

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*



**Николаева Надежда Анатольевна**

**Комбинированные радиационные технологии для стерилизации и  
консервации ископаемых биообъектов**

1.5.1. Радиобиология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Научные руководители:

д-р биол. наук, доцент

Розанов В.В.,

д-р физ.-мат. наук, профессор

Черняев А. П.

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	3
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	15
1.1. Исследования древних ископаемых объектов мамонтовой фауны .....	15
1.2. Проблема таяния многолетней мерзлоты и опасность возникновения древних патогенов и вирусов .....	24
1.3. Методы стерилизации.....	28
1.4. Радиационные методы стерилизации.....	33
1.5. Моделирование процесса стерилизации.....	38
1.6. Сложности, ограничения и побочные эффекты, связанные с радиационной стерилизацией .....	43
1.7. Технологии комбинированной стерилизации .....	46
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....	53
2.1. Методы исследования характеристик поверхности .....	53
2.1.1. Метод инфракрасной спектроскопии (ИК) .....	53
2.1.2. Метод растровой электронной микроскопии.....	55
2.1.3. Метод атомной силовой микроскопии.....	57
2.1.4. Метод измерения микротвердости .....	59
2.2. Методы обработки костных образцов.....	59
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	63
3.1. Селективное воздействие озона на костные образцы .....	63
3.2. Морфо-механические характеристики образцов после радиационного воздействия .....	71
3.3. Состояние костного коллагена до и после селективного и комбинированного радиационного воздействия .....	76
3.4. Изучение изменения коллагеновых структур образцов после воздействия радиации.....	80
3.5. Изучение характеристик образцов и микробиологический анализ .....	90
3.6. Промежуточные результаты пробоподготовки и анализ методов изготовления костных образцов .....	92
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	98
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:</b> .....	103
Приложение 1 .....	123
Приложение 2 .....	129

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Республика Саха (Якутия) входит в Арктическую зону Российской Федерации (АЗ РФ) как геостратегическая территория с экстремальными природно-климатическими условиями и высокой чувствительностью экосистем, что способствуют возникновению различных рисков. Уникальность этих территорий определяется тем, что в Якутии обнаружено более 80% останков мамонтовой фауны мира [1], в том числе, около 70% мировых запасов мамонтовой кости и останков других древних животных. В целях развития научного изучения объектов историко-культурного наследия Правительствами РФ и регионов АЗ РФ разработан ряд нормативно-правовых актов [2-7]<sup>1</sup>, в том числе «Стратегия развития АЗ РФ» [3]. Планируется реализация проекта «Всемирный Центр мамонта» на территории Якутии. Концепция Центра включает обеспечение условий для консервации замороженных мумий, бивней, костных останков, организации выставок, анатомических и морфологических исследований [8-10]. В связи с этим актуализируется проблема долговременного и безопасного хранения останков мамонтовой фауны, в том числе костной ткани. Сохранение исторического и образовательно-культурного наследия является мировой проблемой. Один из важных ее аспектов – работа с ископаемыми биообъектами в связи с их культурной, исторической и научной ценностью. Изучение палеонтологических находок расширяет наши знания об историческом периоде мамонтовой фауны и его месте в эволюционном процессе. Научная значимость этих исследований определяется совокупностью новых знаний в палеонтологии, биологии, микробиологии и др., получаемых с помощью современных физических, химических, биологических экспериментальных методик, приборов и оборудования.

Вместе с тем, следует особо подчеркнуть, что обнаружение большого

---

<sup>1</sup> Распоряжение Правительства РФ от 15.04.2021 N 996-р (ред. от 09.12.2023) «Об утверждении Единого плана мероприятий по реализации Основ государственной политики Российской Федерации в Арктике на период до 2035 года и Стратегии развития Арктической зоны Российской Федерации и обеспечения национальной безопасности на период до 2035 года».

количества древних останков в результате оттаивания многолетнемерзлых грунтов сопровождается появлением большого количества древних бактерий и вирусов, бесконтрольно попадающих в окружающую среду [11, 12]. Данные микроорганизмы могут выживать и существовать при низких температурах (например, после консервации в мерзлоте более 40000 лет) [13, 14]. Экспериментальные данные исследований последних лет показывают, что не только вирусы и бактерии, но и такие «высокоорганизованные» организмы как нематоды могут оставаться жизнеспособными в течение длительного периода времени (более 46000 лет) в состоянии анабиоза в мерзлоте [15]. Это подтверждает актуальность и практическую значимость разработки технологии стерилизации ископаемых биообъектов для обеспечения необходимого уровня безопасности при работе с древними останками и создании условий для их долговременного хранения и изучения.

