

Экспериментальные и клинические исследования в области термической дезинфекции аллогенных костных трансплантатов и характеристик их прорастания в ткани*

Авторы: Х. Кнеплер, Т. ф. Гаррель¹, Х. М. Зайп² и Р. Ашер³

Из Клиники травматологии Марбургского университета имени Филиппа (заведующий проф., др. мед. Л. Готцен), Института гигиены Гисенского университета имени Юстуса Либиха (заведующий проф., др. мед. Е.Г. Бек) и Института экспериментальной хирургии Мюнхенского технического университета (директор проф., др. мед. Г. Блюмер)

Experimental and Clinical Investigations Concerning Thermic Desinfection of Allogeneous Bone Grafts and their Behavior of Incorporation

Key words: allogenic bone transplantation - thermic desinfection - biomechanics - ingrowths behavior - clinical experience

Ключевые слова: аллогенная костная трансплантация - термическая дезинфекция - биомеханика - характеристики прорастания и приживляемости - клиническое применение

Краткое содержание

Проводились физические исследования теплопроводности костной губчатой ткани при термической дезинфекции аллогенных костных трансплантатов. С использованием полученных в ходе исследований данных были приведены доказательства того, что при 80°C жизнедеятельность вегетативных микробных форм может быть подавлена также и в блоке костной губчатой ткани. Костная ткань, термически обработанная при температуре 80°C, в ходе опытов на животных обнаружила явные преимущества по сравнению с прокипяченными или автоклавированными препаратами как в отношении биомеханической эффективности, так и с точки зрения прорастаемости и приживляемости. На основе результатов по этим экспериментам был разработан прибор для термической инкубации аллогенных блоков костной ткани, и были проведены первые клинические операции по трансплантации.

*По материалам доклада на 39-й ежегодной конференции "Объединения ортопедов Южной Германии, зарег. об-во" в Баден-Бадене, 1991

При дружеской поддержке Немецкого научно-исследовательского общества.



telos Medizintechnik GmbH / телос Медичинтехник ГмбХ

Разработка,
Herstellung und Vertrieb
med. techn. Geräte GmbH
(Энтвиклунг, Херштеллунг унд Фертриб мед. техн. Герэте ГмбХ /
ООО Разработка, производство и сбыт мед. техн. приборов)

Бисмаркштрассе, 18 D-35037 МАРБУРГ

Введение

Трансплантация аллогенной костной ткани используется во всем мире для заполнения костных дефектов. Согласно статистике, собранной на территории ФРГ (9), без учета новых федеральных земель в год проводится приблизительно 10000-15000 подобного рода операций по трансплантации костной ткани.

И хотя известна степень опасности возможного сопутствующего переноса вирусных или бактериальных возбудителей заболеваний (4. 11. 13), в ходе сбора статистической информации оказалось, что серьезные бактериологические и серологические исследования доноров костной ткани не проводились в 10-20% клиник. Это недопустимо, особенно с учетом возможного заражения трансплантата гепатитом и ВИЧ. В вышедших тем временем директивах по ведению банка костной ткани (1, 17) предписывается проведение соответствующих исследований, в частности на предмет переноса ВИЧ, однако в том числе и при проведении так называемого "трехмесячного повторного тестирования" (17) гарантируется лишь только безопасность, ограниченная приблизительно 70%.

Надежно также невозможно исключить и перенос бактериальных возбудителей несмотря на наличие негативного соскоба с трансплантата. Так указываются проценты бактериального загрязнения от 65% (13) до 30% (4.5) в случае стерильного изъятия человеческих тканей. При этом было подтверждено наличие исключительно вегетативных микробных форм, и основную долю возбудителей составляли стафилококки (5). В ходе дальнейших исследований должно быть установлено, каким образом можно подавить жизнедеятельность вегетативных бактериальных форм в костной ткани, и какие биологические последствия в связи с этим будут иметь место, в частности в связи с характеристиками прорастания и приживляемости трансплантата.

Материал и метод

1. Исследования теплопередачи в губчатой костной ткани

Владение информацией о времени тепловой релаксации (TR) является условием для термического подавления жизнедеятельности вегетативных форм возбудителей в костной ткани. Лишь только после констатации наличия необходимой температуры подавления жизнедеятельности микроорганизмов в сердцевине костной ткани (ядре окостенения) можно исходить из того, что имеет место гомогенная дезинфекция всего трансплантата в целом. Была изготовлена экспериментальная установка для замера времени тепловой релаксации в губчатой костной ткани (Рис. 1).

