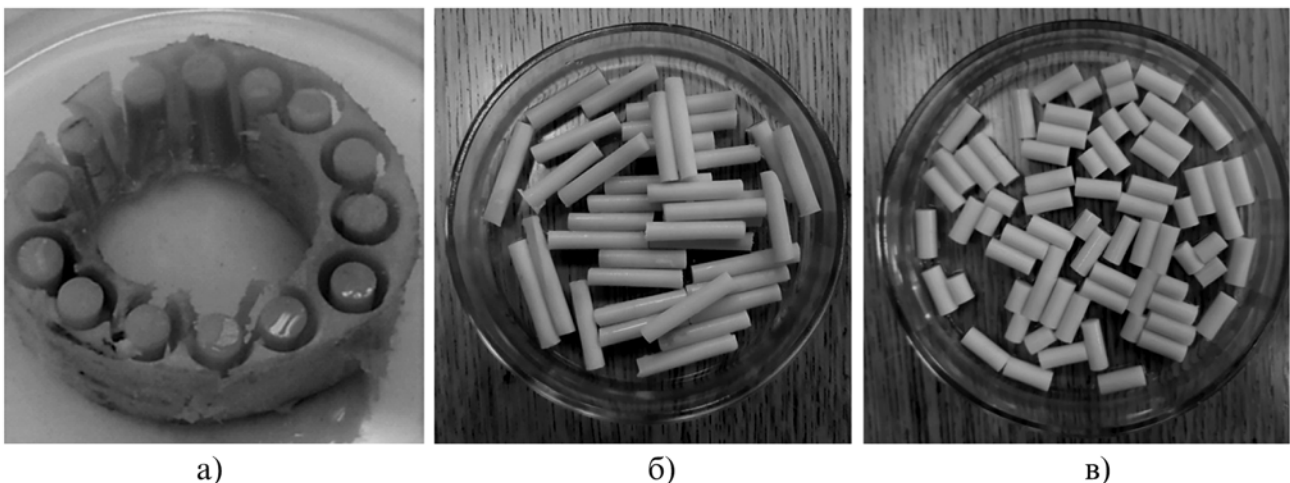


Рис. 2. Последовательность биомеханической обработки фрагмента диафиза бедренной кости: а) получение заготовок с использованием полых цилиндрических фрез в охлаждающей среде; б) цилиндрические заготовки; в) образцы с обработанной торцевой поверхностью