Большинство традиционных методов стерилизации: химическая, термообработка, стерилизация газом (окись этилена) не подходят для материалов, чувствительных к высоким температурам и токсичным веществам [16]. Во многих музеях России и мира применяются компоненты химической стерилизации (требуется дополнительные меры, например, аэрация для удаления газа), обычно загрязняющие окружающую среду и способствующие разрушению самого материала. Наиболее перспективной технологией для стерилизации и сохранения объектов культурного наследия является обработка посредством ионизирующего излучения [17, 18].

Для радиационной стерилизации древних останков обычно применяют гамма-излучение и пучки быстрых электронов с величиной поглощенной дозы от 20 кГр. Впервые радиационная обработка останков мамонтовой фауны проведена в 2010 г. для мамонтенка Хромы [19, 20]. Однако, при облучении с поглощенной дозой (20 кГр и более) в материале наблюдаются структурные изменения и повреждения, что приводит к потере необходимой информации о биообъектах и снижению их структурно-функциональных свойств [21-25]. Решение проблемы радиационно-индуцированных изменений и снижение величины поглощенной

дозы с одновременным сохранением структуры и физических свойств материала возможно при использовании технологии комбинированной радиационной стерилизации. Такая технология с использованием озono-кислородной смеси на первом этапе стерилизации и радиационным облучением на втором этапе, разработанная на кафедре физики ускорителей и радиационной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова при участии специалистов Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (ФГБНУ ВИЛАР), позволила достичь необходимой степени стерильности костных образцов (на примере костных имплантатов) при величине поглощенной дозы 11-12 кГр с сохранением основных характеристик костной ткани [26].

Вместе с тем, в предыдущем цикле исследований не был изучен ряд важных физических, морфологических, методических и других вопросов, связанных с селективным воздействием отдельных факторов и их комбинации на свойства и характеристики костного материала. В связи с этим актуальным является продолжение и развитие цикла исследований по комбинированной радиационной стерилизации биообъектов и подтверждение возможности ее применения для стерилизации и консервации ископаемых биообъектов.

**Целью** данной работы является разработка физико-технического обоснования возможности применения комбинированных радиационных технологий для стерилизации и консервации ископаемых биообъектов. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Провести лабораторные исследования возможных изменений свойств и характеристик костных фрагментов при селективных и комбинированных воздействиях: 1) озono-кислородной смеси и 2) радиационного воздействия (ускоренные электроны) при различных значениях дозы.

2. Провести экспериментальные исследования изменения морфо-механических характеристик и элементного состава поверхности костных материалов в результате селективного и комбинированного воздействия озона и радиации.

3. Осуществить экспериментальные (с использованием ИК-

спектроскопии) и модельные исследования возможного влияния селективной и комбинированной радиационной стерилизации на сохранность костного коллагена.

4. На основании полученных экспериментальных данных и результатов осуществленных модельных оценок выработать практические рекомендации по возможности и оптимизации применения комбинированной радиационной технологии для ископаемых биообъектов.

**Объект исследования.** Объектом исследования являлись образцы костной ткани быка и мамонтовой кости. Проводилось изучение закономерности изменений характеристик поверхности образцов после воздействий ионизирующего излучения, озонной стерилизации в зависимости от параметров процесса обработки (величина дозы, время воздействия, концентрация и т.д.) и комбинированной радиационной стерилизации.

**Методология и методы исследования.** Основные результаты, представленные в диссертационной работе, получены с помощью экспериментальных исследований и модельных оценок. В работе использовались современные инструментальные методы анализа (растровая электронная микроскопия, ИК-спектроскопия и др.) для визуализации и изучения образцов. Морфологию поверхности костных образцов изучали с помощью растрового электронного микроскопа с насадкой для элементного анализа JEOL JSM-7800F (Япония). Исследование содержания коллагена были проведены с использованием инфракрасного спектрометра с преобразованием Фурье Varian 7000 FTIR [27]. Исследования механических характеристик поверхности костных образцов включали измерение микротвердости по Виккерсу с помощью микротвердомера DM8 (Италия). Значение концентрации озона фиксировалось с помощью измерителя ИКО-50 (Россия). Герметичная упаковка костных образцов осуществлялась с использованием двухслойной термопленки на запаивающем аппарате F70-400 (Нидерланды) [28]. При интерпретации некоторых результатов, использованы расчетные методы математического моделирования для анализа характеристик образцов после воздействия озона и радиации. Проведены микробиологические исследования для оценки эффективности предложенного

метода стерилизации для останков мамонтовой фауны. Радиационную обработку образцов проводили на линейном ускорителе электронов непрерывного действия с энергией 1 МэВ (Институт ядерной физики МГУ им. М.В. Ломоносова) [29].

