

ПОДБОР СПОСОБА СТЕРИЛИЗАЦИИ ТИТАНОВЫХ МАГНИЕВЫХ ИМПЛАНТАЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ С КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫМ ПОКРЫТИЕМ

^{1,2} Бузолева Л.С., ¹Богатыренко Е.А., ¹Портнягина О.А., ³Пузь А.В.

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8), e-mail: buzoleva@mail.ru;

²ФГБУ НИИЭМ им. Г.П. Сомова СО РАМН, Владивосток, Россия;

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия (690022, г. Владивосток, пр. 100-летия Владивостока, 159)

Проведена работа по подбору наиболее оптимального способа стерилизации титановых и магниевых имплантационных материалов с кальций-фосфатным покрытием. Для исследований были выбраны следующие доступные и общеизвестные методы обеззараживания: стерилизация сухим жаром (160°C в течение 2 ч), автоклавирование давлением 1,2-1,5 атм, тиндаллизация (дробная стерилизация при 60°C и 80°C), обработка 70%-ным раствором спирта, обработка ультрафиолетом, сочетанное воздействие 70%-ного раствора спирта и ультрафиолетового света. Самым эффективным способом стерилизации, обеззараживающим поверхности и сохраняющим структуру образцов всех типов изучаемых материалов, оказалась обработка 70%-ным раствором спирта в течение 20 мин в сочетании с 30-минутным облучением ультрафиолетом на расстоянии 45–50 см от бактерицидной лампы.

Ключевые слова: стерилизация, хирургия, титановые имплантаты, магниевые имплантаты

SELECTION OF THE STERILIZATION METHOD FOR OF TITANIUM AND MAGNESIUM IMPLANTS WITH CALCIUM PHOSPHATE COATING

^{1,2} Buzoleva L.S., ¹Bogatyrenko E.A., ¹Portnyagina O.A., ³Puz A.V.

¹Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia (690950, Vladivostok, Sukhanova st. 8), e-mail: buzoleva@mail.ru;

² Research institute of epidemiology and microbiology n.a. G.P. Somov, Vladivostok, Russia;

³Institute of Chemistry, Far-Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia (690022, pr. 100-letiya Vladivostoka, 159)

Work on selection of the most optimum way of sterilization of titanium and magnesium implants with calcium phosphate coating is carried out. For research the following available and well-known methods of disinfecting were chosen: sterilization by dry heat (160°C for 2 h), autoclaving by pressure of 1,2-1,5 atm, a tyndallization (fractional sterilization at 60 °C and 80 °C), 70% ethanol, ultraviolet, the combined influence of 70% ethanol and ultra-violet light. The most effective way of sterilization disinfecting surfaces and keeping structure of all studied samples was treatment with 70% ethanol for 20 min in combination with 30 min radiation by an ultraviolet at distance of 45-50 cm from a bactericidal lamp.

Keywords: sterilization, surgery, titanium implants, magnesium implants

Первое десятилетие нового, XXI в. было объявлено ВОЗ Всемирной декадой костей и суставов. Это обусловлено постоянным увеличением числа больных среди населения ведущих стран мира, у которых регистрируются заболевания и травматические повреждения костно-суставного аппарата. В связи с увеличением случаев травматизма, количества посттравматических и послеоперационных осложнений увеличилась и потребность в пластическом материале для замещения различных дефектов [10].

В хирургических и реанимационных отделениях клиник широко используются различные инвазивные материалы. Однако в настоящее время большую проблему

представляют бактерии, способные колонизировать и формировать биопленки на медицинских имплантатах, катетерах, эндотрахеальных трубках и ином, абсолютно на любых поверхностях. Образование биопленок при этом ведет к возникновению тяжелых имплантатассоциированных инфекционных осложнений, сепсисов [1, 6, 7].

В Институте химии ДВО РАН были изготовлены специальные покрытия для имплантатов, сделанных из сплавов на основе титана и магния. В настоящее время титан и его сплавы являются наиболее распространенным материалом для изготовления костных имплантатов различного назначения. Это связано с его высокими антикоррозионными свойствами и биологической инертностью. По своей химической стойкости титан значительно превосходит другие традиционные материалы, используемые в имплантологии, такие как нержавеющая сталь, сплавы железа, никеля, хрома и кобальта. Важным фактором является также и то, что титан обладает наиболее близкими к костной ткани механическими свойствами [8]. В последнее время возрастает интерес исследователей к изучению сплавов на основе магния и их влияния на остеогенез [9]. Многочисленные эксперименты на лабораторных животных показали, что данные сплавы обладают хорошей биосовместимостью, достаточной коррозионной устойчивостью и имеют модуль упругости (модуль Юнга), который максимально приближен к модулю упругости кортикального слоя кости.

