

метры расположены на прямом снимке левого сустава). Определены параметры точек C ($\alpha C = 30^\circ$, $\rho C = 1,3$), D ($\alpha D = 65^\circ$, $\rho D = 1,0$) и E ($\alpha E = 40^\circ$, $\rho E = 0,9$). Проведено сопоставление значений параметров на левом и правом суставах (рис. 4). Установлено, что на левом (поврежденном) суставе смещение координат точки C в сравнении с правым (здоровым) суставом составляет 16%, точки D — 12%, точки E — 10%.

После рентгенометрической диагностики констатировано дополнительное повреждение дистального межберцового синдесмоза. Произведена одномоментная ручная репозиция с наложением гипсовой повязки. Сделаны контрольные рентгенограммы левого голеностопного сустава в прямой и боковой проекциях. С помощью измерительного устройства определены полярные координаты точек C , D , E . Полученные значения соответствовали координатам этих точек на правом (здоровом) суставе, что свидетельствовало о правильно выполненной репозиции.

Таким образом, применение измерительного устройства позволяет повысить точность диагностики повреждений голеностопного сустава, коли-

чественно оценивать степень смещения костных отломков и тяжесть травмы, судить о правильности выполненной репозиции.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.с. 1799548 СССР. Способ диагностики повреждений голеностопного сустава /Иванов К.С., Брусенская Е.И. — 1993.
2. Королук И.П. Рентгеноанатомический атлас скелета. — М., 1996.
3. Садофьева В.И. Рентгенофункциональная диагностика заболеваний опорно-двигательного аппарата у детей. — Л., 1986.
4. Садофьева В.И. Нормальная рентгеноанатомия костно-суставной системы детей. — Л., 1990.
5. Предпатент РК № 7713. Устройство для определения координат фрагментов голеностопного сустава и проксимального отдела бедра по рентгенограмме /Иванов К.С., Брусенская Е.И. — 1999.

© Коллектив авторов, 2002

ЛУЧЕВАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННЫХ КОСТНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ В СВЕТЕ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФИЦИРОВАНИЯ ГЕПАТИТОМ В И С

М.В. Лекишвили¹, Е.И. Исаева², В.Н. Пономарев³, М.Г. Васильев¹

¹Центральный институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова,

²Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского,

³Институт биофизики, Москва

С целью определения минимальной эффективной дозы лучевой стерилизации образцы из компактных костных тканей доноров, инфицированных гепатитами В и С, обработанные в соответствии с технологией ЦИТО по изготовлению костных деминерализованных трансплантатов, подвергали воздействию потоком быстрых электронов в возрастающих дозах (от 15 до 50 кГр). Исследования на наличие маркеров HBV и HCV показали, что поглощенные дозы излучения 50 и 36 кГр являются близкими к минимальным для инактивации антигенных структур гепатитов В и С соответственно. При общепринятых в мире нормативных дозах лучевой стерилизации до 35 кГр существует опасность переноса вирусных гепатитов через деминерализованные костные трансплантаты в случае ошибки при диагностике этих инфекций. Учитывая побочное действие лучевой стерилизации на микроструктуру костных имплантатов, необходимо продолжить поиск способов защиты их пластических (кондуктивных и индуктивных) свойств при стерилизации потоком быстрых электронов в дозе 50 кГр.

Donor compact bone specimens infected by B, C hepatitis were exposed to the influence of fast electron flow in increasing doses (from 15 to 50 kGy) for the detection of minimum dose of radiation sterilization. The study of specimens on HBV and HCV markers showed that 50 and 36 kGy were close to minimum doses required for the inactivation of antigen structures of B, C hepatitis, respectively. The danger of virus hepatitis transmission by demineralized bone grafts is present if conventional normative doses of radiation sterilization (up to 35 kGy) are applied. Taking into account the side effect of radiation sterilization on the microstructure of bone grafts it is necessary to continue the search of methods for the preservation of plastic (conductive and inductive) bone properties during sterilization by fast electron flow in 50 kGy dose.

