

ВЛИЯНИЕ МЕТОДОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ КЕРАМИЧЕСКИХ МЕДИЦИНСКИХ ИМПЛАНТОВ

А. Р. Билялов [✉], С. В. Пятницкая, Г. А. Рафикова, В. Н. Акбашев, А. Т. Бикмеев, И. Ш. Ахатов, О. Р. Шангина, С. С. Чугунов, А. А. Тихонов
Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Уфа, Россия

Выбор метода стерилизации керамических имплантов играет ключевую роль, поскольку может оказывать влияние на химические и физико-механические свойства материала и его биосовместимость. Возможное повышение цитотоксичности после стерилизации негативно влияет на остеоинтеграцию. Целью исследования было определить цитотоксичность керамических образцов с пористой структурой после проведения наиболее распространенных методов стерилизации. Методом стереолитографии были подготовлены образцы из гидроксиапатита, трикальцийфосфата и оксида алюминия. Образцы из костного аллогraftа были изготовлены методом DLP. Отжиг проводили при 800 °С и скорости нагрева 3 °С в минуту 4 ч, а спекание при температуре до 1200 °С. Использовали следующие методы стерилизации: автоклавирование при 1 атм, 120 °С, 45 мин; радиационная стерилизация, 25 с поглощенной дозой 25 кГр; плазменно-перекисная стерилизация, 42 мин; стерилизация сухим жаром при 180 °С 60 мин. Цитотоксичность определяли МТТ-тестом с экспозицией в CO₂ инкубаторе 24 ч. Результаты исследования: для ГА высокая пористость увеличивает значения при переходе от автоклавирования (0,1115) к плазменно-перекисной стерилизации (0,2023). Средняя и низкая пористость показывают аналогичное поведение, с пиками при сухожаровой стерилизации (0,4954 и 0,4505). Для ОА характерна высокая жизнеспособность при сухожаровой стерилизации. Результаты для ТКФ стабильны, но при низкой пористости заметен рост после автоклавирования (0,078 до 0,182 при стерилизации сухим жаром). Исследование формирует основу для оптимизации технологии изготовления и методов стерилизации керамических имплантов для обеспечения их высокой биосовместимости.

Ключевые слова: медицинская керамика, 3D-печать, аддитивные технологии, стерилизация, импланты, жизнеспособность клеток, керамика

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда по гранту № 23-15-20042.

Вклад авторов: А. Р. Билялов — концепция исследования, анализ данных, редактирование статьи; С. В. Пятницкая — проведение экспериментальных исследований по оценке цитотоксичности (МТТ-тест), анализ результатов; Г. А. Рафикова — подготовка цифровых моделей и изготовление образцов, анализ механических и биологических свойств материалов; В. Н. Акбашев — проведение экспериментов по стерилизации, анализ влияния методов стерилизации на материалы; А. Т. Бикмеев — математическое моделирование параметров материалов, интерпретация полученных данных; И. Ш. Ахатов — координация работы, общее руководство, редактирование статьи; О. Р. Шангина — анализ пористости и плотности образцов, статистическая обработка данных; С. С. Чугунов — проведение термической обработки и спекания образцов, описание материалов и методов; А. А. Тихонов — оценка микроструктурных изменений с использованием СЭМ, написание раздела «Электронная микроскопия».

✉ **Для корреспонденции:** Азат Ринатович Билялов
ул. Ленина, д. 3, к. 119, 450008, Республика Башкортостан, г. Уфа, Россия; azat.bilyalov@gmail.com

Статья получена: 14.12.2024 **Статья принята к печати:** 18.02.2025 **Опубликована онлайн:** 27.02.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.009

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

THE EFFECT OF STERILIZATION METHODS ON THE CYTOTOXICITY OF CERAMIC MEDICAL IMPLANTS

Bilyalov AR [✉], Piatnitskaia SV, Rafikova GA, Akbashev VN, Bikmeyev AT, Akhatov ISh, Shangina OR, Chugunov SS, Tikhonov AA
Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ufa, Russia

The choice of the sterilization method for ceramic implants is critically important, as it can affect the chemical and physico-mechanical properties of the material and its biocompatibility. Higher cytotoxicity, which is a possible side effect of sterilization, hinders osseointegration. This study aimed to determine the cytotoxicity of porous ceramic samples after sterilization using the most common methods. Samples of hydroxyapatite (HA), tricalcium phosphate (TCP), and aluminum oxide (AO) were prepared by stereolithography, and bone allograft samples were made using the DLP method. The annealing lasted for 4 hours, with a peak temperature of 800 °C and the temperature increment of 3 °C per minute; the sintering temperature was up to 1200 °C. We used the following sterilization methods: autoclaving at 1 atmosphere, 120 °C, for 45 minutes; radiation sterilization, 25 seconds with an absorbed dose of 25 kGy; plasma peroxide sterilization, 42 minutes; dry heat sterilization at 180 °C, for 60 minutes. Cytotoxicity was determined with the help of an MTT assay (24-hour exposure in a CO₂ incubator). The results of the study: for HA, high porosity means growth of values in transition from autoclaving (0.1115) to plasma peroxide sterilization (0.2023). Medium and low porosity show similar results, with peaks in dry-heat sterilization (0.4954 and 0.4505). As for for AO, it exhibited high viability when subjected to this method. The TCP samples have shown stable results, but their low-porosity variation had the values growing after autoclaving (0.078 to 0.182, dry-heat sterilization). The study forms the basis for optimizing the ceramic implants manufacturing technology and sterilization methods to ensure their high biocompatibility.

Keywords: medical ceramics, 3D printing, additive technologies, sterilization, implants, cell viability, ceramics

Funding: the work was supported by the Russian Science Foundation under grant No. 23-15-20042.

Author contribution: Bilyalov AR — study conceptualization, data analysis, article editing; Piatnitskaia SV — cytotoxicity evaluation (MTT test), analysis of the results; Rafikova GA — preparation of digital models and sample production, analysis of mechanical and biological properties of materials; Akbashev VN — sterilization experiments, analysis of the effect of sterilization methods on materials; Bikmeyev AT — mathematical modeling of material parameters, interpretation of the data obtained; Akhatov ISh — coordination of work, general guidance, article editing; Shangina OR — analysis of the samples' porosity and density, statistical data processing; Chugunov SS — samples heat treatment and sintering, description of materials and methods; Tikhonov AA — assessment of microstructural changes using SEM, writing the section "Electron microscopy."

✉ **Correspondence should be addressed:** Azat R. Bilyalov
Lenina, 3, ap. 119, 450008, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia; azat.bilyalov@gmail.com

Received: 14.12.2024 **Accepted:** 18.02.2025 **Published online:** 27.02.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.009

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Пористость и плотность керамических материалов — ключевые параметры, определяющие их механические и биологические свойства. Эти характеристики играют решающую роль в разработке материалов для медицинских имплантатов.

