

УДК 57.085.23,579.61

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ
ДЛЯ КОНТРОЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ
КОНТАМИНАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ
МАТРИКСА ВАРТОНОВА СТУДНЯ****Закопайко Б.А., Александрова С.А.***Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова
Институт цитологии РАН***COMPARATIVE EVALUATION OF STERILIZATION METHODS
FOR MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION CONTROL
OF WHARTON JELLY MATRIX EXPERIMENTAL SAMPLES****Zakopaiko B.A., Alexandrova S.A.***S.M. Kirov Military Medical Academy
Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences***Аннотация**

Проведена комплексная оценка эффективности шести методов стерилизации (УФ-облучение, озонирование, гамма-облучение, рентгеновское облучение, сухожаровая обработка и мембранная фильтрация) для тканеинженерных продуктов на основе матрикса вартонова студня (МВС) пуповины человека. Контроль микробиологической чистоты образцов проводили с помощью флуоресцентной микроскопии после окрашивания красителем Hoechst 33258. Установлено, что гамма-облучение (15 кГр), сухожаровая обработка (180°C, 120 мин) и мембранная фильтрация (однократно, фильтр с порами 0,22 мкм) обеспечивают полную стерильность образцов. Однако, высокотемпературная обработка и фильтрация имели значительные недостатки, связанные с ухудшением характеристик стерилизуемого материала. Результаты работы обосновывают выбор гамма-стерилизации в качестве оптимального метода для обеспечения безопасности тканеинженерных конструкций на основе МВС.

Ключевые слова: тканевая инженерия, матрикс вартонова студня, микробиологическая контаминация, флуоресцентная микроскопия, Hoechst 33258, стерилизация, гамма-облучение.

Abstract

A comprehensive evaluation of the effectiveness of six sterilization methods (UV irradiation, ozonation, gamma irradiation, X-ray irradiation, dry-heat treatment, and membrane filtration) for tissue-engineered products based on the human umbilical cord Wharton's jelly matrix (UCWJM) was conducted. Gamma irradiation (15 kGy), dry-heat treatment (180°C, 120 min), and membrane filtration (filtered, 0.22 µm) were found to ensure complete sterility of the samples. Microbiological purity of the samples was monitored using fluorescence microscopy based on DNA staining with Hoechst 33258. However, high-temperature treatment and filtration had significant drawbacks associated with deterioration of the characteristics of the sterilized material. The results of the study substantiate the choice of gamma sterilization as the optimal method for ensuring the safety of tissue-engineered constructs based on UCWJM.

Keywords: tissue engineering, Wharton's jelly matrix, microbiological contamination, fluorescence microscopy, Hoechst 33258, sterilization, gamma irradiation.

Ссылка для цитирования: Закопайко Б.А., Александрова С.А. Сравнительная оценка методов стерилизации для контроля микробиологической контаминации экспериментальных образцов матрикса вартонова студня // Бюллетень инновационных технологий. – 2025. – Т. 9. – № 4 (36). – С. 98-103. – EDN YUSSTH.

Введение

В тканевой инженерии пуповина человека представляет собой высокорегенеративный биоматериал гомологичного происхождения. Перспективность пуповины обусловлена ее компонентным сходством с внеклеточным матриксом соединительной ткани, низкой иммуногенностью и уникальными регенеративными свойствами. К последним относятся способность к интеграции

в ткани реципиента, заселение клетками хозяина и их последующая стимуляция к синтезу компонентов нового внеклеточного матрикса в области деградации имплантата [1].

В Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова были разработаны технологии изготовления тканеинженерных продуктов из пуповины человека для их последующей трансляции в про-

мышленное производство [2, 3]. Данные продукты предназначены для заживления ран мягких тканей и кожи, травматических дефектов суставного хряща и губчатой кости. В ходе экспериментов на животных моделях разработанные тканеинженерные продукты продемонстрировали высокую регенеративную активность, реализуемую по механизму, близкому к эпиморфной регенерации. Кроме того, были проведены исследования, в которых был изучен состав продуктов и показаны ключевые биологические свойства различных их форм – нативного матрикса, а также его гидролизата в жидком и лиофилизированном виде [4].