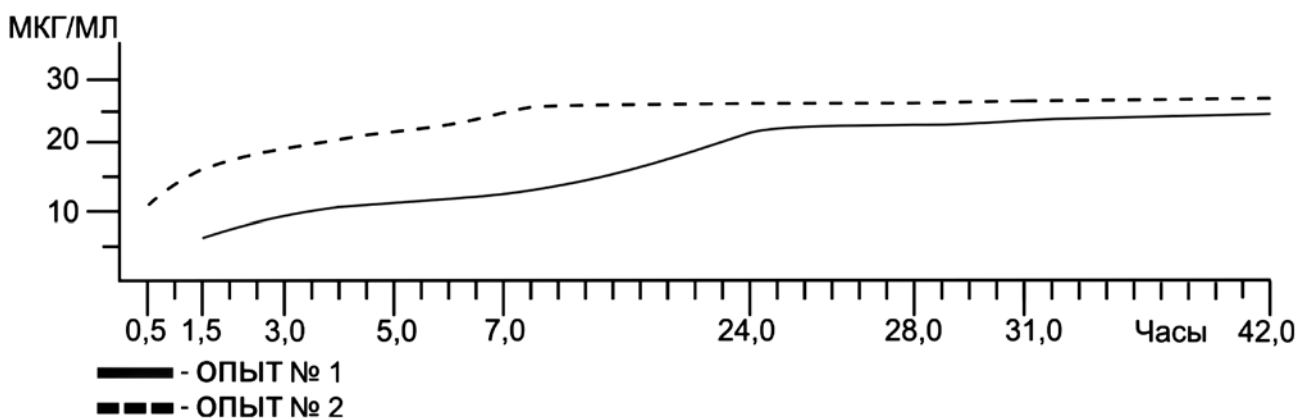


Рис. 3. Динамика пролонгированного высвобождения сангвиритрина

ки в проточном режиме озono-кислородной смесью позволила снизить исходный уровень контаминации костной ткани образца, что, в свою очередь, приводит к снижению резистентности микроорганизмов к воздействию радиации. Этот факт позволил уменьшить уровень поглощенной дозы радиации на втором этапе стерилизации в 2 раза – от общепринятых 25 до 10...15 кГр. Это гарантирует сохранение исходной структуры костного имплантата, функционального потенциала морфогенетических белков костного материала и в целом остеиндуктивных свойств имплантата.

Динамика пролонгированного высвобождения иммобилизованного лекарственного средства в раствор 0,9%-ный натрия хлорида при  $t = +37^\circ\text{C}$  из полученных с использованием предложенных технологических подходов деминерализованных образцов в опытах № 1 и 2 представлена на рис. 3.

По истечении 31 ч кривые зависимости выхода сангвиритрина в раствор условно выходят на плато параллельно оси абсцисс и его высвобождение существенно замедляется в течение 11 ч. Графические зависимости не меняют направленности, что свидетельствует о целесообразности выполнения фотометрических замеров до 42 ч.

Количество высвобожденного в раствор 0,9%-ный натрия хлорида сангвиритрина через 42 ч в опыте № 1 составило 24,8 мкг/мл, в опыте № 2 – 26,8 мкг/мл, что превысило количество высвобожденного сангвиритрина в опыте № 1 на 8 % при двукратном увеличении времени инкубации образцов в раствор для иммобилизации лекарственного средства. Следовательно, для иммобилизации сангвиритрина на деминерализованном матриксе образцов оптимальное время инкубации образцов в раствор 0,9%-ный натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2 % при  $t = +37^\circ\text{C}$  составляет 72 ч. Полученные данные доказывают наличие пролонгирующего эффекта при высвобождении сангвиритрина, необходимого для терапевтического действия лекарственного средства.

Высвобожденные в 0,9%-ный раствор натрия хлорида алкалоиды сангвиритрина проверили на подлинность в соответствии с фармакопейной статьей (ФС 42-3572-98 – «Раствор сангвиритрина 0,2 %»), что может свидетельствовать об отсутствии химического взаимодействия между коллагеном деминерализованного матрикса и алкалоидами лекарственного средства.

Согласно данным [13], установлено отсутствие влияния радиационной стерилизации с величинами поглощенных доз 2,5...25 кГр на качественный состав и количественное содержание алкалоидов сангвиритрина, а также на их антибактериальную активность. Однако ингибирующее действие сангвиритрина после его высвобождения из деминерализованной кости требует дополнительной проверки.

## Заключение

Предложенные усовершенствованные технологические подходы к получению костных имплантатов отличаются от традиционных способов их получения рядом преимуществ: технологичностью, применимостью в условиях ограниченного количества материала, а также позволяют учитывать направление остеонных структур кости.

Комбинированный способ стерилизации позволил сохранить остеиндуктивные свойства полученных костных имплантатов за счет снижения стандартной дозы поглощения при радиационной стерилизации в 2 раза с обеспечением стерильности имплантатов.

Доказано, что предложенные технологические подходы к получению деминерализованных образцов кости сохраняют их сорбционные свойства, что обеспечивает пролонгированное высвобождение лекарственного средства.

Проведенные исследования по совершенствованию технологии получения костных имплантатов и имплантационных препаратов позволяют рекомендовать к дальнейшему использованию предложенные технологические подходы в доклинических исследованиях деминерализованных имплантационных препаратов.