Пористость как показатель количества пустот в материале значительно влияет на его способность взаимодействовать с окружающими тканями [1]. Высокая пористость улучшает биологическую совместимость, создавая условия для инвазии остеогенных клеток и формирования кровеносных сосудов в структуре имплантата [2]. Этот процесс, известный как остеоинтеграция, критически важен для успешного приживления имплантатов. Кроме того, высокая пористость способствует свободной циркуляции биологических жидкостей, что восстанавливает метаболизм в окружающих тканях и ускоряет процесс регенерации кости [3].

Однако высокая пористость имеет недостатки. Она снижает механическую прочность имплантатов, что особенно критично в условиях высоких циклических нагрузок, например, на опорных поверхностях суставов или позвоночнике. В то же время низкая пористость может затруднять остеоинтеграцию, ограничивая развитие костной ткани и замедляя процесс заживления [4].

Плотность отражает степень уплотнения материала и может влиять на механические свойства, такие как прочность, модуль упругости, ударная вязкость, износостойкость, предел текучести и усталость. Материалы с высокой плотностью обычно обладают высокой прочностью, так как в них атомы расположены более плотно, что обеспечивает более сильные межатомные связи. Это делает такие материалы устойчивыми к механическим воздействиям. В то же время монолитность небологических материалов, обладающих высокой прочностью, не позволяет клеткам проникать в объем материала биоинженерных конструкций и, тем самым, может негативно повлиять на биологическую совместимость имплантатов, затрудняя остеоинтеграцию. Для получения управляемых механических свойств имплантов в ряде случаев прибегают к созданию композитных изделий на основе уже изученных и применяемых материалов [5]. Применение композитов и композитных покрытий, представляющих собой смесь исходного металла и биорезорбируемого материала, позволяет не только получить пористую структуру, постепенно заселяемую клетками организма, но и предоставить структурную матрицу для роста костной ткани [6].

Материалы на основе гидроксиапатита (ГА), трикальцийфосфата (ТКФ) и консервированного костного аллогraftа демонстрируют уникальное сочетание механических и биологических свойств, что делает их незаменимыми в реконструктивной и регенеративной медицине. Их пористость играет критическую роль в процессе остеогенеза, создавая оптимальную среду для формирования новой костной ткани и интеграции имплантата с костной структурой. Поверхности керамических имплантов из ГА и ТКФ обладают выраженными остеоиндуктивными свойствами и создают оптимальные условия для адгезии и пролиферации остеогенных клеток. В отличие от костных алло- и ксеноимплантатов, керамика не содержит биологически активных факторов, индуцирующих остеогенез, однако ее микропористая структура способствует формированию костной ткани за счет пассивной остеоиндукции. Остеоиндукция керамики обеспечивается за счет

постепенного высвобождения ионов кальция и фосфатов в окружающую среду, что стимулирует пролиферацию остеобластов и дифференцировку мезенхимных стволовых клеток. Кроме того, механические свойства пористых керамических имплантатов играют важную роль в регенерации костной ткани, обуславливая структурную поддержку для формирования новой кости и васкуляризации. Оптимальный размер пор (100–300 мкм) обеспечивает благоприятные условия для адгезии остеогенных клеток и васкуляризации [7, 8]. В частности, поры оптимальных размеров улучшают взаимодействие материала с костной тканью, что создает условия для формирования новой кости [9].

Остеоиндуктивные свойства материалов характеризуют их способность стимулировать образование новой костной ткани. Биокерамика на основе гидроксиапатита или трикальцийфосфата является высокобиосовместимой и обладает хорошими остеоиндуктивными свойствами, создает структуру, способствующую росту костной ткани по ее поверхности. Но керамика, как правило, не обладает выраженными остеоиндуктивными свойствами, как некоторые другие материалы, и действует скорее, как каркас для костной ткани, обеспечивая механическую поддержку. Аллогенные имплантаты, полученные от доноров того же вида, часто имеют выраженные остеоиндуктивные и остеоиндуктивные свойства. Изделия из этого материала могут включать как минерализованные, так и деминерализованные компоненты, и именно деминерализованные костные аллоимплантаты имеют более выраженные остеоиндуктивные свойства. Ксеноимплантаты, полученные от животных, также могут обладать остеоиндуктивными свойствами, но их остеоиндуктивность ограничена. Из-за различий в клеточных компонентах и белках ксеноимплантаты могут не всегда эффективно взаимодействовать с человеческой костной тканью, что ограничивает их остеоиндуктивный потенциал по сравнению с аллоимплантатами. При этом они могут быть использованы для замещения костной ткани в определенных ситуациях, но с более ограниченными возможностями для стимуляции роста новой кости [10].

Особую роль в обеспечении безопасности и эффективности использования медицинских устройств и имплантатов играет выбор оптимального метода стерилизации. В медицинском арсенале имеется множество методов стерилизации, каждый из которых оказывает различное воздействие на имплантируемые биоматериалы. Физические методы включают тепловую стерилизацию, фильтрацию и применение излучения. Химические методы основаны на использовании химических агентов для уничтожения микроорганизмов. К ним относят газовую и жидкостную стерилизацию [11, 12]. Высокую эффективность показывают комбинированные методы — плазменная стерилизация с применением газообразной перекиси водорода и плазмы, а также стерилизация ультрафиолетовым методом в кислороде [13, 14].

Проводившиеся ранее исследования стерилизации пористых биокерамических материалов показали влияние стерилизации на физико-химические свойства имплантов, но не сравнивают биологический эффект различных видов стерилизации для пористых керамических имплантов [11, 15].

Данное исследование ставит своей целью определение цитотоксичности керамических образцов с пористой структурой после проведения наиболее распространенных

методов стерилизации для дальнейшего улучшения материалов и технологии производства керамических имплантов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление образцов

Подготовка цифровой модели

На первом этапе геометрию образцов разрабатывали в программном обеспечении Компас-3D («АСКОН-Системы проектирования», Россия). Образцы проектировали в виде цилиндров с диаметром 4 мм и высотой 2 мм. Размеры образцов были адаптированы под стандартные планшеты, которые использовали для проведения МТТ-теста (methyl-thiazolyl-tetrazolium), что обеспечило полное соответствие их геометрических параметров нормативным требованиям тестирования. Усадка на этапе термообработки и отжига связующего вещества составляла около 20%, что характерно для керамических материалов при высокотемпературном спекании. На рис. 1 представлена цилиндрическая 3D-модель керамического образца (диаметр 4 мм, высота 2 мм), созданная с учетом усадки 20%, характерной для высокотемпературного спекания керамических материалов.

Печать образцов из гидроксиапатита, трикальцийфосфата и оксида алюминия

Перед началом 3D-печати был проведен предварительный тест полимеризации, который позволил определить такие параметры, как длина волны лазерного излучения и толщина слоя фотополимеризуемой пасты. По результатам теста, были установлены их оптимальные значения, которые использовали в процессе печати. Лазерную стереолитографию изделий из гидроксиапатита, трикальцийфосфата и оксида алюминия осуществляли на установке Ceramaker 900 (3D Ceram Sinto, Франция), для фотополимеризации керамической пасты применяли лазер с длиной волны 355 нм, что обеспечивало высокую точность и однородность структуры образцов (рис. 2).