**Научная новизна.** В результате проведенных исследований в работе впервые:

1. Обоснована перспективность метода комбинированной стерилизации для биообъектов и сформулированы практические рекомендации. Применение комбинированной радиационной технологии позволяет сохранить структурно-функциональные, морфологические и механические характеристики костной ткани древних ископаемых материалов, что расширяет возможности исследования и консервации останков мамонтовой фауны.

2. Показано, что селективное озоновое воздействие и его сочетание с последующей радиационной обработкой в выбранном диапазоне параметров не оказывают влияния на механические характеристики и морфологию поверхности костного материала. При этом изменяется элементный состав, в частности, существенно возрастает содержание кислорода.

3. Установлено, что предложенная технология стерилизации обеспечивает сохранность костного коллагена в костных фрагментах мамонтовой фауны. Дано модельное обоснование структурного изменения костного коллагена при увеличении дозовой нагрузки.

#### **Практическая значимость работы:**

1. Дано физико-техническое обоснование возможности применения комбинированных радиационных технологий для стерилизации и консервации ископаемых биообъектов. Предлагаемая методика может применяться для увеличения срока сохранности ископаемых биообъектов и снижает риск возникновения радиационно-индуцированных повреждений.

2. Разработанные практические рекомендации для обработки биообъектов позволяют повысить эффективность метода стерилизации (при величине поглощённой дозе менее 15 кГр) и обеспечить стерильность образцов, сохраняя нативные свойства и характеристики костного материала, что

представляет особую ценность для использования в Музее Мамонта, Всемирном Центре Мамонта и др.

3. Результаты, полученные в ходе проведенных экспериментов, дают научное знание и новую информацию о строении и составе ископаемого костного материала и вносят вклад в базу данных о палеонтологических останках, способствуют развитию междисциплинарных областей исследования.

4. Определены оптимальные условия применения комбинированной технологии стерилизации (озоно-кислородная смесь с концентрацией 6-8 мг/л с продолжительностью воздействия 15-20 мин., радиационная обработка с величиной поглощенной дозы до 15 кГр) для ископаемых биообъектов.

5. Выводы настоящего исследования могут быть рекомендованы для применения и корректировки параметров селективной озоновой и комбинированной радиационной стерилизации в других областях (стерилизация биоимплантатов и др.).

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Использование комбинированной технологии (озон + радиация) стерилизации ископаемых костных образцов позволяет в максимальной степени сохранить нативные свойства и характеристики костного материала и при этом обеспечить безопасность последующих контактов и работы исследовательского персонала.

2. Как селективное, так и сочетанное воздействие компонентов комбинированной радиационной технологии стерилизации (озоно-кислородная смесь с концентрацией 6-8 мг/л с продолжительностью воздействия 15-20 мин и радиационная обработка с величиной поглощенной дозы до 15 кГр) не приводят к морфологическим и механическим изменениям костных структур.

3. Селективное озоновое воздействие в указанном диапазоне параметров приводит к повышению содержания кислорода в поверхностном слое костного образца, что за счет кислородного эффекта способствует повышению эффективности последующей радиационной обработки при возможной модификации радиочувствительности бактерий.



4. Использование комбинированной радиационной технологии (озон + радиация) позволяет уменьшить величину поглощенной дозы, что обеспечивает сохранность остаточного костного коллагена, структурно-функциональных, морфологических и механических характеристик образцов, что расширяет возможности исследования ископаемых костных материалов и их комплексного использования при осуществлении федеральных и региональных Программ по якутскому мамонту и других аналогичных Программ.

**Степень достоверности научных результатов.** Достоверность представленных в работе результатов и выводов обеспечивается применением апробированных методик экспериментальных исследований, современных приборов и оборудования, а также методов модельных расчетов.

**Личный вклад автора** состоит в анализе литературных источников по теме диссертации, подборе методик инструментального анализа, участии в проведении междисциплинарных экспериментов, обработке, анализе и апробации результатов на научных конференциях, представлении докладов (устных и стендовых), подготовке публикаций по теме диссертации. Автором был разработан проект (№FSRG20210014 [30]), который выиграл федеральный конкурс Минобрнауки по созданию лабораторий «Радиационные технологии» (ФТИ Северо-Восточного федерального университета) и «Электронные пучки и радиационная терапия» (Якутский республиканский онкологический диспансер).