Для использования титановых и магниевых материалов с кальций – фосфатным покрытием в целях заместительных материалов при хирургических операциях необходимо провести научные исследования, позволяющие оценить их имплантационные свойства. В этой связи целесообразно использовать стерильные пластины, для чего следует подобрать условия стерилизации, способствующие сохранению поверхностных структур исследуемых покрытий, с целью дальнейшего их использования в постановке тестовых биологических и медицинских экспериментов. Главной задачей является обеспечение высокого уровня безопасности имплантатов: должна быть исключена возможность инфицирования бактериальными, грибковыми и вирусными инфекциями. Поэтому процесс изготовления любых биологических имплантатов должен сопровождаться надежной стерилизацией с сохранением пластических свойств материалов.

Цель данного исследования – подобрать щадящие способы стерилизации поверхности титановых и магниевых имплантационных материалов с кальций-фосфатным покрытием, обеспечивающие сохранение пластических свойств материалов.

Материал и методы исследования

В качестве материала, на который наносилось покрытие, использовался технически чистый титан марки ВТ1-0 (Fe 0,25%; Si 0,12%; C 0,07%; O 0,12%; N 0,04%; H 0,01%,

остальное Ti). Перед оксидированием образцы в виде плоских металлических пластин размером 8 мм × 8 мм × 2 мм механически обрабатывали до определенного уровня шероховатости ($R_a = 0,12$ мкм), выравнивая поверхность, освобождая ее от различных дефектов, промывали в дистиллированной воде и обезжиривали спиртом (образец 1 ТБП). Плазменное электролитическое оксидирование проводили в биполярном режиме [2, 5] в электролите, содержащем 30 г/л глицерофосфата кальция $(C_3H_7O_6P)Ca \cdot 2H_2O$ и 40 г/л ацетата кальция $Ca(CH_3COOO)_2 \cdot H_2O$ (образец 2 ТПП). Согласно данным рентгенофазового анализа в состав покрытия входит гидроксипатит $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

Для запечатывания пор ПЭО-слоя и создания композиционного полимерсодержащего покрытия использовали ультрадисперсный политетрафторэтилен (УПТФЭ, торговая марка Форум[®]), полученный методом термоградиентного синтеза (метод разработан в лаборатории фторидных материалов Института химии ДВО РАН). Нанесение полимера на ПЭО-покрытие осуществляли двумя способами. При использовании первого – образцы на 10–15 с погружали в суспензию на основе изопропилового спирта, содержащую частицы УПТФЭ размером 0,2–0,6 мкм (100–150 г/л) и смачиватель ОП-10 (6,0–8,0 г/л). После полного испарения изопропилового спирта с поверхности образец подвергали термической обработке при 200–250°C в течение 3 мин (образец 3 ТПУ). Во втором случае нанесение полимера осуществлялось электрофоретическим методом с последующей термообработкой композиционного покрытия в муфельной печи при 315°C в течение 15 мин (образец 4 ТПЭ). Концентрация частиц в используемой суспензии составляла 20 г/л. Напряжение электрофоретического осаждения частиц полимера на ПЭО-слой поддерживалось потенциостатически при значении 200 В.

Для подбора методов стерилизации магниевых образцов использовали аналогичного размера пластины из сплава магния МА8 (Mg–Mn–Ce). Состав сплава следующий (масс. %): 1,5–2,5 Mn, 0,15–0,35 Ce, остальное Mg. Плазменное электролитическое оксидирование проводили в электролите, содержащем 25 г/л глицерофосфата кальция $(C_3H_7O_6P)Ca \cdot 2H_2O$ и 5 г/л фторида натрия (NaF). Раствор готовили путем смешивания компонентов при тщательном перемешивании. Затем путем добавления 20%-ного раствора NaOH pH электролита доводили до значений 10,9–11,3. Оксидирование проводили в гальваностатическом режиме с плотностью тока $j = 0,67$ А/см² в течение $t = 300$ с, при этом конечное напряжение на аноде достигало 540 В. В качестве источника тока использовали реверсивный тиристорный агрегат. Частота поляризующих импульсов составляла 300 Гц. Контроль электрических параметров осуществляли через автоматизированную систему управления и контроля, сопряженную с компьютером, оснащенный соответствующим программным обеспечением.