Результаты проведенных исследований согласуются с данными зарубежных коллег, подтверждающими перспективность подобных продуктов для практической медицины. Так, группа ученых из лаборатории Research and Development, Stimlabs (Roswell, USA) сообщила о регистрации медицинского изделия из пуповины человека для лечения хронических ран [5]. В своей работе авторы всесторонне охарактеризовали состав внеклеточного матрикса пуповины, а также оценили эффективность изделия *in vitro*, его биосовместимость и эффективность в условиях *in vivo*. Данное изделие получило одобрение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA).

Пуповина представляет собой ткань эмбрионального фенотипа, но внеэмбрионального происхождения. Данное происхождение делает её доступным, этически приемлемым и экономически малозатратным биоматериалом для тканевой инженерии. Однако эта же особенность сопряжена с определёнными рисками. Ключевым из них является риск контаминации бактериальной микрофлорой при прохождении новорождённого через родовые пути, что влечёт за собой высокую вероятность обсеменения исходной ткани и, как следствие, контаминации конечных тканеинженерных продуктов.

На проблему инфекционного и микробного загрязнения медицинских изделий обращают внимание международные и российские стандарты, которые регламентируют требования к валидации и текущему контролю процессов стерилизации. Согласно этим стандартам, стерильное медицинское изделие – это изделие, освобожденное от жизнеспособных микроорганизмов [6]. Особенное внимание уделяется медицинским изделиям, которые содержат в своем составе биологические материалы человеческого происхождения. В данном случае отбор доноров, а также обработка, хранение, тестирование и обращение с такими материалами должны осуществляться в соответствии с законодательством государств-членов Евразийского экономического союза (ЕАЭС) и обязаны гарантировать максимальный уровень безопасности для пациентов и третьих лиц. Безопасность в отношении возможных инфекционных агентов в таких материалах должна достигаться путем использования валидированных методов уничтожения этих

агентов, как в ходе производственного процесса, так и в ходе стерилизации готовой продукции [7]. На финальном этапе стерилизации медицинских изделий большое значение имеет подбор и валидация как методов стерилизации, так и выбора стерилизующего агента, который должен показывать свою микробицидную эффективность применительно к обрабатываемому изделию [6]. К числу таких признанных методов относятся: химическая обработка (например, с использованием оксида этилена, перуксусной кислоты, β -пропиолактона, параформальдегида и т.д.), физические воздействия (радиационное гамма-облучение, обработка электронным пучком, влажным или сухим теплом и т.д.) и различные комбинированные методики [8].

В связи с этим, целью данной работы стал сравнительный анализ доступных методов стерилизации образцов-прототипов медицинских изделий на основе матрикса вартонова студня пупочного канатика с их последующей валидацией посредством тестирования на стерильность.

Материалы и методы

1. Исследуемые продукты

В работе были исследованы следующие тканеинженерные продукты на основе матрикса вартонова студня (МВС) пуповины человека:

1) лиофилизированный матрикс (МВС) – продукт, полученный путем обесклевывания и лиофилизации нативной ткани пуповины по методике, описанной в патенте РФ № RU2795904C1 [2]. Продукт представлен в порошкообразном виде и предназначен для применения в регенерации кожи и костной ткани;

2) гидролизат матрикса (ГМВС) – продукт, полученный путем пепсинового гидролиза лиофилизированного матрикса по методике согласно патенту РФ № RU2745995C1 [3]. Исследовались две формы гидролизата: лиофилизированный гидролизат матрикса в порошкообразном виде (предназначен для восстановления кожи) и гидролизат матрикса в виде жидкого гидрогеля, обладающий способностью к гелеобразованию *in situ* (предназначен для восстановления суставного хряща).