**Апробация результатов.** Основные результаты исследования (в период с 2019 по 2024 гг.) докладывались на 20 международных и всероссийских конференциях:

International Conference on Radiation Applications (Афины, Греция, 2023); Международная конференция по ядерной физике «NUCLEUS – 2019, 2020, 2022, 2023, 2024: Fundamental problems and applications» (Дубна 2019 и др.); XXIV Научная школа-конференция «Концентрированные потоки энергии в космической технике, электронике, экологии и медицине – 2023»; Международная конференция 10th International Conference on Mathematical Modeling (Якутск, 2023); IV Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2019), Конгресс

«Онкорadiология, Лучевая диагностика и терапия – 2019»; Конференция с международным участием «Интеграция наук: междисциплинарность в медицине» (Якутск, 2022); Международная научная конференция «Радиобиология: современные проблемы – 2019, 2020» (Гомель 2019, 2020); «Ядерные технологии: от исследований к внедрению – 2019»; «Медико-технические технологии на страже здоровья – 2019»; Конференция с международным участием «Современные аспекты травматологии, ортопедии и реконструктивной хирургии» (г. Астрахань, 2019); Конференция «XXV Лаврентьевские чтения», «Республиканская научно-практическая конференция: Аммосов 2022»; «Интеграция наук 2022»; «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» 2019, 2023; «Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии ФРЭМЭ'2020» (Россия, 2020); VII Троицкая конференция с международным участием «Медицинская физика» (г. Троицк, 2020) и др.

**Соответствие паспорту научной специальности.** Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.1. Радиобиология по области исследований: 4. Медико-биологические последствия действия радиации и разработка методов их минимизации. 7. Проблема радиационной чувствительности биологических объектов. Модификация радиочувствительности.

**Исследования поддержаны** грантами Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках проектов: «Разработка и внедрение новых комплексных подходов исследования актуальных задач медицины с применением методов спектроскопии, микроскопии, радиационной биофизики и математического моделирования» (номер стипендии: СП – 3531.2021.4); «Разработка и внедрение новых комплексных подходов исследования актуальных задач медицины, сельского хозяйства, промышленности, в том числе, обработки драгоценных камней, а также палеонтологии, биологии, вирусологии с применением методов спектроскопии, микроскопии и радиационных технологий» (номер проекта: FSRG20210014 [30]). Диссертантом разработан проект открытия молодежной лаборатории «Радиационные технологии ФТИ СВФУ» в рамках Научно-образовательного центра «Север – территория устойчивого развития»,

проект был поддержан грантом Минобрнауки в 2021 г. и продлен в 2024 г. Диссертант является получателем Стипендии Президента РФ, проект основан на теме диссертации.

**Публикации.** Основные результаты по теме исследования изложены в 14 печатных изданиях, в том числе в 9 статьях, опубликованных в журналах, индексируемых в базах данных Scopus, Web of Science, RSCI.

Научные статьи, опубликованные в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, индексируемых в базах данных Scopus, Web of Science, RSCI:

1. Nikolaeva, N.A. The Influence of Combined Sterilization Factors on the Structural and Functional Characteristics of Bone Implants / **N.A. Nikolaeva**, V.V. Rozanov, A.P. Chernyaev, I.V. Matveychuk, M.M. Makarova // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, № 19. – P. 14426. (WoS, JIF=4,9, **Q1**, 1 п.л., 80%).

2. Николаева, **Н.А.** Особенности изменения характеристик костных имплантатов при комбинированной стерилизации / **Н.А. Николаева**, В.В. Розанов, И.В. Матвейчук, А.П. Черняев // Гены и клетки. – 2022. – Т. 17, № 3. – С. 162-163. (Scopus, SJP=0,160, **Q4**, 0,2 п.л., 60%).

3. Николаева, Н.А. Исследование структурно-функциональных характеристик поверхности костных имплантатов при комбинированной стерилизации / В.В. Розанов, А.П. Черняев, **Н.А. Николаева**, Л.Н. Саввинова // Известия Российской академии наук. Серия физическая. – 2020. – Т. 84, № 11. – С. 1587-1592 (Scopus, SJR = 0,226 **Q3**; 0,7 п.л., 50%).

4. Николаева, Н.А. Возможности и перспективы совершенствования комбинированных методик стерилизации биоимплантатов / **Н.А. Николаева**, В.В. Розанов, И.В. Матвейчук, А.П. Черняев, Л.Н. Саввинова // Гены и клетки. – 2019. – Т. 14, № 5. – С. 167. (Scopus, SJR=0,117, **Q4**, 0,2 п.л., 70%).