Очистка образцов

После завершения печати образцы подвергались процессу механической промывки с использованием системы Cerakleaner (3D Ceram Sinto, Франция). На рис. 3 представлены напечатанные образцы, очищенные от остатков неполимеризованной пасты с использованием системы Cerakleaner. Очистка была необходима для удаления остатков неполимеризованной керамической пасты и подготовки образцов к этапу термообработки.

Далее образцы помещали в высокотемпературную печь Kittec CLL15 (KITTEC GmbH, Германия) для отжига при температуре 800 °С. Термообработку осуществляли при скорости нагрева 3 °С в минуту, время экспозиции составило 4 ч. Данные параметры были выбраны с целью обеспечения равномерного прогрева образца, что позволило уменьшить вероятность образования трещин и полностью удалить влагу, а также полимерное связующее.

На заключительном этапе образцы подвергали термообработке и спеканию в лабораторной печи L15/14/C450 производства Nabertherm GmbH (Германия).

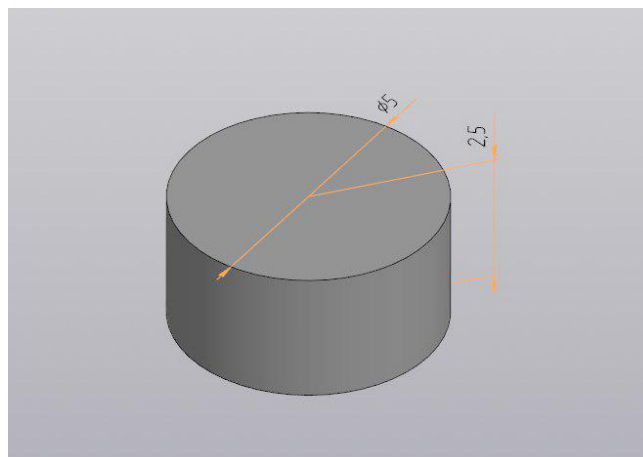


Рис. 1. Цилиндрическая 3D-модель керамических образцов с учетом усадки 20%

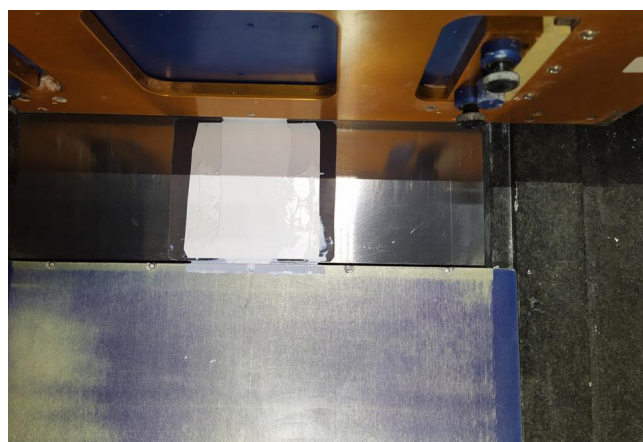


Рис. 2. Процесс печати керамических образцов из гидроксиапатита на 3D-принтере Ceramaker 900

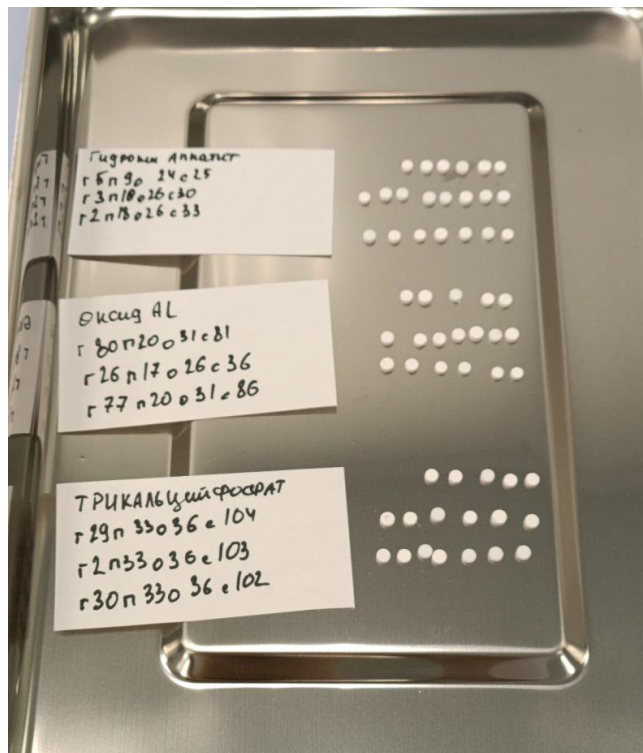


Рис. 3. Изображение керамических образцов, напечатанных на 3D-принтере после этапа механической промывки

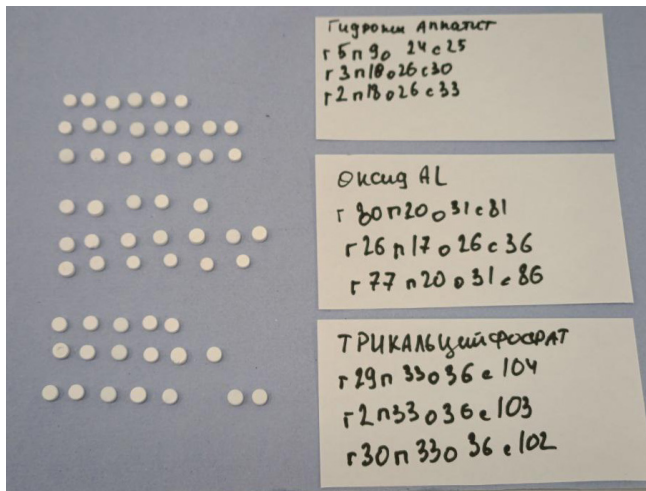


Рис. 4. Керамические образцы из ГА и ТКФ после отжига и спекания

Температурные режимы спекания подбирали индивидуально для каждого типа керамического материала с целью предотвращения нежелательных структурных изменений. Для оксида алюминия (ОА) применяли более высокие температуры, так как этот материал сохраняет свою структуру даже при сильном нагреве. Для трикальцийфосфата (ТКФ) и гидроксиапатита (ГА) использовали более низкие температуры спекания, поскольку при повышенных температурах эти материалы могут изменить свою структуру: ТКФ подвержен фазовым превращениям, а ГА может частично преобразовываться в ТКФ. Учитывая эти особенности, были подобраны оптимальные температурные режимы, что позволило избежать нежелательных изменений и получить три типа керамических образцов с различной пористостью: высокой, средней и низкой [16]. На рис. 4 продемонстрированы финальные образцы, прошедшие термообработку при различных режимах спекания.