С открытием в последнее время ряда ранее не диагностируемых вирусных инфекций, способных передаваться через костные имплантаты, обеспечение безопасности использования данного мате-

риала в пластической хирургии стало одной из главных проблем биоимплантологии. Объем хирургических вмешательств с использованием биологических тканей возрастает с каждым годом. Есть

определенные успехи в создании и клиническом применении синтетических материалов и биологических тканей, взятых от животных (ксенотрансплантаты). Безусловно, перспективными и многообещающими являются технологии с привлечением генной инженерии, методики клонирования органов и тканей. Каждое направление несет в себе ряд проблем — морально-этических, технологических, иммунологических и др. При создании искусственных материалов проблема исключения опасности инфицирования реципиента через имплантаты решается достаточно эффективно. Сложнее обстоит дело при использовании донорских тканей, в которых могут присутствовать возбудители бактериальной, грибковой и особенно вирусной инфекции [12, 15, 17, 18]. Вместе с тем на сегодняшний день наиболее подходящими имплантатами в травматологии и ортопедии являются именно биологические ткани человеческого происхождения (аллотрансплантаты). В частности, к ним относятся деминерализованные костные трансплантаты (ДКТ), обладающие остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами.

Процесс стерилизации ДКТ — обязательный и чрезвычайно важный этап их изготовления. Лабораторные исследования плазмы крови доноров на наличие антител к вирусу гепатита С (HCV) и антигенов вируса гепатита В (HBV) полностью не гарантируют от ошибок в диагностике вирусных гепатитов. Реальностью остается тот факт, что в настоящее время ложноотрицательные результаты исследований на носительство вирусов гепатитов встречаются при использовании самых чувствительных диагностических методик. Вероятнее всего, это связано с множеством сопутствующих факторов — состоянием иммунитета донора, сроками от начала заболевания и т.д. Как бы то ни было, имеется ряд зафиксированных случаев инфицирования пациентов HIV (ВИЧ), гепатитами HCV и HBV после имплантации им костных и других биологических материалов [8].

Воздействие на донорский инфицированный материал охлаждением (до -80°C) или нагреванием (до $+65^{\circ}\text{C}$) не устраняет опасности передачи вирусов реципиенту [7–13, 19, 20]. Стерилизация оксидом этилена также не гарантирует от возможности инфицирования больных [8]. К тому же остаются спорными вопросы о токсических свойствах оксида этилена и его влиянии на остеоиндуктивную способность ДКТ [9, 14].

Оптимальным методом стерилизации, на наш взгляд, является радиационный (сравнительные характеристики двух видов лучевого воздействия — γ -лучами и потоком быстрых электронов — в настоящей статье не рассматриваются). Мы использовали облучение образцов потоком ускоренных электронов для определения минимальной дозы лучевой стерилизации, при которой происходит разрушение маркеров гепатита В (HBsAg) и гепатита С (РНК) в ДКТ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом изучения являлись образцы, изготовленные из большеберцовых костей человека, размером 2×2 см. Образцы были разделены на две серии (по 24 в каждой): первая — ткани от доноров, инфицированных HBV, вторая — HCV. Диагноз ставился после исследований плазмы крови в аппарате B4312L (Bio-Kinetics Reader) с использованием тест-систем (Rekombi-BEST anti-VGS-Strip и Vectogen B-HBs-antigen-Strip). Доноры выбирались произвольно, степень «загрязненности» материала не определялась.

Инфицированные фрагменты костной ткани проходили все этапы технологии изготовления ДКТ по методике ЦИТО [1]: механическую очистку кости от мягких тканей, обработку 3% раствором перекиси водорода и ультразвуком для удаления элементов крови и жирового компонента соответственно; деминерализацию в 0,6 н. HCl в течение 24 ч; удаление из образцов хлористоводородной кислоты с использованием раствора тиосульфата натрия; помещение деминерализованных образцов в холодильную установку при -35°C (до 10 сут); лиофилизацию в течение 48 ч в установке LZ 9.2; упаковку в стандартные пластиковые пакеты медицинского назначения.

Каждая серия образцов была разделена на 6 групп в соответствии с используемой дозой облучения потоком быстрых электронов — 15, 22, 29, 36, 43 и 50 кГр. Стерилизация проводилась при помощи радиационно-технологических установок ЛУЭ–8–5М и УООЗ МВ с энергией излучения 8–9 МэВ, мощностью дозы 1,0 кГр/с. Погрешность измерения поглощенной дозы излучения составляла 10%.