Для создания композиционного полимерсодержащего покрытия на магниевом сплаве МА8 использовали вышеприведенную методику для образцов на титане ВТ1-0: МА8 с кальций-фосфатным ПЭО-покрытием, обработанный УПТФЭ методом окунания (образец 5 MgПУ), МА8 с кальций-фосфатным ПЭО-покрытием, обработанный УПТФЭ методом электрофоретического осаждения (образец 6 MgПЭ), МА8 с кальций-фосфатным ПЭО-покрытием, полученным в силикатно-фторидном электролите [3, 4], обработанный УПТФЭ методом электрофоретического осаждения (образец 7 MgSiЭ). Данные образцы были получены в Институте химии ДВО РАН и предоставлены для исследования.

Принятые в микробиологической практике стерилизация сухим жаром (160°C в течение 2 ч) и автоклавирование (стерилизация текучим паром при 121°C под высоким давлением 1,2–1,5 атм) были опробованы и исключены, так как приводили к значительной деформации пластин и видимому нарушению их поверхностного слоя. Для стерилизации дисков были использованы следующие методы ввиду их доступности, щадящего действия на поверхность и обеспечения гибели в стерилизуемом материале вегетативных и споровых форм патогенных и непатогенных микроорганизмов:

- тиндализация, или метод дробной стерилизации при низких температурах, — последовательное прогревание сред при температуре 60°C (первый день) и 80°C (второй день) в течение 40 мин метод позволяет уничтожать не только вегетирующие клетки (погибают в течение нескольких минут), но и споры микроорганизмов. Такие воздействия разрушают структуру большинства органических соединений и ведут к значительному испарению жидкостей (например, воды из питательных сред);
- обработка 70%-ным раствором этилового спирта в течение 20 мин;
- обеззараживание ультрафиолетовым излучением в течение 30 мин на расстоянии 45–50 см от источника излучения (максимально возможное расстояние при обработке в ламинаре);
- обработка 70%-ным раствором этилового спирта в течение 20 мин и обеззараживание ультрафиолетовым излучением в течение 30 мин на расстоянии 45–50 см.

После стерилизации указанными способами были сделаны посевы методом отпечатка пластин на чашки Петри с питательным агаром. Контролем послужили диски, не подвергавшиеся стерилизации.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований были получены результаты, представленные в таблице 1. Исходно обсемененность необработанных пластин микроорганизмами была выше по сравнению с обработанными.

Таблица 1

Обсемененность титановых и магниевых пластин после стерилизации разными способами (количество выросших колоний)

| тип образцов | контроль | методы стерилизации | | | | |
|-----------------|----------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--|---|
| | | 60°С 40 мин (первые сутки) | 80°С 40 мин (вторые сутки) | спирт 70% (20 мин) | УФ-излуче ние (30 мин), 45–50 см от источника | спирт 70% (20 мин) + УФ-излучен ие (30 мин), 45–50 см от источника |
| ТБП обр. 1 | 54±6 | 8±2 | 25±2 | 4±1 | 3±1 | 0 |
| ТПП обр. 2 | 1±0 | 7±1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ТПЭ обр. 4 | 20±5 | 9±1 | 0 | 15±2 | 0 | 0 |
| ТПУ обр. 3 | 9±1 | 7±2 | 10±2 | 3 ±1 | 0 | 0 |
| MgSiЭ обр. 7 | 1±0 | 5± 1 | 0 | 0 | 2±0 | 0 |
| MgПЭ обр. 6 | 2±0 | 5±1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MgПУ обр. 5 | 8±3 | 11±2 | 0 | 0 | 2±0 | 0 |

Можно отметить, что титановые пластины с электролитическим оксидированием и промытые в дистиллированной воде (ТПП), а также с ПЭО-покрытием и обработанные электрофорезом (ТПЭ) лучше поддавались предложенным методам стерилизации, чем необработанные титановые пластины. Однако тиндализация не была в данном случае эффективной. В результате такого дробного прогрева погибают вегетативные клетки бактерий, проросшие из термостойких спор. Основной недостаток — невозможность полной элиминации микроорганизмов, так как некоторые споры не успевают прорасти во временных интервалах между сеансами прогревания, а некоторые вегетативные клетки успевают образовать термостабильные споры. Малое количество колоний на чашке в контроле и большое количество после воздействия температурой 60°С говорит о том, что на поверхности дисков отсутствовали вегетативные клетки микроорганизмов, а присутствовали споровые формы, которые после действия температурой 80°С проросли, возвратившись к состоянию вегетативной клетки. В результате обработки высокой температурой поверхности магниевых пластин становились более пористыми по сравнению с контролем.