Печать образцов из суспензии костного аллогraftа

Для осуществления 3D-печати методом DLP (Digital Light Processing) была подготовлена суспензия из размолотого до фракции 0–5 мкм порошка костного аллогraftа. На 3D-принтере Elegoo Mars 4 (ELEGOO, Китай) из суспензии полимеризовались образцы с толщиной слоя 25 мкм (рис. 5).



Рис. 5. Процесс печати керамических образцов из костного аллогraftа на 3D-принтере Elegoo Mars 4

В результате 3D-печати из костного аллогraftа были получены образцы в формате «зеленого тела». Для получения полноценных образцов проводили двухстадийную термическую обработку. На первой стадии образцы нагревали до температуры 700 °С со скоростью 3 °С/ч. В результате первой стадии термообработки были получены слабоконсолидированные образцы (рис. 6), имеющие высокую пористость (до 42,3%). На второй стадии термообработки образцы были подвергнуты высокотемпературному спеканию при температуре 1300 °С и выдержке 1 ч. Скорость нагрева составляла 120 °С/ч. В результате второй стадии термообработки были получены относительно прочные и плотные образцы.

Определение пористости и плотности

В нашем исследовании параметры пористости и плотности были определены для каждого образца с использованием данных о массе, объеме и теоретической плотности материалов.

Измерение массы: массу каждого образца была измеряли с помощью аналитических весов с точностью до 0,001 г.

Измерение объема: объем образца рассчитывали по его геометрическим параметрам (цилиндрической формы) по формуле:

$$V = \pi \times r^2 \times h,$$

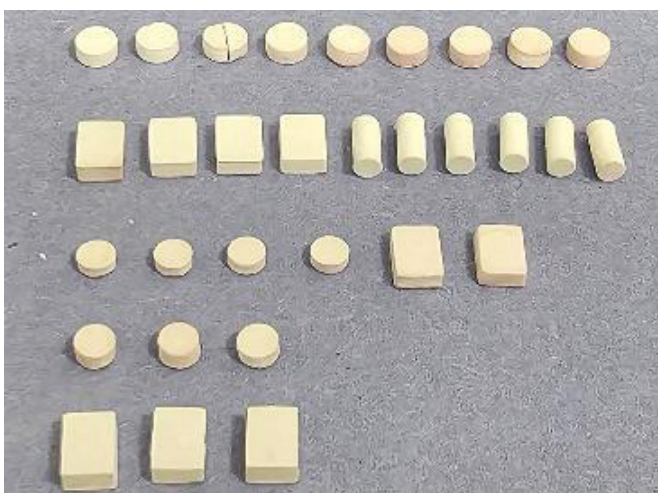
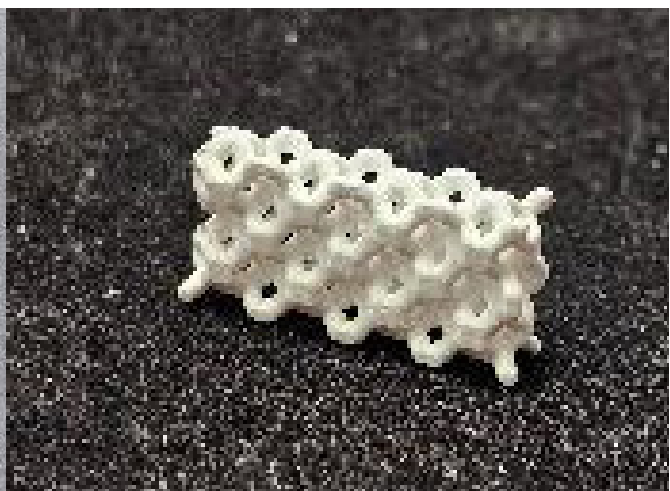


Рис. 6. Керамические образцы из костного аллогraftа после отжига и спекания



Микроструктура аддитивного материала, полученного из гидроксиапатита, трикальцийфосфата и оксида алюминия

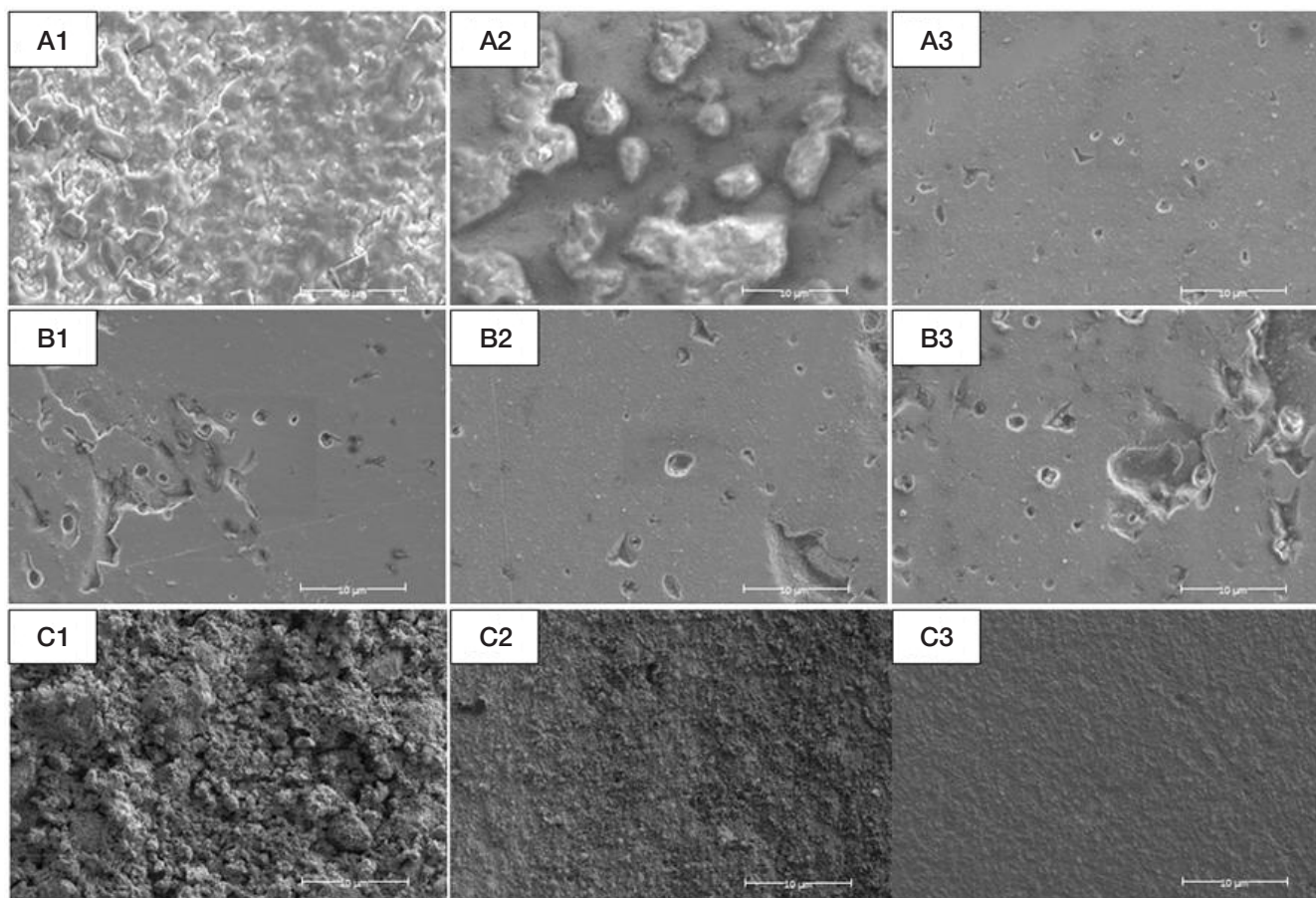


Рис. 7. Микроструктура аддитивного материала, полученного из гидроксиапатита (A1–3), трикальцийфосфата (B1–3), оксида алюминия (C1–3)

где V — объем образца, r — радиус основания цилиндра, а h — высота образца.