## Список литературы:

1. *Омельяненко Н.П., Миронов С.П., Денисов-Никольский Ю.И., Матвейчук И.В., Карпов И.Н.* Современные аспекты управления репаративной регенерацией костной ткани // Биомедицинские технологии. Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. 2002. № 18. С. 9-22.
2. *Выборнов Д.Ю., Петров М.А., Коротеев В.В., Борхунова Е.Н.* Методы стимуляции репаративного остеогенеза и направления их дальнейшего развития // Биомедицинские технологии. Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. 2002. № 18. С. 23-30.
3. *Омельяненко Н.П., Базанова Э.Б., Шапошников Ю.Г., Карпов И.Н., Матвейчук И.В.* Использование деминерализованного костного матрикса для восстановления поврежденных длинных трубчатых костей со значительными дефектами // Биомедицинские технологии. Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. 1995. № 6. С. 9-15.
4. *Денисов-Никольский Ю.И., Реброва Г.А., Василевский В.К., Докторов А.А., Матвейчук И.В.* Функциональная морфология в развитии проблемы репродукции тканей и биопротезирования // Биомедицинские технологии. Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. 2000. № 14. С. 5-13.
5. *Савельев В.И., Калинин А.В.* Опыт изготовления и применения деминерализованной костной ткани в эксперименте и в клинике // Биомедицинские технологии. Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. 2001. № 17. С. 17-24.
6. *Алимов А.С., Близнюк У.А., Борщеговская К.Ю. и др.* Применение пучков ускоренных электронов для радиационной обработки продуктов питания и биоматериалов // Известия Российской академии наук. Серия физическая. 2017. Т. 81. № 6. С. 819-823.
7. *Литвинов Ю.Ю.* Способ получения биоимплантата на основе стерильного деорганифицированного костного матрикса / Патент № 2708235. Опубликовано 05.12.2019. Бюл. № 34.
8. *Кононович Н.А., Литвинов Ю.Ю., Горбач Е.Н., Попков А.В., Краснов В.В.* Методика пробоподготовки титаносодержащих костно-имплантационных блоков для последующей оценки остеоинтеграции // Медицинская техника. 2020. № 2. С. 31-33.
9. *Вичканова С.А., Фатеева Т.В., Крутикова Н.М. и др.* Сангвиритрин. Подарок природы человеку / Научное издание. – М.: OneBook.ru, 2015. 164 с.
10. *Вичканова С.А., Крутикова Н.М., Фатеева Т.В.* Создание высокоэффективного оригинального природного лекарственного средства сангвиритрин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 11. С. 49-55.
11. *Артамонова Е.С., Куркин В.А.* Актуальные аспекты стандартизации сырья и препаратов маклей // Химия растительного сырья. 2007. № 2. С. 55-58.
12. *Реброва Г.А., Денисов-Никольский Ю.И., Василевский В.К., Докторов А.А., Матвейчук И.В., Синькова И.А.* Применение коллагеносодержащих биополимеров в качестве носителей лекарственных препаратов // Биомедицинские технологии. Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. 1996. № 3. С. 48-51.

13. Фролова А.В., Бузук Г.Н., Царенков В.М., Петров П.Т., Трухачева Т.В., Дунец Л.Н. Лабораторная оценка влияния радиационной стерилизации на химический состав и антибактериальную активность лекарственного средства «ФИТОМП» и его компонента – маклей мелкоплодной // Вестник фармации. 2007. № 1. С. 83-91.

*Юрий Юрьевич Литвинов,*  
канд. биолог. наук, ст. научный сотрудник,  
*Игорь Васильевич Матвейчук,*  
д-р биолог. наук, гл. научный сотрудник,  
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»,

*Владимир Викторович Розанов,*  
д-р биолог. наук, ведущ. научный сотрудник,  
физический факультет,  
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,  
*Виталий Викторович Краснов,*  
д-р биолог. наук,  
зав. отделом медико-биологических проблем,  
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»,  
г. Москва,  
e-mail: vilar.litvinov@mail.ru

*О.А. Шевелев, М.В. Петрова, Ш.Х. Саидов, А.Г. Гудков,  
С.В. Агасиева, Е.Н. Горлачева, С.Г. Веснин*