5. Николаева, Н.А. Современное состояние и направления дальнейшего развития высокотехнологичных методов радиационной стерилизации / В.В. Розанов, И.В. Матвейчук, А.П. Черняев, **Н.А. Николаева**, С.А. Краснов // Известия

Российской академии наук. Серия физическая. – 2020. – Т. 84, № 4. – С. 521-524 (Nikolaeva, N. A. Current State and Lines of the Further Development of High-Tech Means 21 of Radiation Sterilization / V.V. Rozanov, I.V. Matveychuk, A.P. Chernyaev, **N.A. Nikolaeva**, S.A. Krasnov // Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics. – 2020. – Vol. 84, № 4. – P. 403 – 405.) (Scopus, SJR=0,226, Q3, 0,23 п.л., 70%).

6. Николаева, Н.А. Развитие технологий стерилизации природных наноструктурированных материалов / В.В. Розанов, И.В. Матвейчук, А.П. Черняев, **Н.А. Николаева**, А.О. Хуцистова // Российские нанотехнологии. – 2023. – Т. 18, № 4. – С. 547-552. (Nikolaeva, N.A. Development of Technologies for Sterilization of Natural Nanostructured Materials / V.V. Rozanov, I.V. Matveychuk, A.P. Chernyaev, **N.A. Nikolaeva**, A.O. Khutsistova // Nanobiotechnology Reports. – 2023. – Vol. 18, № 4. – P. 624-628.) (Scopus, SJR = 0,19, **Q4**, 0,23 п.л., 50%).

7. Николаева, Н.А. Стратегия развития комбинированных радиационных технологий стерилизации костных имплантатов / В.В. Розанов, И.В. Матвейчук, А.П. Черняев, **Н.А. Николаева**, Л. Н. Саввинова // Известия Российской академии наук. Серия физическая. – 2021. – Т. 85, № 5. – С. 745-748. (Nikolaeva, N.A. Strategy for Developing Combined Radiation Technologies for Bone Implant Sterilization / V.V. Rozanov, I.V. Matveychuk, A.P. Chernyaev, **N.A. Nikolaeva**, L.N. Savvinova // Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics. – 2021. – Vol. 85, № 5 – P. 581-584. (Scopus, SJR=0,211, Q3, 0,23 п.л., 60%).

8. Николаева, Н.А. Изменения морфомеханических характеристик костных имплантатов при радиационной стерилизации / В.В. Розанов, И.В. Матвейчук, А.П. Черняев, **Н.А. Николаева** // Известия Российской академии наук. Серия физическая. – 2019. – Т. 83, № 10. – С. 1435-1440. (Nikolaeva, N.A. Changes in the Morphological and Mechanical Characteristics of Bone Implants upon Radiation Sterilization./ V.V. Rozanov, I.V. Matveychuk, A.P. Chernyaev, **N.A. Nikolaeva** // Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics. – 2019. – Vol. 83, №. 10. – P. 1311-1315. (Scopus, SJR=0,226, **Q3**, 0,3 п.л., 50%).

9. Nikolaeva, N.A. Using scanning electron microscopy and atomic force microscopy to study the formation of nanoparticles on red blood cell surface in cervical cancer patients / S.N. Mamaeva, I.V. Kononova, M. Ruzhansky, P.V. Nikiforov, **N.A. Nikolaeva**, A.N. Pavlov, N.F. Fedorova, J. Huang, M.N. Semenova, D.V. Barashkova, L.S. Frolova // International Journal of Biomedicine. – 2020. – Vol. 1, № 10. – P. 70-75 (Scopus, SJR= 0.127, Q4, 0.5 п.л., 50%).

### Прочие публикации

10. Nikolaeva, N.A. Scanning electron microscope: A model for determining of main emission characteristics for the Schottky cathode in the mode of working with biological samples / S.N. Mamaeva, G.V. Maksimov, N.V. Egorov, S.R. Antonov, E.P. Neustroev, **N.A. Nikolaeva**, A.N. Pavlov // AIP Conference Proceedings. – 2021. – Vol. 2328. – Art. 0042476

11. Николаева, Н.А. Математическое моделирование основных эмиссионных характеристик полевого и термополевого электронных катодов сканирующих электронных микроскопов при исследовании биообразцов / С.Н. Мамаева, А.Н. Павлов, **Н.А. Николаева**, Г.В. Максимов // Журнал технической физики. – 2023. – Т. 93, № 12. – С. 1716-1719.

12. Николаева, Н.А. Исследование состояния поверхности костных имплантатов при комбинированной стерилизации / Интеграция наук: междисциплинарность в медицине / **Н.А. Николаева**, В.В. Розанов, А.П. Черняев, И.В. Матвейчук, М.П. Макарова // Медицинская физика. – 2022. – № 3(95). – С. 35-36.