Кривые нагрева определялись при $t_1 = 60^\circ\text{C}$ и $t_2 = 80^\circ\text{C}$. Были изготовлены 4 цилиндра из костной губчатой ткани с диаметрами 10 мм, 16 мм, 25 мм и 30 мм из человеческих и свиных препаратов ($n = 20$). Кривые нагрева были зафиксированы в виде диаграмм время/температура.

2. Доказательство термической инактивации инфекционных возбудителей в костной ткани

С учетом термолабильности вегетативных форм возбудителей (10), в случае которой температура их инактивации предположительно составляет около 80°C с выдержкой в течение 10 минут, в блок губчатой костной ткани были помещены биоиндикаторы, и был произведен нагрев образца в водяной бане.

В высверленное отверстие 4 мм в цилиндре губчатой ткани из человеческого препарата длиной 55 мм и диаметром 30 мм были помещены лоскуты, зараженные золотистым стафилококком (*Staphylococcus aureus*; ATCC 6538) и стафилококком фекальным (*Staphylococcus faecalis*; ATCC 6057), затем просверленный канал был закрыт. В соответствии с экспериментом на опытной установке на Рис. 1 была произведена инкубация в водяной бане, причем было соблюдено время определенной передачи тепла. После соответствующего нагрева были изъятые лоскуты в стерильном состоянии и были произведены опыты по вторичной изоляции.

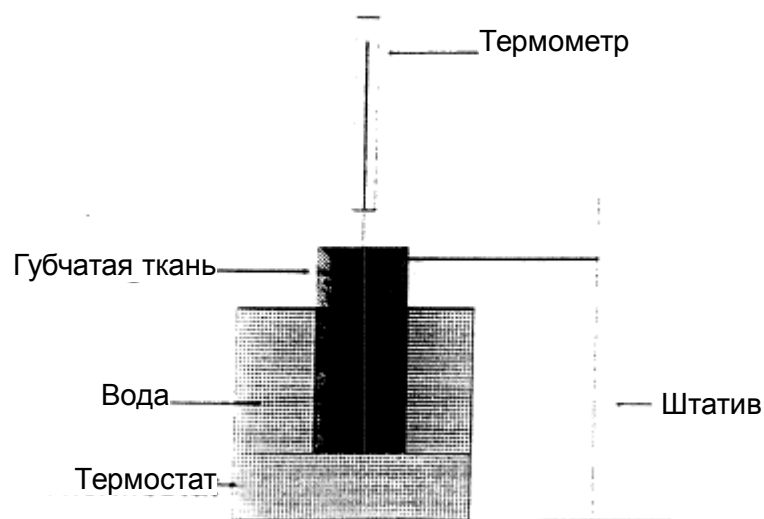


Рис. 1: Опытная установка для измерения теплообмена в губчатой костной ткани.

Таб. I: Операции по стерилизации и дезинфекции, проводимые в ходе опытов на животных.

химические	этиловый спирт тетрагидрофуран (ТГФ) повидон-йод (йод + ПВП; ПВЙ)
термические	80°C 100°C 134°C автокл.
радиоактивное облучение	бета-излучение гамма-излучение (25 кГр)

3. Исследования биомеханической прочности трансплантатов из губчатой ткани в ходе испытания на вырывание фрагмента из блока

В ходе исследований проводилось изучение биомеханических последствий различных термических методов обработки с оказанием опытного воздействия на костную ткань путем сжатия и растяжения с помощью универсальной испытательной машины. В ходе испытания на растяжение произведено вворачивание "губчатых винтов" АО с длиной резьбы 32 мм в цилиндры губчатой ткани шириной 50 мм и 25 мм из свиных и человеческих препаратов после предварительной обработки при температурах -80°C, -20°C, 60°C, 100°C или 121°C. Были зафиксированы кривые нагрева, а с их привлечением были определены максимальные величины усилия.