2. Методы стерилизации

Для устранения микробиологической контаминации образцы МВС и ГМВС подвергали стерилизации с последующим контролем эффективности. Были применены следующие методы:

1) УФ-облучение: обработка в ламинарном боксе (БМБ-II-«Ламинар-С»-1,5, NEOTERIC «Lamsystems») UV-C излучением мощностью 12 Вт в течение 20 мин;

2) озонирование: воздействие в низкотемпературном озоновом стерилизаторе (СО-01-СПБ) в течение 1 ч 40 мин;

3) гамма-стерилизация: облучение дозой 15 кГр в радиационном γ -стерилизаторе с источником на основе изотопа кобальт-60;

4) рентгеновское облучение: обработка на аппарате РА РАП-150/300-14 («Актюбрентген») дозой 33 Гр в течение 40 мин;

5) термическая стерилизация: прогревание в сухожаровом шкафу (ГП-40-3, «Витязь») при 180°C в течение 120 мин;

6) мембранная фильтрация гидрогелевой формы гМВС: пропускание восстановленного в питательной среде гМВС через стерилизующий фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Для детекции возможной микробной контаминации препараты после фиксации смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1) окрашивали флуоресцентным ДНК-связывающим красителем Hoechst 33258 (50 мкг/мл). Этот краситель, специфически взаимодействуя с минорной бороздкой двуцепочечной ДНК, позволяет визу-

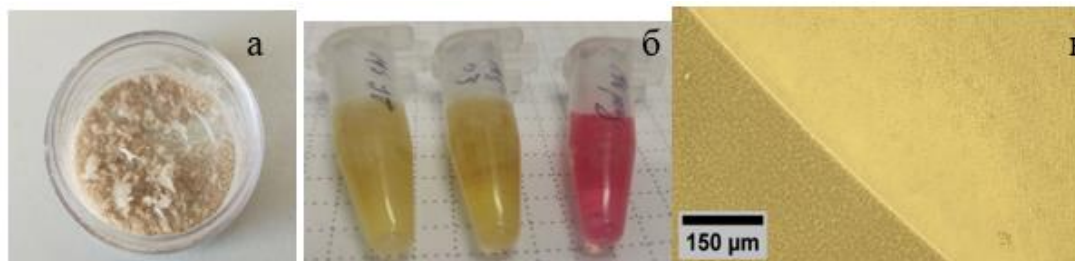


Рис. 1. Образцы МВС после стерилизации и инкубации в питательной среде:

а – сухой образец МВС до растворения в питательной среде; б – изменение цвета питательной среды через 24 ч инкубации с образцами, обработанными различными методами стерилизации (слева направо) - УФ-облучение, озонирование, гамма-облучение; в – признаки бактериальной контаминации в образце, обработанном УФ-излучением (световая микроскопия). Показана область границы капли образца, где присутствуют многочисленные активные палочковидные формы бактерий (верхняя правая половина поля зрения).

3. Оценка эффективности стерилизации

Эффективность методов стерилизации оценивали по отсутствию микробиологической контаминации обработанных образцов. Контроль включал визуальную оценку и микроскопический анализ образцов на наличие бактерий (в том числе микоплазм), дрожжей и мицелиальных грибов.

Образцы МВС после стерилизации ресуспендировали в питательной среде (концентрация 10 мг/мл), помещали в прозрачные пробирки и инкубировали при 37°C в течение 24 ч в суховоздушном термостате. После термостатирования проводили визуальный осмотр содержимого пробирок на предмет состояния культуральной среды (помутнение, изменение цвета).

Согласно практическому руководству Фрешни [9] и рекомендациям Государственной фармакопеи Российской Федерации [10] производили определение наличия или отсутствия микробной контаминации в обработанных образцах с использованием флуоресцентной микроскопии. Для этого аликвоту тестируемого образца добавляли к индикаторным клеткам линии Vero, которые перед тестированием культивировали в среде DMEM/F12 без антибиотиков в течение 7 сут, высевали на покровные стекла в чашках Петри и инкубировали до достижения 50-60% конфлюентности монослоя. После добавления тестируемого образца проводили культивирование в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂, 95% влажность) в течение суток. В качестве отрицательного контроля использовали клетки Vero без добавления образцов.

