

## STRESZCZENIE

W wyniku zwiększającej się liczby pacjentów wymagających leczenia operacyjnego w zakresie chirurgii odtwórczo – naprawczej, pomimo wprowadzenia do zastosowania różnego rodzaju materiałów inżynierskich oraz produktów inżynierii tkankowej, rośnie zapotrzebowanie na ludzkie przeszczepy tkankowe. Ze względu na fakt, że możliwości pobrania odpowiedniej ilości tkanek własnych pacjenta są ograniczone, a także ze względu na ryzyko powikłań w miejscu pobrania czy wydłużenie czasu zabiegu, od wielu lat stosuje się allogeniczne przeszczepy tkankowe.

Tkanki ludzkie od dawców zmarłych, służące do przygotowania przeszczepów tkankowych, pobierane są w salach sekcyjnych zakładów medycyny sądowej i szpitali lub w trakcie pobrań wielonarządowych, odbywających się na blokach operacyjnych. Pomimo stosowania rygorystycznych procedur, stopień ich skażenia może być wysoki. Do kontaminacji tkanek może dojść podczas ich pobierania, a także przetwarzania w banku tkanek. Kwalifikacja wstępna potencjalnego dawcy, wykonywane badania serologiczne, a także przetwarzanie tkanek w przeszczepy w warunkach kontrolowanego środowiska w pomieszczeniach czystych banków tkanek zmniejszają jedynie ryzyko przeniesienia przez przeszczep zakażeń wirusowych, bakteryjnych, grzybiczych i prionowych od dawcy do biorcy, nie eliminując go całkowicie. Z tego względu, w celu zapewnienia bezpieczeństwa biorcy, stosuje się sterylizację przeszczepów tkankowych.

W celu określenia efektywności sterylizacji wprowadzono pojęcie poziomu zapewnienia sterylności SAL (ang. Sterility Assurance Level). Termin SAL określa prawdopodobieństwo przeżycia mikroorganizmów po zastosowanej metodzie sterylizacji. W przypadku sterylizacji przeszczepów tkankowych wartość SAL powinna wynosić  $10^{-6}$  (SAL  $10^{-6}$ ), co oznacza, że jedynie jeden na milion obecnych na powierzchni lub wewnątrz sterylizowanego materiału mikroorganizmów może przeżyć ten proces.

W celu zapewnienia zakładanego poziomu jałowości (SAL  $10^{-6}$ ) stosuje się sterylizację radiacyjną allogenicznych przeszczepów z wykorzystaniem promieniowania jonizującego. Sterylizacja radiacyjna może niekorzystnie wpływać na ich właściwości

mechaniczne, uszkadzając strukturę istoty zewnątrzkomórkowej na skutek degradacji kolagenu typu I, a także na właściwości biologiczne, generując związki toksyczne dla komórek biorcy oraz zmniejszając zdolność ostoindukcji przeszczepów kostnych. Z tego względu istotnym aspektem jest sposób przygotowania i warunki sterylizacji radiacyjnej allogenicznych przeszczepów kostnych, zapewniający zarówno ich bezpieczeństwo mikrobiologiczne, jak i wysoką jakość, rozumianą jako maksymalne zachowane właściwości natywnej tkanki kostnej.

Celem niniejszej pracy było zbadanie oraz porównanie wpływu sposobu przygotowania ludzkich allogenicznych przeszczepów kości zbitej (odtłuszczenie lub brak odtłuszczenia) oraz warunków ich sterylizacji: rodzaju zastosowanego promieniowania jonizującego (promieniowanie gamma lub wiązka przyspieszonych elektronów), dawki promieniowania (25 kGy lub 35 kGy) oraz temperatury napromieniowania (temperatura otoczenia lub temperatura suchego lodu), na: (i) gęstość wiązań sieciujących w kolagenie typu I kości zbitej – pirydynoliny, deoksypirydynoliny oraz pentozydiny oraz (ii) degradację kolagenu typu I kości zbitej, mierzonej jego rozpuszczalnością.