4. Исследования в связи с характеристиками прорастания и приживляемости термически обработанных сегментов большой берцовой кости в ходе опытов на животных

Объектами исследований были 60 лабораторных крыс Льюиса (Lewis rat), у которых был изъят сегмент большой берцовой кости длиной 7 мм. После проведения манипу-

ляций в соответствии с различными методами дезинфекции и стерилизации (Таб. I) в ходе повторной имплантации сегменты были интрамедуллярно стабилизированы с помощью остеосинтеза с использованием спиц *Киришнера*, а через три месяца была произведена виктимизация лабораторных животных. Затем после анонимизации препаратов был произведен их макроскопический и микроскопический анализ силами двух исследователей.

5. Перенос экспериментальных исследований на рельсы клинического применения (технология банка костной ткани)

Так как в клинической практике производится трансплантирование не только блоков губчатой ткани, был сконструирован измерительно-регулирующий блок, позволяющий проводить точный контролируемый нагрев любых типов костных трансплантатов (Рис. 2). Стал возможен гомогенный документируемый нагрев блоков костной ткани при температуре инактивации 80°C.

Целях проверки производилось термоинкубирование головок бедра, зараженных стафилококками, при температуре 80°C, а затем проводилось микробиологическое исследование водяной бани на предмет наличия бактериальных возбудителей.

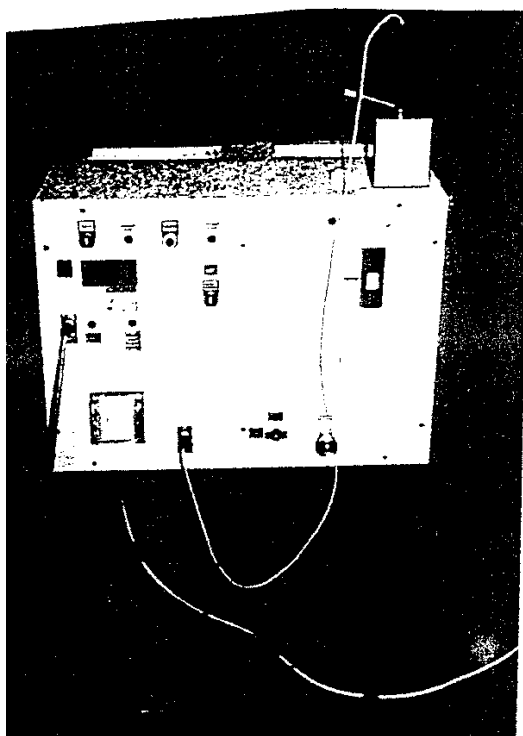


Рис. 2: Термоинкубатор для обработки аллогенных костных трансплантатов при температуре 80°C: внутрикостный термочувствительный зонд для управления процессом.

Результаты

1. Теплопередача в губчатой костной ткани

Зависимая от времени передача тепла в губчатой костной ткани из человеческих и свиных препаратов описывается экспоненциальной функцией, являющейся приблизительно идентичной для обоих видов (Рис. 3).

На основании пар величин было составлено уравнение функции, с помощью которого можно выполнить приблизительные расчеты времени нагрева и для диаметров большего размера.

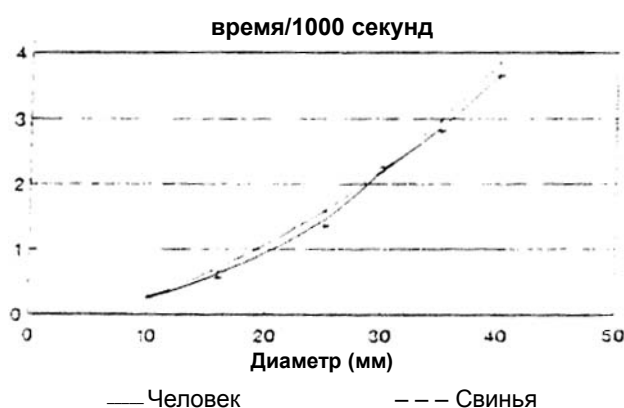


Рис. 3: Кривые передачи тепла для человеческих и свиных блоков губчатой ткани при 80°C в зависимости от толщины слоя.

2. Дезинфекция блоков губчатой костной ткани с помощью нагрева

После нагрева блоков губчатой костной ткани до 80°C ни в одном из изъятых лоскутов с биоиндикаторами не было обнаружено доказательств наличия микробных форм. Таким образом было представлено доказательство достаточного дезинфекционного воздействия на обрабатываемые объекты костной ткани. В то же время нагрев биоиндикаторов до температуры 70°C в течение 10 минут, наоборот, показал наличие роста микроорганизмов во всех 20 контрольных образцах.