ализировать как ядра индикаторных клеток Vero, так и ДНК микробных загрязнений. Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе LSM 5 Pascal (ФРГ) с фильтром возбуждения 330/380 нм и иммерсионным объектом при 100-кратном увеличении, регистрируя внеядерную флуоресценцию.

Результаты и обсуждение

После проведения стерилизации МВС и гМВС различными способами была проведена инкубация образцов в течение 24 ч в питательной среде. Визуальные признаки контаминации наблюдались после обработки образцов УФ-излучением, озонированием и рентгеновским излучением. Изменение цвета среды и данные микроскопии (инвертированный микроскоп Nikon Eclipse TS100) свидетельствовали о наличии микробного роста в указанных образцах (рис. 1).

На основании анализа внеядерной флуоресценции была проведена оценка микробиологической контаминации исследованных образцов (рис. 2). В отличие от образцов после гамма-облучения и фильтрации (рис. 2в, г), в которых не было выявлено признаков контаминации, в образце после озонирования можно было увидеть окрашенные Hoechst 33258 области мелкодисперсного или нитевидного окрашивания в цитоплазме клеток, означающие присутствие микроорганизмов (Рис. 2б). Похожие картины наблюдались в образцах после рентгеновского и УФ-

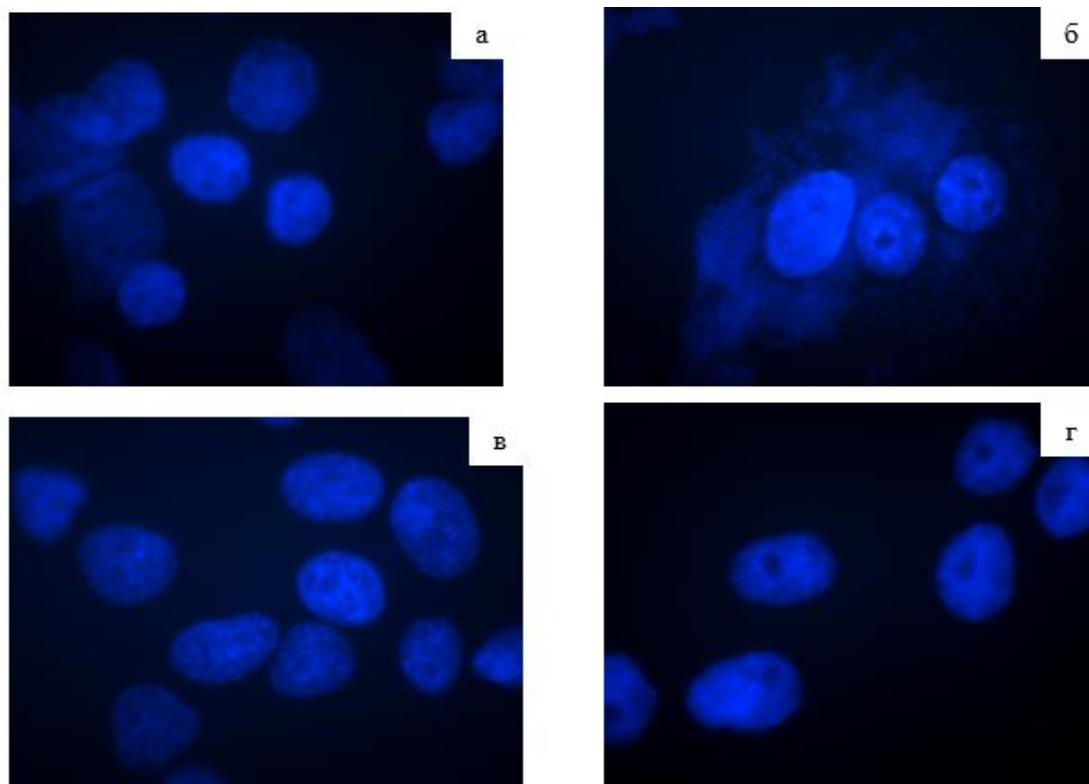


Рис. 2. Флуоресцентная микроскопия клеток линии Vero после 24-часовой инкубации с образцами, обработанными различными методами стерилизации:

а – отрицательный контроль (без добавления образца); б – озонирование; в – гамма-облучение; г – мембранная фильтрация. Окрашивание Hoechst 33258. Ув. об. 100х.