Сохранение (отсутствие) HBsAg в образцах устанавливали при помощи иммуноферментного теста. Иммуноферментный тест по выявлению HBsAg проводили в соответствии с инструкцией по применению тест-системы Hepanostika HBsAg Uni-Form II фирмы «Organon». Полная инаktivация HBsAg предполагалась тогда, когда отношение результатов замера в опытной лунке к результатам отрицательного контроля было равно или ниже 2,1.

Выделение РНК HCV из исследуемых образцов проводили стандартным методом с применением смеси гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформ [3]. Детекцию РНК HCV выполняли по «nested»-варианту RT-PCR с использованием праймеров на 5'-нетранслируемый регион [16]. Продукты амплификации анализировали путем электрофореза в 2% агарозном геле и окрашивали бромидом этидия. Результаты иммуноферментного анализа регистрировали спектрофотометрически.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты (см. таблицу) свидетельствуют о том, что для создания высокого уровня безопасности при использовании ДКТ необходима, по видимому, минимальная стерилизующая доза около 50 кГр. Достаточной для инаktivации антигенов HCV в том же материале является доза 36 кГр. Современные нормативы лучевой стерилизации биологических тканей в странах, входящих в Европейскую

Результаты определения маркеров гепатита В и С в образцах, облученных разными дозами потока быстрых электронов

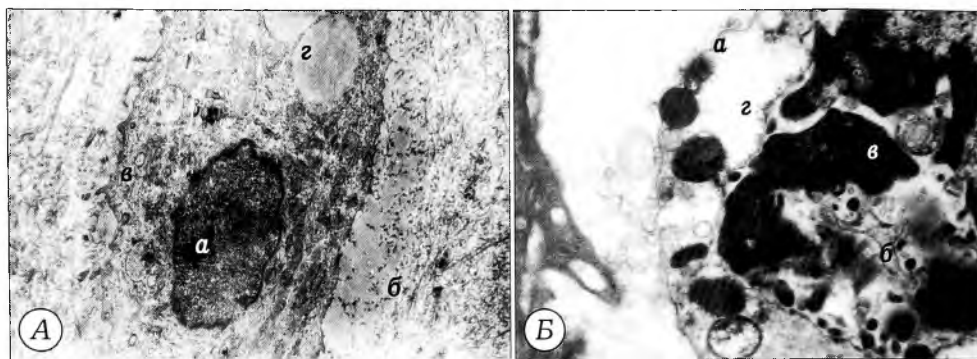
Поглощенная доза, кГр	HBV (HBsAg)	HCV (РНК)
15±1,5	+	+
22±2,3	+	+
29±2,9	+	+
36±3,6	+	–
43±4,3	+	–
50±5,0	–	–

ассоциацию тканевых банков, колеблются в диапазоне от 15 до 35 кГр [2, 5, 6]. При этом отмечаются существенные изменения в сторону уменьшения как прочностных характеристик пластического материала, так и его остеоиндуктивных свойств по мере увеличения поглощенной дозы ионизирующего излучения [6, 10].

Наши данные не согласуются с результатами исследований Surgey и соавт. [4], согласно которым доза лучевой стерилизации, необходимая для вирусной инактивации, приближается к 96 кГр. По нашим данным, радиационная нагрузка на пластический материал в 50 кГр позволяет сочетать высокую степень безопасности имплантатов с относительной сохранностью их остеоиндуктивных свойств. Резкое снижение этих свойств происходит при воздействии на костную ткань ионизирующего излучения в дозе от 50 кГр и выше [6]. Это подтверждается результатами нашего предварительного гистологического исследования образцов, свидетельствующими о значительном повреждении коллагена в имплантатах (см. рисунок).

Необходимость проведения исследований по оптимизации условий лучевой стерилизации биологических тканей очевидна. Открытие возбудителей НСВ и других вирусных инфекций, в частности вируса Якоба—Крейнцифелда, передающихся через биологические объекты, ставит под сомнение безопасность применения алло- и ксенотрансплантатов без проведения дополнительных диагностических тестов. К сожалению, ошибки, связанные с имплантацией инфицированного материала, допущенные за десятилетия существования биоимплантологии исключительно из-за недостаточного уровня знаний, спекулятивно используются против развития этой важнейшей области медицины.