3. Прочность на вырывание фрагмента из блока для блоков губчатой костной ткани, прошедших термическую обработку

Максимальные значения тянущей нагрузки свидетельствуют об отсутствии значительного влияния глубокого охлаждения на биомеханическую прочность цилиндров губчатой костной ткани. В случае тепловой обработки имеет место значительная потеря прочности при температурах свыше 80°C (Рис. 4).

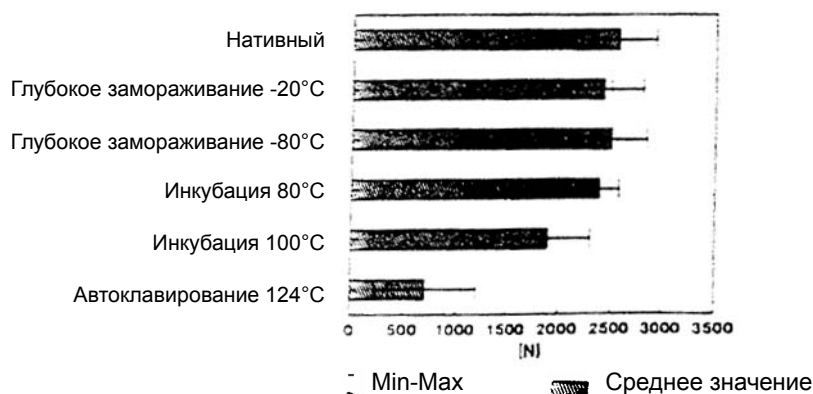


Рис. 4: Максимальные значения усилия для цилиндров губчатой ткани, обработанных термически разными способами, в ходе испытания на прочность на вырывание фрагмента из блока с использованием шурупа.

4. Характеристики прорастания и приживляемости дезинфицированных диафизарных сегментов бедра на подопытном объекте исследования "крыса"

Были обнаружены явные качественные различия в характеристиках прорастания и приживляемости различных групп. Как в рентгенологическом, так и гистологическом аспекте у прокипяченных (100°C) или автоклавированных препаратов было выявлено снижение биологической эффективности (ценности), выражающееся в замедленном приживлении к реципиентному ложу или в невозможности подтверждения реконструкции дефекта (Рис. 5 и Рис. 6).

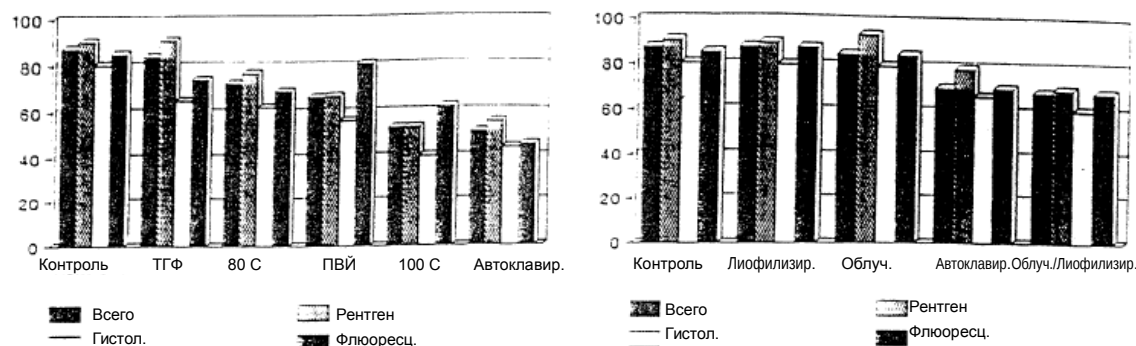


Рис. 5 и Рис. 6: Количественный анализ макро- и микроморфологических данных исследования по классификации трансплантатов в ходе опытов на животных.

5. Перенос экспериментальных результатов для клинического применения

До 10.1991 в нашей клинике 15 пациентам была проведена аллогенная трансплантация костной ткани с применением термической дезинфекции (80°C). Однако оценка еще невозможна в связи с непродолжительным периодом наблюдения. В случае 4 головок бедра, зараженных вегетативными микробными формами, не представилось возможным осуществить посев в водяной бане после нагрева до 80°C с позитивным результатом ни для одного микроорганизма.