Эффективность методов стерилизации образцов МВС и гМВС

Т а б л и ц а 1.

Обра- зец	УФ облуче- ние	Озонирова- ние	Гамма-облуче- ние	Рентгенов- ское облуче- ние	Термиче- ская стерили- зация	Мембранная фильтрация
МВС	+	+	-	+	-	н.д.
гМВС	+	+	-	+	-	-*

Примечание: + контаминация наблюдалась, – контаминация отсутствовала, * – жидкая форма образцов, н.д. – нет данных.

облучения. Не было обнаружено дополнительной окраски у образцов после термической стерилизации (не показано). В целом, результаты, по визуальной оценке, и микроскопическому анализу образцов совпадали. Результаты оценки эффективности различных методов стерилизации представлены в сводной таблице 1.

В результате проведенного исследования было установлено, что полное устранение микробной контаминации для всех типов образцов было достигнуто при использовании гамма-облучения, обработки в сухожаровом шкафу и мембранной фильтрации для жидкой формы образцов. Методы УФ-облучения, озонирования и рентгеновского облучения оказались неэффективны для полной стерилизации как МВС, так и гМВС. Из представленных данных очевидно, что

обработки при помощи этих методов явно недостаточно для получения стерильного продукта. Неэффективность указанных методов для стерилизации сухого лиофилизированного матрикса (МВС) может быть объяснена следующими причинами, связанными как с ограничениями самих методов, так и с физическими свойствами образца.

Так, в случае УФ-облучения основным ограничением является его низкая проникающая способность. Согласно литературным данным, ультрафиолетовое излучение обладает очень слабой способностью проникать вглубь вещества [11]. В случае пористого сухого МВС оно могло эффективно инактивировать микроорганизмы только на самой поверхности образца. Клетки бактерий и спор, находящиеся в глубине пор или

под слоем самого биоматериала, были защищены от воздействия излучения («эффект тени»), что и привело к последующему росту контаминантов.

В процессе озонирования возникают проблемы с диффузией и концентрацией озона в образце. Газообразный озон, как и УФ-излучение, имеет ограниченную способность проникать в глубь плотной структуры сухого матрикса [11]. Для эффективной стерилизации требуется определенная концентрация озона и время экспозиции по всему объему образца. Вероятно, в пористой структуре МВС возникли зоны, куда озон не диффундировал в достаточной концентрации или в течение необходимого времени для уничтожения всех микроорганизмов, особенно устойчивых спор. К тому же в литературных источниках сообщается, что метод стерилизации озоном является токсичным для обслуживающего персонала, а также требует применение дорогостоящего оборудования [8].

В отличие от УФ-излучения, рентгеновские лучи обладают высокой проникающей способностью и должны были достичь всех микроорганизмов в объеме образца. Следовательно, наиболее вероятной причиной неэффективности является недостаточная стерилизующая доза. Указанная в эксперименте доза в 33 Гр (0,033 кГр) является максимальной дозой излучения используемого в эксперименте оборудования и, как было определено, является крайне низкой для стерилизации. Для сравнения, стандартные дозы гамма-облучения для медицинских изделий составляют 15-25 кГр. Примененная доза рентгеновского излучения могла быть достаточной только для снижения микробной обсемененности, но не для гарантированной стерилизации.