## Технологии аппаратной терапевтической гипотермии

### Аннотация

Проведен сравнительный анализ технологий аппаратной терапевтической гипотермии применительно к различным неотложным состояниям. Приведены факты, аргументирующие предпочтительное использование внутривенной инвазивной и поверхностной неинвазивной общей гипотермии в нейрохирургии, кардиохирургии и при сердечно-легочной реанимации, а селективной церебральной гипотермии в вариантах назофарингеального и краниocereбрального охлаждения – при черепно-мозговых травмах и инсультах. Адекватный выбор технологии будет способствовать повышению эффективности терапии.

### Введение

Терапевтическая гипотермия (ТГ) в XXI веке переживает период своеобразного ренессанса. В Рекомендациях Европейского совета по реанимации (2010 г.) подчеркивается, что «...терапевтическая гипотермия обладает доказанными эффектами нейропротекции после периода глобальной ишемии» [1], что определило направления ее использования в неотложной медицине, включая инсульты и нейротравмы [2].

В экспериментах убедительно показано, что депрессия метаболизма при понижении температуры головного мозга обеспечивает торможение широкого круга патогенетических реакций, снижая в итоге объем повреждения мозга при ишемии, гипоксии, реперфузии и травме [3].

Кроме того, понижение температуры клеток до 32 °С обуславливает в них развитие выраженной экспрессии ранних генов и активный синтез ряда цитопротекторных белков, обеспечивающих повышение устойчивости нейронов и кардиомиоцитов к повреждающим воздействиям [4]-[6].

Метаболическая и геномная перестройка при достижении достаточной глубины гипотермии – заманчивый путь терапии церебральных катастроф. Однако обнадеживающие результаты экспериментов не получили достаточного клинического подтверждения у пациентов с инсультами и травмой головного мозга по показателям летальности и функциональному результату [7]-[11]. Причину клинических неудач исследователи усматривают в том, что «...терапевтическое охлаждение при помощи нынешних технологий остается очень сложной, ресурсоемкой процедурой, которая может быть упрощена только с внедрением инновационных технологий» [12]. По-видимому, более успешными являются те технологии, которые оказываются наиболее адекватны конкретным клиническим ситуациям по скорости, глубине и точности понижения температуры, адресности низкотемпературных воздействий, учитывая риски развития осложнений.

### Основная часть

#### Температурный мониторинг при индукции гипотермии

Общепринятой является следующая классификация глубины общей гипотермии: очень мягкая (very mild) – 36-35 °С; мягкая (mild) – 35-32 °С; умеренная (moderate) – 32-28 °С; глубокая (deep) – 27-17 °С; сверхглубокая (profound) – меньше 16 °С [13]. При ТГ температуру чаще всего измеряют в мочевом пузыре, пищеводе или прямой кишке.

Значение температурного мониторинга при индукции гипотермии очевидно; однако, интерпретируя его результаты, следует иметь в виду, что температура в различных отделах тела может значительно различаться. Температурная гетерогенность свойственна головному мозгу и особенно ярко проявляется в остром периоде церебральной патологии. У пациентов в первые сутки развития инсультов и травмы мозга температура головного мозга практически всегда оказывается на 1,5...2 °С выше ректальной и температуры в мочевом пузыре. Кроме того, при инсультах и нейротравме формируются области с повышенной до 39...41 °С температурой, а различия между разогретыми и относительно холодными областями достигают 2,5...4 °С, демонстрируя выраженную температурную гетерогенность [14]-[17].

Температура внутренних органов, тимпаническая температура и температура в носоглотке не отражают истинное состояние теплового баланса головного мозга, а применение инвазивных методов ограничено категориями нейрохирургических пациентов. Известная технология протонной ЯМР-спектроскопии не может использоваться для динамического термомониторинга [18]. Пожалуй, единственным методом неинвазивной оценки температуры глубоких тканей является РТМ-технология (радиотермометрия), основанная на регистрации мощности собственного электромагнитного излучения [19], [20]. Эта