Обсуждение

В целях предупреждения переноса заболеваний аллогенными костными трансплантатами было проведено несколько как экспериментальных, так и клинических исследований. В случае химической дезинфекции, с одной стороны, имеет место проблема недостаточной диффузии агента в костную ткань, а, с другой стороны, дезинфицирующее средство не должно быть токсическим или канцерогенным (12, 14).

В ходе проведенных опытных исследований мы смогли доказать, что этиловый спирт, представляющий собой маломолекулярный, хорошо проникающий агент, даже после 24 часов воздействия и несмотря на малую толщину диска губчатой ткани (от 3 до 6 мм) не приводит к инактивации ВИЧ (8).

Дезинфекция костной ткани ионизирующим излучением также исследовалась различными рабочими группами (2, 6). Однако дозы облучения, необходимые для стерилизации, можно получить только с помощью промышленных установок, так что внутриклиническая обработка трансплантатов исключается. По поводу биологической ценности облученных трансплантатов имеются различные публикации (2, 3, 6).

Термическая обработка костной ткани ограничивалась до сих пор в основном обработкой в автоклаве (7, 15). Однако при этом приходилось смириться с потерями в области биомеханики и биологического качества трансплантата.

Собственные как экспериментальные, так и клинические результаты также указывают на явное снижение биологической ценности трансплантата.

Однако при условии "стерильного" взятия ткани в операционном зале в качестве возможных контаминирующих микроорганизмов первично рассматриваться могут лишь вегетативные формы возбудителей, температура подавления жизнедеятельности которых составляет 80°C (10). При этом в ходе биомеханических экспериментов доказано, что трансплантаты костной ткани, прошедшие термическую дезинфекцию при температуре 80°C, обладают значительно более высоким качеством по сравнению с прокипяченной или автоклавированной костной тканью.

При наличии известной термолабильности ВИЧ, который инактивируется в течение нескольких секунд при температуре 60°C, после термодезинфекции исключается в том числе и передача СПИД (18).

И лишь в случае более устойчивых к сильному нагреву вирусов гепатита их отсутствие должно быть подтверждено с помощью серологического обследования донора (10).

Более высокая ценность костной ткани, обработанной при температуре 80°C, обусловлена, с одной стороны, вероятно, меньшим повреждением макроструктур трабекулярного каркаса (остеокондукция), а, с другой стороны, щадящим режимом обработки в отношении остеоиндуктивных белков. *Маршал Юрист (Marshall R. Urist)* утверждает, что костный морфогенетический белок (bone morphogenetic protein; bmp) все более интенсивно разрушается с увеличением температуры от 40°C до 100°C и в зависимости от нее (16).

Поэтому при условии поддержания максимально продвинутого щадящего режима для костного трансплантата, несмотря на проводимые мероприятия по его дезинфекции, костная ткань, обработанная при 80°C, показывает самые лучшие результаты по сравнению с другими методиками обработки ткани. Следует, однако, дождаться проведения более масштабных клинических исследований с продолжительными сроками наблюдения и желательно с получением гистологических препаратов для проработки глубоких, обоснованных результатов и разработки на их основе обязательных рекомендаций.