Можно предположить, что полное устранение микробной контаминации другими методами было достигнуто за счет следующих механизмов действия. Так, гамма-облучение вызывает необратимые повреждения ДНК микроорганизмов (включая споры) за счет образования свободных радикалов по всему объему образца, что обеспечивает стерильность даже при обработке в сухом виде. Обработка в сухожаровом шкафу обеспечивает стерильность за счет необратимой денатурации белков и разрушения клеточных структур микроорганизмов под действием высокой температуры в условиях низкой влажности. Мембранная фильтрация (для жидких образцов) физически удаляет микроорганизмы, пропуская раствор через фильтр с размером пор (0,22 мкм), меньшим, чем размер бактериальных клеток и их споры. Однако, несмотря на эффективность, методы сухожаровой обработки и мембранной фильтрации имеют существенные ограничения. Так, высокотемпературная обработка приводит к денатурации нативных белков в составе МВС и гМВС, в результате чего образцы теряют способность к растворению и гелеобразованию, что делает их непригодными для применения в тканевой инженерии. В свою очередь,

мембранная фильтрация неприменима для негидролизированных образцов МВС из-за их низкой способности к растворимости в жидких средах. Дополнительным недостатком является снижение концентрации высокомолекулярных фракций в фильтрате, что может негативно сказаться, как на способности к последующему гелеобразованию, так и на эффективности применения данного вида регенеративного материала. К тому же стоит отметить, что на фильтрацию образцов гидролизированных гМВС наблюдался значительный расход фильтрующих насадок – фильтр с диаметром пор 0,22 мкм забивался после фильтрования примерно 3 мл раствора гидрогеля с концентрацией гМВС 10 мг/мл. Кроме того, процесс подготовки к фильтрации образцов и ее проведения включал в себя значительное количество этапов и был весьма трудоемким. Соответственно, способ стерилизации гамма-облучением является наиболее подходящим для стерилизации материалов, изготовленных из пуповины человека для нужд регенеративной медицины.

Известно, что гамма-облучение вызывает образование свободных радикалов, что приводит к серьезным повреждениям клеток, нарушает химические связи в молекулах ДНК и РНК, инактивируют ферменты. Тем не менее, судя по литературным данным [12], облучение лиофилизированных гидролизатов внеклеточного матрикса в дозе 15 кГр не приводило к потере биологической активности и значительному изменению механических свойств восстановленных гидрогелей. То есть такая обработка позволяла получить стерильный продукт, полностью сохраняющий свои функциональные характеристики.

Отдельно стоит отметить, что этап финишной стерилизации материалов для медицинского использования не должен быть оторван от всей технологии и, помимо выбора оптимального и валидированного метода стерилизации, следует проводить строгий отбор доноров, соблюдать требования забора донорского материала и выстраивать технологический процесс производства медицинских материалов из пуповины человека таким образом, чтобы минимизировать риск увеличения бионагрузки обрабатываемых материалов. Этап стерилизации сам по себе не способен обеспечить надежную гарантию стерильности готовой продукции, так как эффективность стерилизующего агента во многом зависит от уровня биологической нагрузки, возможного наличия бактериальных или грибковых биопленок, сложной структуры стерилизуемых материалов и иных факторов [6, 8, 11].

Заключение

Проведенное исследование демонстрирует, что только гамма-облучение в дозе 15 кГр обеспечивает гарантированную стерильность лиофилизированных образцов матрикса вартоновой студия, сохраняя их структурно-функциональные свойства. Такие методы, как УФ-облучение,

озонирование и рентгеновское облучение в исследованных режимах оказались неэффективны для полной элиминации микрофлоры, что связано с ограниченной проникающей способностью и/или недостаточной стерилизующей дозой. Полученные данные подтверждают необходимость использования валидированных методов стерилизации со споридицидной активностью для обеспечения безопасности тканеинженерных продуктов на основе биологических матриц.

Результаты выполнения проекта будут спо-

собствовать появлению отечественных инновационных высокорегенеративных медицинских изделий для лечения травматических дефектов кожи, суставного хряща и кости.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания FMFU-2024-0008 «Регенераторный потенциал мультипотентных мезенхимных стромальных клеток: паракринная секрция и направленная дифференцировка».