Расчет плотности: плотность (ρ образца) каждого образца определяли по формуле:

$$\rho \text{ образца} = \frac{m \text{ образца}}{V \text{ образца}},$$

где m образца — масса образца, V образца — объем образца.

Расчет пористости: пористость (P) определяли по следующей формуле:

$$\text{Пористость (\%)} = \left(1 - \frac{\rho \text{ образца}}{\rho \text{ теоретическая}}\right) \times 100,$$

где ρ теоретическая — это теоретическая плотность материала без пор.

После проведения измерений массы, объема, плотности и пористости образцов было выявлено, что данные параметры демонстрируют значительные вариации в зависимости от типа керамического материала и применяемого режима спекания (см. табл.). Эти изменения обусловлены особенностями фазовых переходов при термообработке, влияющими на степень уплотнения структуры материала и формирование пор.

Электронная микроскопия

Для оценки микроструктуры, среднего размера частиц и степени спекания при различных температурных

режимах использовали метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Образцы были предварительно подготовлены для исследования путем контролируемого разрушения для получения срезов внутренней структуры, что обеспечило возможность детального анализа микроструктурных изменений после процесса спекания. Исследования проводили на сканирующем электронном микроскопе модели Quattro S (Thermo Fisher Scientific, Нидерланды) при уровне увеличения $\times 10\,000$. Особое внимание было уделено определению среднего размера частиц и степени их уплотнения в процессе спекания (рис. 7).

Метод оценки цитотоксичности

Для оценки цитотоксичности применяли МТТ-тест, который определяет суммарную метаболическую активность живых клеток по способности сукцинатдегидрогеназы митохондрий восстанавливать МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид), имеющий желтую окраску, до темно-фиолетового формазана, кристаллы которого растворяются в диметилсульфоксиде (ДМСО).

Для МТТ теста: клетки разводили до концентрации 50 000 кл./мл и по 200 мкл на лунку высевали в 96-луночный планшет с подготовленными имплантатами или без них, помещали в CO_2 -инкубатор на 24 ч. В процессе раскапывания суспензию перемешивали повторным пипетированием по 3 раза.

Согласно нормативным документам, отрицательный контрольный образец — это материал, который, подвергаясь исследованию в соответствии с настоящим стандартом, не

Таблица. Результаты МТТ-теста для исследуемых материалов с различной пористостью

Положительный контроль 0,025 ± 0,019						
Отрицательный контроль 0,608 ± 0,004						
Отрицательный контроль (аллоплант) 0,881 ± 0,008						
Параметры образцов			Оптическая плотность образцов для разных методов стерилизации			
Материал образцов	Уровень пористости	Значение пористости (%)	Автоклавирование	Поток быстрых электронов	Плазменная стерилизация H ₂ O ₂	Сухой жар
Гидроксиапатит	Высокая	35,11	0,167 ± 0,049	0,096 ± 0,043	0,122 ± 0,024	0,567 ± 0,70
	Средняя	26,91	0,256 ± 0,046	0,440 ± 0,074	0,372 ± 0,050	0,541 ± 0,051
	Низкая	18,33	0,261 ± 0,054	0,427 ± 0,060	0,337 ± 0,046	0,531 ± 0,047
Оксид алюминия	Высокая	56,02	0,064 ± 0,012	0,103 ± 0,003	0,104 ± 0,002	0,333 ± 0,042
	Средняя	22,13	0,058 ± 0,003	0,097 ± 0,005	0,103 ± 0,005	0,372 ± 0,052
	Низкая	10,27	0,105 ± 0,011	0,338 ± 0,021	0,337 ± 0,046	0,433 ± 0,056
Трикальцийфосфат	Высокая	20,34	0,059 ± 0,013	0,098 ± 0,006	0,103 ± 0,000	0,511 ± 0,001
	Средняя	15,57	0,070 ± 0,007	0,073 ± 0,008	0,103 ± 0,000	0,519 ± 0,002
	Низкая	10,69	0,072 ± 0,006	0,130 ± 0,040	0,205 ± 0,002	0,516 ± 0,010
Аллоплант p0468			0,457 ± 0,042	0,616 ± 0,059	0,412 ± 0,054	0,542 ± 0,052
Аллоплант p0476			0,435 ± 0,038	0,494 ± 0,053	0,485 ± 0,048	0,638 ± 0,045
Относительная выживаемость (%)						
Гидроксиапатит	Высокая	35,11	27,67	15,97	20,26	93,82
	Средняя	26,91	42,38	72,85	61,64	89,58
	Низкая	18,33	43,14	70,64	55,79	87,95
Оксид алюминия	Высокая	56,02	10,54	17,05	17,23	55,18
	Средняя	22,13	9,66	16,11	17,1	61,62
	Низкая	10,27	17,38	56,01	55,71	73,29
Трикальцийфосфат	Высокая	20,34	9,77	16,27	17	84,66
	Средняя	15,57	11,59	12,14	17,08	85,84
	Низкая	10,69	11,92	21,5	33,89	85,48
Аллоплант p0468			51,87	69,92	46,77	61,52
Аллоплант p0476			49,38	56,07	55,05	72,42

проявляет цитотоксичности. Положительный контрольный образец — материал, который, подвергаясь исследованию в соответствии с настоящим стандартом, проявляет цитотоксичность, при этом результаты воспроизводимы.

В качестве отрицательного контроля использовали клетку без исследуемых образцов материалов, растущую на полипропилене. Положительным контролем служил раствор ДМСО в конечной концентрации в лунке 10%.

Для каждого материала использовали пять образцов. В качестве контроля реагента использовали три лунки планшета без клеток с полной культуральной средой.

Протокол проведения МТТ-теста

Спустя 24 ч культивирования проводили МТТ-тест. По окончании времени культивирования среду, содержащую сыворотку, заменяли на культуральную среду без сыворотки и добавляли в каждую лунку по 20 мкл раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл в физиологическом растворе до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Через 3,5 ч в микроскоп наблюдали интенсивное образование кристаллов формазана. Затем из всех лунок осторожно удаляли среду, не затрагивая дно лунки с клетками и образцами.