Спиртовая обработка не была эффективной в случае титановых пластин. Более длительное пребывание в спиртовом растворе приводило к видимым изменениям на поверхности пластин, как магниевых, так и титановых.

Обработка УФ не была эффективной в случае использования пластин с магниевым покрытием. Если облучение проводили на более коротком расстоянии, наблюдали изменения на поверхности исследуемых пластин.

Вариантом, когда все виды пластин после стерилизации оказались стерильными, было сочетанное использование спиртовой обработки в течение 20 мин с последующим подсушиванием под УФ-лампой в течение 30 мин на расстоянии 45–50 см от источника излучения.

Заключение

Обработка температурой последовательно (60 и 80°C) с экспозицией 40 мин была эффективна для всех типов образцов, кроме титановых без покрытия (ТБП) и ТПУ. Однако воздействие температурой на магниевые пластины приводило к деформации их поверхности, что проявлялось в увеличении пористости материала по сравнению с контролем. Обработка 70%-ным этиловым спиртом в течение 20 мин была эффективна только для магниевых образцов и ТПП. Воздействие на исследуемые материалы ультрафиолетом показано, что наиболее уязвимыми в этом отношении являются пластины из сплавов магния. УФ-излучение не давало необходимого результата, а при уменьшении расстояния от бактерицидной лампы происходила визуальная деформация поверхности магниевых пластин. По итогам проведенных исследований самым эффективным методом стерилизации, обеззараживающим поверхности и сохраняющим структуру образцов всех типов изучаемых материалов, оказалась обработка 70%-ным раствором спирта в течение 20 мин в сочетании с 30-минутным облучением ультрафиолетом на расстоянии 45–50 см от бактерицидной лампы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 14-33-00009) и Правительства РФ (Федерального агентства научных организаций).

Список литературы

1. Винник Ю.С., Серова Е.В., Андреев Р.И. Особенности формирования микробных биоплёнок на различных субстратах. Возможность изучения биопленок на желчных конкрементах // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5. — Режим доступа: www.science-education.ru/111-10371.
2. Гнеденков С.В., Синебрюхов С.Л., Сергиенко В.И. Композиционные многофункциональные покрытия на металлах и сплавах, формируемые плазменным электролитическим оксидированием.– Владивосток: Дальнаука, 2013. — 460 с.
3. Гнеденков С.В., Синебрюхов С.Л., Хрисанфова О.А., Егоркин В.С., Машталяр Д.В., Сидорова М.В., Гнеденков А.С., Волкова Е.Ф. Свойства покрытий, сформированных на магниевом сплаве МА8 методом плазменного электролитического оксидирования // Вестник ДВО РАН. 2010. — № 5. — С. 35–46.

4. Гнеденков С.В., Хрисанфова О.А., Завидная А.Г. и др. Способ получения защитных покрытий на сплавах магния / Патент РФ № 2357016 // Б.И. 2009. № 15.
5. Гнеденков С.В., Шаркеев Ю.П., Синебрюхов С.Л., Хрисанфова О.А., Легостаева Е.В., Завидная А.Г., Пузь А.В., Хлусов И.А. Функциональные покрытия для имплантационных материалов // Тихоокеанский медицинский журнал. 2012. — № 1. — С. 12–19.
6. Голуб А.В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии? // Клиническая микробиологическая антимикробная химиотерапия. – 2012. — № 1. – С. 23–29.
7. Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В. Проблемы в медицине, связанные с бактериальными пленками // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 4. – С. 268–275.
8. Манцуров А.А., Гороховский А.В., Бурмистров И.Н., Третьяченко Е.В. Строение и свойства биосовместимых поверхностных слоев, полученных при химической обработке титановых имплантов // Фундаментальные исследования – 2014. – Т. 11, №2. – С. 311–315.
9. Черный В.Н. Перспективы применения биodeградирующих сплавов на основе магния в остеосинтезе // Запорожский медицинский журнал. – 2013. – Т. 66, №81. – С. 76–79.
10. Rodriguez B., Romero A., Soto O., de Varonva O. Biomaterials for orthopedics // Applications of engineering mechanics in medicine. – 2004. – P. 5–26.

Рецензенты:

Мартынова А.В., д.м.н., профессор каф. биохимии, микробиологии и биотехнологии ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток;

Кузнецова Татьяна Алексеевна, д.б.н., зав. лабораторией иммунологии ФГБУ НИИЭМ им. Г.П. Сомова, СО РАМН, г. Владивосток.