Заключение. Резкое снижение количества и качества донорского материала заставляет уточнять нормы лучевой стерилизации, ставя во главу угла безопасность использования биологического пластического материала и частично жертвуя его свойствами. Установление минимальных доз лучевой стерилизации для инактивации антигенных структур вирусов гепатитов В и С в костных имплантатах на сегодняшний день не является сигналом к использованию ДКТ из инфицированного донорского материала. Однако при определенных условиях в случае необходимости массового изготовления костных трансплантатов воздействие потоком быстрых электронов в дозах, полученных нами в экс-



Состояние клеточных элементов кортикальной кости после стерилизации потоком быстрых электронов. Электронная микроскопия, ув. 62 000.

А — поглощенная доза 25 кГр: ядро клетки плотное, структурированное (а). Межклеточное вещество плотное, коллагеновые волокна сохранены (б). Мембрана остеокита хорошо выражена, без разрывов (в). В цитоплазме видны единичные вакуоли (г);
Б — поглощенная доза 50 кГр: остеокит разрушен, с сохранной клеточной мембраной (а). Ядро пикнотичное (б), хроматин агрегирован (в). Эндоплазматическая сеть сильно разрушена, с многочисленными пустотами и вакуолями (г).

перименте, может стать дополнительным фактором безопасности. При этом, вероятнее всего, пострадают пластические свойства ДКТ. Поэтому необходимо дальнейшее изучение условий защиты биомеханических и остеоиндуктивных свойств ДКТ, подвергающихся стерилизации потоком быстрых электронов с дозой поглощения в пределах 50 кГр.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пат. 217800 РФ от 17.02.99. Способ изготовления костного аллотрансплантата /Лекишвили М.В., Касымов И.А.
2. Пономарев В.Н., Носкова Т.И. //Вестн. АДС «Радтех-Евразия». — 1993. — N 1. — С. 18–21.
3. Chomezynski P., Sacchi N. //Ann. Biochem. — 1987. — Vol. 182, N 3. — P. 156–159.
4. Currey J.D., Foreman J., Laketic I. et al. // J. Orthop. Res. — 1997. — Vol. 15, N 1. — P. 111–117.
5. Dziedzic-Goclawska A. //Allograft against disability: World Congress on tissue banking, 2nd. — Warsaw, 1999. — P. 15–16.
6. Dziedzic-Goclawska A. // Radiation and tissue banking. — Singapore, 2000. — P. 57–99.
7. Hamer A.J., Stockley I., Elson R.A. //J. Bone Jt Surg. — 1999. — Vol. 81B, N 2. — P. 342–344.
8. Joyce M.J. //Allograft against disability: World Congress on tissue banking, 2nd. — Warsaw, 1999. — P. 7–8.
9. Kakiuchi M., Ono K., Nishimura A. et al. //Int. Orthop. — 1996. — Vol. 20, N 3. — P. 142–146.
10. Kaminski A., Dziedzic-Goclawska A. //Allograft against disability: World Congress on tissue banking, 2nd. — Warsaw, 1999. — P. 49.
11. Kuhne J.H., Refior H.J., Jansson V. et al. //Z. Orthop. — 1994. — Bd 132, N 2. — S. 102–111.
12. Le Huec J.C. //Chirurgie. — 1992. — Vol. 118, N 6–7. — P. 397–404.
13. Marthy S., Richter M. //J. Oral. Maxillofac. Surg. — 1998. — Vol. 56. — P. 474–476.
14. Munting E., Wilmar J.F., Wijne A. et al. //Acta Orthop. Scand. — 1988. — Vol. 59, N 1. — P. 34–38.
15. Nemzek J.A., Amoczky S.P., Swenson C.L. //Clin. Orthop. — 1996. — N 324. — P. 275–282.
16. Okamoto H., Okada S., Sugiyama Y. et al. //Jap. J. Exp. Med. — 1990. — Vol. 60, N 3. — P. 215–222.
17. Palmer S.H., Gibbons C.L., Athanasou N.A. //J. Bone Jt Surg. — 1999. — Vol. 81B, N 2. — P. 333–335.
18. Sutherland A.G., Raafat A., Yates P. et al. //J. Hospital Infect. — 1997. — Vol. 35, N 3. — P. 215–222.
19. Tomford W.W., Thongphasuk J., Mankin H.J. et al. //J. Bone Jt Surg. — 1990. — Vol. 72A, N 8. — P. 1137–1143.
20. Tomford W.W. //Ibid. — 1995. — Vol. 77A, N 11. — P. 1742–1754.