Добавляли ДМСО в объеме 100 мкл — половину от объема среды в каждой лунке при культивировании. Через 60 мин окрашенный в пурпурный цвет раствор в объеме 100 мкл переносили в новый 96 луночный планшет в том

же порядке и анализировали в планшетном сканере «Тесап Spark 10М» (Тесап, США) при 530 нм и референсной длине волны 620 нм.

Для оценки жизнеспособности результаты были нормированы путем вычитания среднего значения для контроля реагента. Относительную жизнеспособность оценивали по следующей формуле:

$$Vb = \frac{D_{530} - D_{620}}{\bar{D}_{530} - \bar{D}_{620}} \times 100,$$

где Vb — относительная жизнеспособность, D_{530} — оптическая плотность образца при 530 нм, D_{620} — оптическая плотность образца при 620 нм, \bar{D}_{530} — средняя оптическая плотность при 530 нм для отрицательного контроля, \bar{D}_{620} — средняя оптическая плотность при 620 нм для отрицательного контроля.

Методы стерилизации

Стерилизацию паром под давлением (автоклавирувание) проводили настольным паровым стерилизатором NUT-2540EKA (Tuttnauer, Израиль) при 1 атм., 120 °С, 45 мин.

Радиационную стерилизацию проводили на радиационно-технологическом комплексе на базе линейного резонансного ускорителя ЛУ-7-2 (ФГУП "РФЯЦ — ВНИИЭФ", Россия) в соответствии с технологическим регламентом на радиационную стерилизацию медицинских изделий «Аллоплант» для хирургии «Аллоплант»

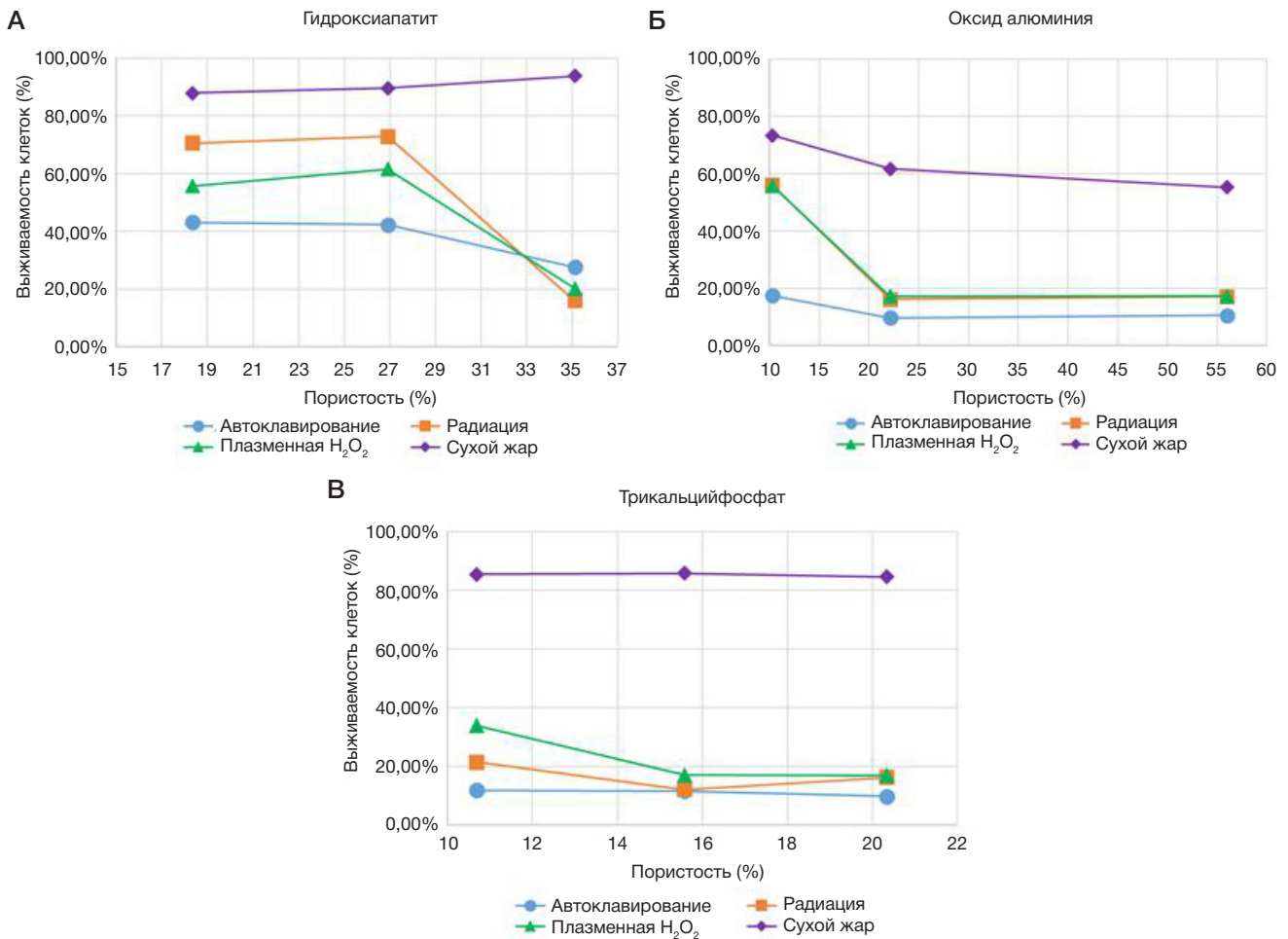


Рис. 8. Зависимость выживаемости клеток в исследуемых образцах от степени пористости при использовании различных методов стерилизации

ТР-119-РС-2007». Развертку пуска осуществляли перпендикулярно направлению движения конвейера с частотой 5 Гц. Скорость движения — 6 мм/с, время облучения — 25 с, поглощенная доза — 25 кГр. Дозиметрию облученных образцов проводили с использованием детекторов поглощенной дозы СО ПД (Ф)-5/50 (ФГУП «ВНИИФТРИ», Россия).

Плазменную стерилизацию с газообразной перекисью водорода проводили на системе STERRAD® 100S (Advanced sterilization products, США), продолжительностью 42 мин.

Стерилизацию сухим жаром проводили в сушильном шкафу Binder FD53 (Binder GmbH, Германия) при 180 °С 60 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты МТТ-теста демонстрируют, что выживаемость клеток напрямую зависит от метода стерилизации, типа пористости и материала образца.

Представленные в таблице результаты указывают на наибольшую жизнеспособность клеток после стерилизации методом сухого жара. Средняя и низкая пористость, как правило, обеспечивает оптимальные условия для клеточной жизнеспособности, сочетая достаточную площадь для клеточной адгезии и механическую прочность.