Список литературы

1. Калюжная Л.И., Земляной Д.А., Товпеко Д.В., Чеботарев С.В. Анализ мирового опыта использования биоматериалов пуповины в тканевой инженерии и 3D-биопечати // Медицина и организация здравоохранения. – 2019. – Т. 4, №1. – С. 2658–4212.
2. Калюжная-Земляная Л. И., Товпеко Д. В., Кондратенко А. А. и др. Патент RU2795904C1. Российская Федерация. Способ изготовления бесклеточного матрикса из пуповины человека для создания высокорегенеративного раневого покрытия: № RU2795904C1: заявл. 22.07.2022: опубл. 15.05.2023.
3. Калюжная-Земляная Л. И., Чернов В. Е., Чеботарев С. В., Земляной Д. А. Патент RU2745995C1. Российская Федерация. Способ изготовления бесклеточного гидрогеля из вартонова студня пуповины человека для внутрисуставного применения: № RU2745995C1: заявл. 16.09.2020: опубл. 05.04.2021.
4. Товпеко Д.В., Кондратенко А.А., Околитенко М.С. и др. Оценка структурных и биологических характеристик децеллюляризованного матрикса из Вартонова студня пуповины человека // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2025. – Т. 28, № 8. С. 45–56.
5. Croteau D., Buckley M., Mantay M., Brannan C., Roy A., Barbaro B., Griffiths S. Novel Dehydrated Human Umbilical Cord Particulate Medical Device: Matrix Characterization, Performance, and Biocompatibility for the Management of Acute and Chronic Wounds // Bioengineering. – 2024. – № 11.
6. ГОСТ Р ИСО 14937-2012. Стерилизация медицинской продукции. Общие требования к определению характеристик стерилизующего

агента и к разработке, валидации и текущему контролю процесса стерилизации медицинских изделий [Электронный ресурс] // URL: meganorm.ru/Data2/1/4293787/4293787632.pdf.

7. Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 27 от 12 февраля 2016 года «Об утверждении Общих требований безопасности и эффективности медицинских изделий, требований к их маркировке и эксплуатационной документации на них» [Электронный ресурс] // URL: docs.cntd.ru/document/456005159.

8. Воробьев К. А., Божкова С. А., Тихилов Р. М., Черный А. Ж. Современные способы обработки и стерилизации аллогенных костных тканей (обзор литературы) // Травматология и ортопедия России. – 2017. – Т. 23, № 3. С. 134–147.

9. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство: пер. 6-го англ. изд. – 5-е изд., электрон. – М.: Лаборатория знаний, 2022. – 791 с.

10. ОФС.1.7.2.0031.15. Приказ Минздрава России от 29.10.2015 № 771 «Испытание на присутствие микоплазм» [Электронный ресурс] // URL: pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-13/1/1-7/1-7-2/1-7-2-31/ispytanie-na-prisutstvie-mikoplazm/.

11. Garvey M. Medical Device-Associated Healthcare Infections: Sterilization and the Potential of Novel Biological Approaches to Ensure Patient Safety // Int J Mol Sci. – 2023. – №25 (1). DOI: 10.3390/ijms25010201.

12. White L.J., Keane T.J., Smoulders A. et al. The impact of sterilization upon extracellular matrix hydrogel structure and function // J. Immunol. Regen. Med. – 2018. – № 2. – P. 11–20.

Поступила в редакцию 20.10.2025

Сведения об авторах:

Закопайко Богдан Андреевич – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории (военной терапии) научно-исследовательского отдела (экспериментальной медицины) НИЦ Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, e-mail: bogdanzakopayko@gmail.com

Александрова Светлана Алексеевна – научный сотрудник Лаборатории клеточных технологий Центра клеточных технологий ФГБУН «Институт цитологии» РАН, кандидат биологических наук, e-mail: alekssvet2205@gmail.com