13. Николаева, Н.А. Технологии радиационной стерилизации костных имплантатов: современное состояние, проблемы, перспективы / В.В. Розанов, И.В. Матвейчук, **Н.А. Николаева** // Медицинская физика. – 2022. – № 3(95). – С. 13.

14. Николаева, Н.А. Комбинированные воздействия на биообъекты для повышения эффективности радиационной обработки / В.В. Розанов, И.В.

Матвейчук, А.П. Черняев, **Н.А. Николаева** // Медицинская физика. – 2019. – № 1(81). – С. 54-55.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, трех глав и заключения. Полный объем диссертации составляет 138 страниц текста с 47 рисунками и 23 таблицами. Список литературы содержит 175 наименований.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Исследования древних ископаемых объектов мамонтовой фауны

Территория Республика Саха (Якутия) на 90% относится к зоне “вечной” мерзлоты с многолетнемерзлыми грунтами. Республика по праву является мировым лидером по палеонтологическим находкам, так, например, более 80% всех мировых находок останков мамонтовой фауны (пещерных львов, шерстистого носорога, древних собак, жеребят, мамонтов и др.), ставшие мировым и национальным научным достоянием, обнаружены на территории Якутии. Научным сообществом Якутия признана экспедиционно-исследовательским форпостом России на севере-востоке страны и самым большим по территории (3 млн 83,5 тыс. кв. км) и самым холодным регионом Арктики.

Уникальные природно-климатические условия региона позволяют сохранить и обнаружить множество различных ценных палеонтологических находок мамонтовой фауны с высокой степенью сохранности мягких тканей, что представляет большой научный интерес. Мамонты — вымерший род млекопитающих из семейства слоновых, живший в четвертичном периоде. Появление мамонтовой фауны неразрывно связано с ледниковым периодом. Шерстистые мамонты были весьма распространены на территориях Северной Евразии, от Европы до Дальнего Востока, включая Хоккайдо и Сахалин [31, 32].

Большой вклад в развитие исследования шерстистых мамонтов и других древних животных внесли Верещагин Н.К., Лазарев П.А., Тихонов А.Н., Григорьев С.Е., Боескорев Г.Г., научные группы из Палеонтологического института РАН, Северо-Восточного университета имени М.К. Аммосова. Можно отметить существенную активность в данном направлении научных групп МГУ имени М.В. Ломоносова. Профессор эволюционной генетики Лове Дален занимается извлечением ДНК из древних останков для расшифрования генетического кода мамонта.

Григорьев С.Е. проводил экспедиции, исследования по мониторингу и поиску живых клеток у образцов мамонтов для возможного клонирования мамонта;

исследования найденных объектов с помощью биофизических методов с целью расширения базы данных о важном историческом периоде; анализ сохранности тканевых структур в условиях вечной мерзлоты и т.д. Под его руководством были изучены и обнаружены сотрудниками СВФУ останки взрослого шерстистого мамонта (*Mammuthus primigenius*), найденных на острове Малый Ляховский в 2012 г. в Якутии (рисунок 1), что позволило получить новые анатомические и морфологические данные об объектах мамонтовой фауны и том периоде. Так, например, ученым впервые в мире была обнаружены остатки гемолизированной крови в замороженном состоянии при исследовании Малоляховского мамонта. Гистоморфологические изучения клетки и тканей проводились в лаборатории клиники СВФУ, были проанализированы венозные и артериальные сосуды с помощью светового микроскопа [33]. При дальнейшем изучении, были обнаружены лейкоциты с сохранившимися ядрами в образцах крови.

Малоляховский мамонт представляет собой относительно взрослую самку с сохранившимися мягкими тканями части головы, обеими передними конечностями, бивнями. Большая часть остального тела и мышечная ткань туловища находятся в хорошем состоянии [33]. Также после проведения микробиологических исследований были найдены штаммы молочнокислых бактерий (*Enterococcus faecium, hirae*) (таблица 1).



**Рис. 1.** Вид сбоку на останки мамонта на снях после раскопок, проведенных сотрудниками СВФУ и Музеем Мамонта.

Показано, что микробиом ископаемых животных, таких, как малоляховский мамонт, содержит ряд молочнокислых бактерий (энтерококков, карнобактерий),



характерных для млекопитающих (таблица 2).