Анализ подгрупп указывает, что для имплантов из гидроксиапатита высокая пористость увеличивает значения при переходе от автоклавирования (0,1115) к комбинированной плазменно перекисной стерилизации (0,2023) (рис. 8). Средняя и низкая пористость показывают аналогичное поведение, с пиками при сухожаровой

стерилизации (0,4954 и 0,4505 соответственно). Для оксида алюминия характерны умеренные значения для всех пористостей, с ростом при сухожаре. Результаты теста для трикальцийфосфата относительно стабильны, но при низкой пористости заметен рост после автоклавирования (0,078 до 0,182 при стерилизации сухим жаром).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день нет единого мнения в отношении того, какой из методов стерилизации новых материалов является наиболее безопасным с точки зрения влияния на жизнеспособность клеток при исследовании цитотоксичности [17].

Стерилизация паром под давлением (автоклавирование) является одним из наиболее распространенных методов, который обеспечивает полную деконтаминацию медицинских изделий в короткие сроки, однако материалы имплантов могут быть термо- и барочувствительны. Данный вид обработки применим для металлов и биостекла, для других материалов высока вероятность изменения физико-химических характеристик с последующей потерей эксплуатационных свойств [18].

В нашем исследовании автоклавирование оказало отрицательное влияние на образцы из керамических материалов, что отразилось в снижении жизнеспособности клеток во время МТТ-теста, особенно для материалов с низкой и высокой пористостью. Это, вероятно, связано с модификацией поверхности образцов под действием температуры и давления, затрудняющей клеточную адгезию.

Стерилизация сухим жаром продемонстрировала наибольшую жизнеспособность клеток. Одно из возможных объяснений этого эффекта в том, что происходила элиминация влаги, которая сорбировалась в гигроскопичную структуру пористой керамики из воздуха. Однако данное предположение основано на общих механизмах термического воздействия на импланты и требует дальнейшего подтверждения с помощью материаловедческих методов, таких как рентгенофазовый анализ и газовая хроматография. Нельзя также исключать возможное изменение физических характеристик поверхности образцов после сухожаровой стерилизации, что могло повлиять на адгезию клеток.

Таким образом, метод сухого жара перспективен для стерилизации керамических имплантатов, но для окончательной оценки его влияния на структуру и механические свойства требуются дополнительные исследования. В дальнейшем целесообразно провести анализ микроструктурных изменений и механических характеристик материалов, чтобы подтвердить или опровергнуть влияние стерилизации сухим жаром на их свойства. Воздействие ионизирующего излучения, в частности пучка электронов высокой энергии, может проявляться в виде различных эффектов, таких как образование нано- и субмикроструктур, кристаллизации аморфного фосфата кальция, рекристаллизации кристаллического гидроксиапатита, фазовых превращений (возможно образование трёхкальциевого фосфата с моноклинной решеткой, а также аморфной фазы). Кроме того, облучение электронами высокой энергии может модифицировать поверхность образца, покрывая ее тонкими наноразмерными частицами CaO, α -Ca₃(PO₄)₂ и гидроксиапатита. Этот метод, несмотря на его эффективность, вызывает вопросы о применимости в случаях, где требуется сохранение точной структуры материала [19].

ВЫВОДЫ

Результаты исследования показали, что жизнеспособность клеток зависит как от метода стерилизации, так и от степени пористости материала. В то время как стерилизация сухим жаром продемонстрировала более выраженные показатели жизнеспособности клеток, автоклавирующее и поток быстрых электронов оказывали более выраженное негативное влияние. Анализ влияния пористости показал, что зависимость жизнеспособности клеток от этого параметра не является линейной. В некоторых случаях материалы с низкой пористостью демонстрировали более высокую относительную выживаемость клеток, что может быть связано с особенностями клеточной адгезии и взаимодействия с биоматериалом. В то же время средняя пористость обеспечивала оптимальные условия для сочетания механической прочности и клеточной жизнеспособности. Таким образом, выбор метода стерилизации и степени пористости материала должен основываться на комплексном анализе биологических и механических характеристик, с учетом конкретных клинических задач. Дальнейшие исследования, включающие анализ микроструктурных изменений, позволят глубже понять механизмы влияния стерилизации на свойства керамических имплантатов. Степень пористости и выбор метода стерилизации важны в создании пористых керамических имплантов, изготовленных с применением аддитивных технологий. Использование методов 3D-печати позволит создавать персонализированные медицинские изделия с управляемыми физическими, химическими и биологическими свойствами, сочетающими высокую механическую прочность и биосовместимость. Полученные данные формируют основу для дальнейших исследований и разработки керамических материалов с улучшенными свойствами для клинического применения.

Литература

- Naik V, Jain A, Rao R, Naik B. Comparative evaluation of clinical performance of ceramic and resin inlays, onlays, and overlays: A systematic review and meta analysis. *J Conserv Dent.* 2022; 25 (4): 347.
- Abbasi N, Hamlet S, Love RM, Nguyen NT. Porous scaffolds for bone regeneration. *J Sci Adv Mater Devices.* 2020; 5 (1): 1–9.
- Sagdoldina Z, Kot M, Baizhan D, Buitkenov D, Sulyubayeva L. Influence of Detonation Spraying Parameters on the Microstructure and Mechanical Properties of Hydroxyapatite Coatings. *Materials.* 2024; 17 (21): 5390.
- Билялов А. Р., Минасов Б. Ш., Якупов Р. Р., Акбашев В. Н., Рафикова Г. А., Бикмеев А. Т., и др. Использование керамической 3D-печати для задач тканевой инженерии: обзор. *Политравма.* 2023; 1: 89–109.
- Văruț RM, Rotaru LT, Truicu FN, Singer CE, Iulian-Nicolae I, Popescu AIS, et al. Comparative Analysis of Osteointegration in Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Titanium Implants: An In Vivo Rabbit Model Study. *J Funct Biomater.* 2024; 15 (7): 181. DOI: 10.3390/jfb15070181. PMID: 39057303; PMCID: PMC11278386.
- Villardell AM, et al. Cold spray as an emerging technology for biocompatible and antibacterial coatings: state of art. *J Mater Sci.* 2015; 50: 4441–62.
- de Carvalho ABG, Rahimnejad M, Oliveira RLMS, Sikder P, Saavedra GSFA, Bhaduri SB, et al. Personalized bioceramic grafts for craniomaxillofacial bone regeneration. *Int J Oral Sci.* 2024; 16 (1): 62. DOI: 10.1038/s41368-024-00327-7. PMID: 39482290; PMCID: PMC11528123.
- Zhao C, Liu W, Zhu M, Wu C, Zhu Y. Bioceramic-based scaffolds with antibacterial function for bone tissue engineering: A review. *Bioact Mater.* 2022; 18: 383–98. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.02.010. PMID: 35415311; PMCID: PMC8965760.
- Nikolova MP, Chavali MS. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioact Mater.* 2019; 4: 271–92.
- Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001; 10 (Suppl 2): S96–S101. Available from: <https://doi.org/10.1007/s005860100282>.
- Li X, Guo B, Xiao Y, Yuan T, Fan Y, Zhang X. Influences of the steam sterilization on the properties of calcium phosphate porous bioceramics. *J Mater Sci Mater Med.* 2016; 27 (1): 5.
- Mohapatra S. Sterilization and Disinfection. *Essentials of Neuroanesthesia.* 2017: 929–44. DOI: 10.1016/B978-0-12-805299-0.00059-2. Epub 2017 Mar 31. PMCID: PMC7158362.
- Adler S, Scherrer M, Daschner FD. Costs of low-temperature plasma sterilization compared with other sterilization methods. *Journal of Hospital Infection.* 1998; 40 (2): 125–34. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(98\)90091-3](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(98)90091-3).
- Philip N, Saoudi B, Crevier MC, Moisan M, Barbeau J, Pelletier J. The respective roles of UV photons and oxygen atoms in plasma sterilization at reduced gas pressure: The case of N₂-O₂ mixtures. *IEEE Transactions on Plasma Science.* 2002; 30 (4 l): 1429–36. <https://doi.org/10.1109/TPS.2002.804203>.
- Guo T, Oztug NAK, Han P, Ivanovski S, Gulati K. Influence of sterilization on the performance of anodized nanoporous titanium implants. *Mater Sci Eng C.* 2021; 130: 112429.
- Богданова Е. А., Скачков В. М., Скачкова О. В., Сабирзянов Н. А. Влияние высоких температур на микроструктуру и свойства