Литература

1. American Association of Tissue Banks: Guidelines for the Banking of Musculoskeletal Tissues. Am. Assoc. Tissue Banks. 1990.
 2. Bassert, C. A. L., A. G. Packard: A clinical assay of cathode ray sterilized cadaver bone grafts. *Acta Orthop.* 28 (1959) 198.
 3. De Vries, P. H., C. E. Bagley, J. T. Hartmann: Radiation sterilization of homogeneous bone transplants utilizing radioactive cobalt. A preliminary report. *J. Bone Jt. Surg. A* 40 (1958) 187-203.
 4. Deibert, S. H., W. W. Tomfort, A. D. Lucas, H. J. Mankin: Operational and financial aspects of a hospital bone bank. *J. Bone Jt. Surg. A* 53 (1981) 1472-1481.
 5. Fitzgerald, R. H., L. S. A. Peterson, J. A. Washington II, R. E. van Scoji, M. E. Coventry: Bacterial colonization of wounds and sepsis in total hip arthroplasty. *J. Bone Jt. Surg. A* 55 (1973) 1242-1250.
 6. Hernigou, P., G. Delepine, D. Goutallier: Massive freeze dried and irradiated bone allografts. *Revue de Chirurgie Orthopedique* 72 (1986) 403-413.
 7. Jonnston, J. O., T. J. Harris, C. E. Alexander, A. H. Alexander: Limb salvage procedure for neoplasms about the knee by spherocentric total knee arthroplasty and autogenous autoclaved bone grafting. *Clin. Orthop.* 211 (1986) 180-241.
 8. Knaepler, H., F. Koch, H. Haas, H. U. Püschel, H. Bugany: Untersuchungen zur Knochensterilisation und Knocheninfektion. *Akt. Probl. Chir. Orthop.* 34 (1990) 127-130.
 9. Knaepler, H., S. Laubach, L. Gotzen: Die Knochenbank - ein standardisiertes Verfahren? *Chirurg* 61 (1990) 833-836.
 10. Konrich, S., L. Stutz: Die bakterielle Keimtötung durch Wärme. Enke, 2. Auflage 1963.
 11. Kurer, E., U. Hendrich: Die allogene Knochen transplantation. Indikation - Konservierung - Ergebnisse. *Chirurg* 55 (1984) 704-709.
 12. Lo Grippo, G. A., B. Burgess, R. Teodoro, J. L. Fleming: Procedure for bone sterilization with beta-propiolactone. *J. Bone Jt. Surg.* 39 (1957) 1356-1364.
 13. Malinin, T. I., O. V. Martinez, M. D. Brown: Banking of massive osteoarticular and intercalary bone-allografts - 12 years experience. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 197 (1985) 44-57.
 14. Munting, E., J. F. Wilmart, A. Wijne, P. Hennebert, C. Delloye: Effect of sterilization on osteoinduction. *Acta Orthop. Scand.* 59 (1988) 34-38.
 15. Smith, W. S., M. A. Simon: Segmental resection for chondrosarcoma. *J. Bone Jt. Surg. A* 57 (1975) 1097-1103.
 16. Urist, M. R., B. S. Strates: Bone morphogenic protein. *J. Dental Res.* 50 (1971) 1392-1394.
 17. Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer: Richtlinien zum Führen einer Knochenbank. *Dt. Ärzteblatt* 87 (1990) 41-45.
 18. Zeichnarat, H., N. Scheiermann, G. Spicher, Deinnarat: Stabilität und Inaktivierung des HIV. *Bundesgesundhbl.* 30 (1987) 172-177.
8. Knaepler, H., F. Koch, H. Haas, H. U. Püschel, H. Bugany (Кнеплер, Х., Ф. Кох, Х. Хаас, Х. У. Пюшель, Х. Бугани): Untersuchungen zur Knochensterilisation und Knocheninfektion. (Исследования в области стерилизации и дезинфекции костной ткани). *Akt. Probl. Chir. Orthop.* 34 (1990) 127-130.

9. Knaepler, H., S. Laubach, L. Gotzen (Кнеплер, Х., С. Лаубах, Л. Готцен): Die Knochenbank - ein standardisiertes Verfahren? (Банк костной ткани - стандартизированная технология?) Chirurg 61 (1990) 833-836.

10. Konrich, S., L. Stutz (Конрих, С., Л. Штутц): Die bakterielle Keimtötung durch Wärme. (Антибактериальная стерилизация с помощью тепла).
Энке. 2. издание 1963 г.

11. Kuner, E., U. Hendrich (Кунер, Е., У. Хендрих): Die allogene Knochentransplantation. (Трансплантация аллогенной костной ткани).
Indikation - Konservierung - Ergebnisse. (Показания - консервация - результаты) Chirurg 55 (1984) 704-709.

17. Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer: Richtlinien zum Führen einer Knochenbank. (Научная комиссия Федеральной ассоциации врачей: Директивы по ведению банка костной ткани).
Dt. Ärzteblatt 87 (1990) 41-45.

13. Zeichhardt H., N. Scheiermann, G. Spicher, Demhardt (Цайххардт Х., Н. Шайерманн, Г. Шпихер, Демхардт): Stabilität und Inaktivierung des HIV. (Стабильность и инактивация ВИЧ).
Bundesgesundhbl. 30 (1987) 172-177.

Anschrift für die Verfasser:

PD Dr. med. H. Knaepler, Klinik für Unfallchirurgie der Philipps-Universität Marburg/L., Baldingerstr., D-3550 Marburg/L.