**Таблица 1.** Культивируемые бактерии тканей «Малоляховского мамонта» [34, 35, 52-62].

№	Происхождение	Ближайший родственник (16S rRNA)	% 16S rRNA сходство
1	содержимое кишечника	Carnobacterium maltaromaticum	96
2	содержимое кишечника	Enterococcus faecium	98
3	содержимое кишечника	Romboutsia massiliensis, sp. nov	98.48
4	содержимое кишечника	Acinetobacter lwoffii	99
5	содержимое кишечника	Enterococcus hirae	99
6	десневой карман	Enterococcus faecium	98
7	костный мозг	Arthrobacter sp.	99

**Таблица 2.** Пример проведенных микробиологических исследований [34, 35, 52-62].

Детерминанты патогенности, обнаруженные в составе изучаемого генома	Штамм, в котором были обнаружены	Возраст наиболее древнего объекта, в котором обнаружен генетический элемент (по данным радиоуглеродного датирования)
Сидерофоры: аэробактиновый и энтеробактиновый опероны	Serratia fonticola 5l Serratia plymutica str. tumat	12 460 ± 50
Фрагменты геномного острова, сходного с SDI-1 Salmonella spp.	Serratia fonticola 5l	8980± 50
Гемолизины	Serratia fonticola 5l Serratia plymutica str. tumat	12 460 ± 50
IS-16 (маркер эпидемических клонов энтерококков)	Enterococcus faecium str. 58	28800± 150

### *Исследования мамонтовой кости*

Изучение сохранившихся костей мамонта расширяет наше понимание биологии и эволюции древних животных. В связи с нахождением значительного количества мамонтовой кости на территории Якутии, изготовлением множества разнообразных изделий из костей мамонта, созданием новых инфраструктурных центров с планируемыми выставками и др., важным является комплексное

изучение сохранившихся костей мамонта и их характеристик. Так, например, по кости и бивням можно изучить репродуктивную историю, определить возраст, пол, образ жизни, причины смерти и т.д. Мамонтовая кость связана с культурными традициями и широко признана важной характеристикой окружающего мира древнего человека.

Важную историческую информацию содержит костный коллаген древних ископаемых. Костный коллаген – белок, который играет значительную роль в создании (и регенерации) различных типов соединительных тканей, благодаря которым кость имеет свою структуру и обладает характерной прочностью.

Стойкость органических молекул в костях оказалась решающей для понимания исторического прошлого. Костный коллаген, взятый у людей (белок в кости и кожи), использовался для радиоуглеродного датирования основных событий в истории человечества, таких как заселение Северной и Южной Америки и Юго-Восточной Европы и исчезновение групп, включая неандертальцев [36].

Большая часть нашего понимания последовательности человеческой истории до появления письменной и календарных систем основана на радиоуглеродном датировании костного коллагена, поэтому не будет преувеличением сказать, что коллаген является очень важным материалом. При этом, костный коллаген со временем разрушается, и скорость деградации во многом зависит от условий окружающей среды [37].

Количество и структура коллагена в ископаемой кости может изменяться в зависимости от условий захоронения и других факторов. Самый худший вариант – это разрушение и исчезновение коллагена после активного воздействия множества факторов окружающей среды.

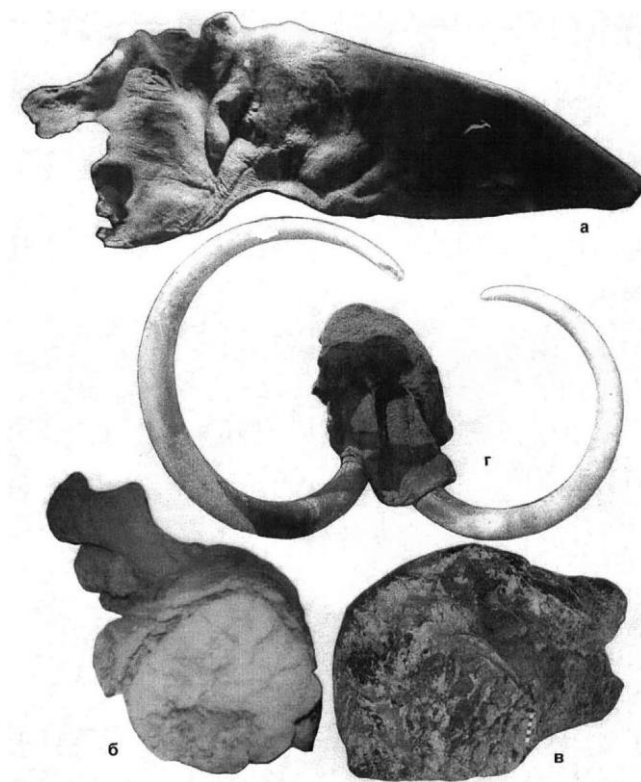
Также коллаген может сохраняться в небольшом количестве и в сильно измененном состоянии. Данное состояние в основном обуславливается местом захоронения (отложения в реках, склонах, наносах и т.д.), определяет происходящие с коллагеном разрушительные процессы и условия (нагревание, повышенная влажность, сильный ветер, наличие диких зверей рядом и др.).