- фторсодержащих материалов на основе гидроксиапатита. Неорганические материалы. 2020; 56 (2): 181–6.
17. Kinnari TJ, Esteban J, Zamora N, Fernandez R, López-Santos C, Yubero F, et al. Effect of surface roughness and sterilization on bacterial adherence to ultra-high molecular weight polyethylene. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16 (7): 1036–41.
 18. Costa L, Luda MP, Trossarelli L, Brach Del Prever EM, Crova M, Gallinaro P. Oxidation in orthopaedic UHMWPE sterilized by gamma-radiation and ethylene oxide. *Biomaterials.* 1998; 19 (7–9): 659–68.
 19. Костюченко А. В., Кочлар Г. С., Иевлев В. М. Эффект электронного облучения в модификации поверхности керамики на основе гидроксиапатита. Неорганические материалы. 2019; 55 (12): 1363–7. DOI 10.1134/S0002337X19120078.

References

1. Naik V, Jain A, Rao R, Naik B. Comparative evaluation of clinical performance of ceramic and resin inlays, onlays, and overlays: A systematic review and meta analysis. *J Conserv Dent.* 2022; 25 (4): 347.
2. Abbasi N, Hamlet S, Love RM, Nguyen NT. Porous scaffolds for bone regeneration. *J Sci Adv Mater Devices.* 2020; 5 (1): 1–9.
3. Sagdoldina Z, Kot M, Baizhan D, Buitkenov D, Sulyubayeva L. Influence of Detonation Spraying Parameters on the Microstructure and Mechanical Properties of Hydroxyapatite Coatings. *Materials.* 2024; 17 (21): 5390.
4. Bilyalov AR, Minasov BSh, Yakupov RR, Akbashev VN, Rafikova GA, Bikmeev AT, i dr. Ispol'zovanie keramicheskoy 3D-pechati dlja zadach tkanevoj inzhenerii: obzor. *Politramva.* 2023; 1: 89–109. Russian.
5. Văruț RM, Rotaru LT, Truicu FN, Singer CE, Iulian-Nicolae I, Popescu AIS, et al. Comparative Analysis of Osteointegration in Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Titanium Implants: An In Vivo Rabbit Model Study. *J Funct Biomater.* 2024; 15 (7): 181. DOI: 10.3390/jfb15070181. PMID: 39057303; PMCID: PMC11278386.
6. Vilardell AM, et al. Cold spray as an emerging technology for biocompatible and antibacterial coatings: state of art. *J Mater Sci.* 2015; 50: 4441–62.
7. de Carvalho ABG, Rahimnejad M, Oliveira RLMS, Sikder P, Saavedra GSFA, Bhaduri SB, et al. Personalized bioceramic grafts for craniomaxillofacial bone regeneration. *Int J Oral Sci.* 2024; 16 (1): 62. DOI: 10.1038/s41368-024-00327-7. PMID: 39482290; PMCID: PMC11528123.
8. Zhao C, Liu W, Zhu M, Wu C, Zhu Y. Bioceramic-based scaffolds with antibacterial function for bone tissue engineering: A review. *Bioact Mater.* 2022; 18: 383–98. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.02.010. PMID: 35415311; PMCID: PMC8965760.
9. Nikolova MP, Chavali MS. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioact Mater.* 2019; 4: 271–92.
10. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001; 10 (Suppl 2): S96–S101. Available from: <https://doi.org/10.1007/s005860100282>.
11. Li X, Guo B, Xiao Y, Yuan T, Fan Y, Zhang X. Influences of the steam sterilization on the properties of calcium phosphate porous bioceramics. *J Mater Sci Mater Med.* 2016; 27 (1): 5.
12. Mohapatra S. Sterilization and Disinfection. *Essentials of Neuroanesthesia.* 2017: 929–44. DOI: 10.1016/B978-0-12-805299-0.00059-2. Epub 2017 Mar 31. PMCID: PMC7158362.
13. Adler S, Scherrer M, Daschner FD. Costs of low-temperature plasma sterilization compared with other sterilization methods. *Journal of Hospital Infection.* 1998; 40 (2): 125–34. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(98\)90091-3](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(98)90091-3).
14. Philip N, Saoudi B, Crevier MC, Moisan M, Barbeau J, Pelletier J. The respective roles of UV photons and oxygen atoms in plasma sterilization at reduced gas pressure: The case of N₂-O₂ mixtures. *IEEE Transactions on Plasma Science.* 2002; 30 (4 1): 1429–36. <https://doi.org/10.1109/TPS.2002.804203>.
15. Guo T, Oztug NAK, Han P, Ivanovski S, Gulati K. Influence of sterilization on the performance of anodized nanoporous titanium implants. *Mater Sci Eng C.* 2021; 130: 112429.
16. Bogdanova EA, Skachkov VM, Skachkova OV, Sabirzyanov NA. Effect of High Temperatures on the Microstructure and Properties of Fluorine-Containing Hydroxyapatite-Based Materials. *Inorganic Materials.* 2020; 56 (2): 172–7. DOI: 10.1134/S002016852002003X. EDN EMVJVP.
17. Kinnari TJ, Esteban J, Zamora N, Fernandez R, López-Santos C, Yubero F, et al. Effect of surface roughness and sterilization on bacterial adherence to ultra-high molecular weight polyethylene. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16 (7): 1036–41.
18. Costa L, Luda MP, Trossarelli L, Brach Del Prever EM, Crova M, Gallinaro P. Oxidation in orthopaedic UHMWPE sterilized by gamma-radiation and ethylene oxide. *Biomaterials.* 1998; 19 (7–9): 659–68.
19. Kostyuchenko AV, Kochlar GS, Ievlev VM. Electron Irradiation Effect in Surface Modification of Hydroxyapatite Ceramics. *Inorganic Materials.* 2019; 55 (12): 1285–9. DOI: 10.1134/S0020168519120070.