Badania przeprowadzono na próbkach ludzkiej tkanki kostnej zbitej, uzyskanej z kości udowych sześciu zmarłych dawców. Lewe i prawe kości udowe pobrano od dawców płci męskiej w wieku od 46 do 54 lat, oczyszczono z tkanek miękkich, a następnie odcięto z nich bliższe i dalsze nasady. Uzyskane trzony kości udowych pocięto na plastry o grubości 1 cm i usunięto z nich mechanicznie szpik kostny. Każdy z krążków przypisano do jednej z szesnastu grup eksperymentalnych, w których uwzględniono wszystkie możliwe kombinacje zastosowanych parametrów: krążki kostne odtłuszczone lub nieodtłuszczone, krążki napromieniowane wiązką przyspieszonych elektronów z akceleratora elektronów lub promieniowaniem gamma w komorze gamma, krążki napromieniowane dawką 25 kGy lub 35 kGy oraz krążki napromieniowane w temperaturze suchego lodu lub temperaturze otoczenia. Grupę kontrolną stanowiły krążki nieodtłuszczone i nienapromieniowane.

Rozdział, identyfikację i oznaczanie ilościowe pirydynoliny, deoksypirydynoliny i pentozydiny wykonano z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), opisanej przez Viguet-Carrin i wsp. [93], na aparacie Acquity UPLC, (Waters Corporation, USA). Uzyskane wyniki

ilościowe pirydynoliny, deoksypirydynoliny i pentozydyny w badanych hydrolizatach proszku kostnego przeliczano na zawartość kolagenu typu I w tych samych hydrolizatach. Hydroksyprolinę oznaczano indywidualnie, stosując metodę kolorymetryczną Woessnera [94] na spektrofotometrze UV/Vis, model U-2800 (Hitachi, Japonia).

Indukowaną radiacyjnie degradację kolagenu tkanki kostnej określano na podstawie jego rozpuszczalności *in vitro*, izolując rozpuszczalny kolagen ze sproszkowanych i zliofilizowanych krążków kostnych przy zastosowaniu metody dwóch następujących po sobie ekstrakcji: ekstrakcji w środowisku obojętnym (NSC) i ekstrakcji w środowisku kwaśnym (ASC). Ilość rozpuszczalnego kolagenu oceniano na podstawie pomiarów hydroksyproliny w ekstraktach NSC i ASC i wyrażono w procentach całkowitego kolagenu w danym krążku kostnym. Oznaczenie hydroksyproliny prowadzono z wykorzystaniem spektrofotometru UV/Vis, model U-2800 (Hitachi, Japonia).

W pierwszej części pracy oceniono wpływ sposobu przygotowania przeszczepów ludzkiej kości zbitej oraz warunków ich sterylizacji na gęstość wiązań sieciujących w kolagenie macierzy kostnej – pirydynoliny, deoksypirydynoliny i pentozydyny. Oceniając gęstość pirydynoliny i deoksypirydynoliny nie zaobserwowano wpływu żadnego z zadanych doświadczalnie czynników na badany parametr. Uzyskane wyniki wskazują na ich stabilność chemiczną zarówno pod wpływem odtłuszczenia tkanki kostnej, jak i jej sterylizacji radiacyjnej, niezależnie od rodzaju i dawki zastosowanego promieniowania jonizującego oraz temperatury napromieniowania. Odmienną sytuację obserwowano w przypadku gęstości pentozydyny w kolagenie doświadczalnych krążków kości zbitej. Zaobserwowano znamienne niższe wartości jej gęstości we wszystkich grupach eksperymentalnych poddanych procesowi odtłuszczenia przed napromieniowaniem, niezależnie od rodzaju i dawki zastosowanego promieniowania oraz temperatury napromieniowania. Potencjalne przyczyny obserwowanego zjawiska obejmują wymywanie pentozydyny w trakcie procesu odtłuszczenia kości lub degradację związku pod wpływem zastosowanych w procesie odczynników chemicznych.

Wyniki uzyskane w drugiej części pracy wykazały znamienne wpływ na rozpuszczalność kolagenu krążków kostnych z grup eksperymentalnych dwóch zadanych doświadczalnie czynników: odtłuszczenia krążków kostnych przed napromieniowaniem oraz dawki promieniowania. Rozpuszczalność kolagenu w krążkach odtłuszczonych przed napromieniowaniem była znamienne niższa w porównaniu do nieodtłuszczonych krążków kostnych, niezależnie od rodzaju promieniowania, jego dawki oraz temperatury napromieniowania. Dodatkowo analiza wykazała znamienne wyższą rozpuszczalność kolagenu w krążkach napromieniowanych dawką 35 kGy w porównaniu z tymi napromieniowanymi dawką 25 kGy, niezależnie od sposobu przygotowania krążków (nieodtłuszczone lub odtłuszczone), rodzaju promieniowania oraz temperatury napromieniowania.