Мамонтовая кость и костные фрагменты других древних животных могут

находиться в многолетнем мерзлом грунте на протяжении долгого времени. Результатом этого является сохранение костного коллагена в большом количестве и в слабо измененном состоянии (рисунки 2, 3).

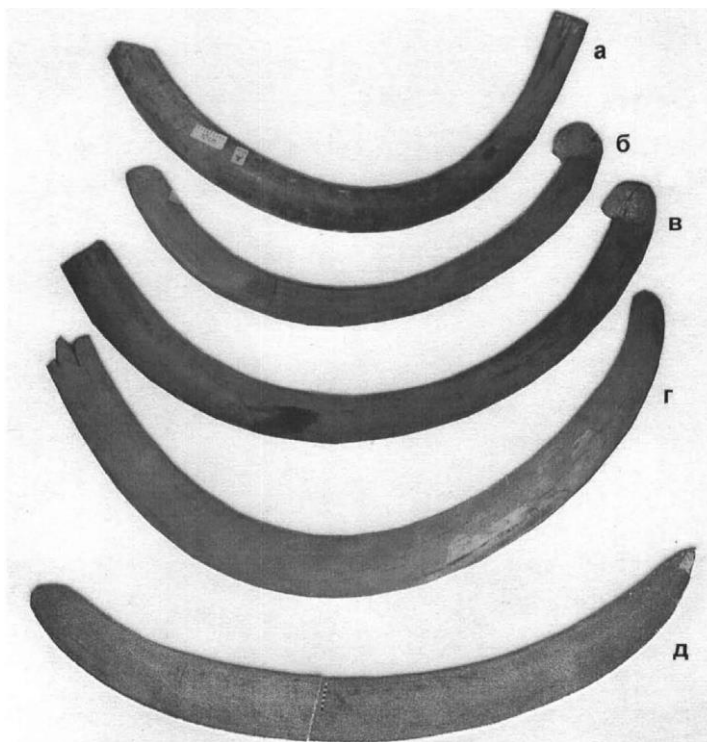
Например, кости передних конечностей, кожа, шерсть Юкагирского мамонта, часть скелета мамонта взрослого самца (возраст  $42700 \pm 1300$  лет назад) и другие находки мамонтовой фауны хорошо сохранились благодаря условиям многолетней мерзлоты [38-45].

Музеем Мамонта для проведения ряда экспериментов были предоставлены костные и другие образцы различных древних животных, в частности, Малоляховского мамонта.



**Рис. 2.** Примеры обнаруженных останков мамонтов: а) кожный фрагмент; б-в) передние конечности; г) сохранившийся череп и бивни.

Палеонтологические находки и другие древние ископаемые — это ценные и уникальные артефакты. Естественные свойства данных объектов, представляющих научную, познавательную и культурную ценность, можно сохранить, применяя научные методы для хранения, обработки и стерилизации биотканей и костных останков.



**Рис. 3.** Снимки найденных бивней мамонта.

*Исследования Малоляховского мамонта и мамонтёнка Хрома*

#### *Стерилизация объектов мамонтовой фауны*

Инфекционное заражение и присутствие различных микроорганизмов на объектах мамонтовой фауны и других палеонтологических находок ускоряет деградацию их структуры, и представляет опасность для здоровья персонала музеев, лабораторий и всех тех, кто изучает и контактирует с данными артефактами [46].

В 2008 г. был найден мамонтёнок, которого назвали Хрома (рисунок 4) по названию реки, на берегах которой он был найден (Сибирь, Российская Федерация). Возраст его останков оценивается более чем в 50 000 лет (Мамонтёнок умер в возрасте 6 – 7 месяцев). Данные останки считаются самыми древними для детеныша мамонта. Отмечалась высокая степень сохранности останков, вероятно, из-за условий многолетней мерзлоты.

В санитарных целях необходимо было инактивировать бактерии и прочие патогенные микроорганизмы, которые присутствовали на останках. Было выбрано гамма-облучение, как наиболее подходящий метод неразрушающей стерилизации,

и в 2010 году в Гренобле (Франция), замороженный мамонтонок Хрома был обработан с используемой дозой излучения в 20 кГр. Данный подход, по мнению специалистов, обеспечил условия сохранности и безопасность выставления в целях экспонирования.



**Рис. 4.** ХРОМА – замороженный экземпляр детеныша мамонта, облученный по санитарным соображениям и для сохранения (2010, Франция). (а) Отбор проб на хроматографию в камере облучения ARC-Nucleart, непосредственно перед обработкой, (б) Хрома в специальной холодильной камере, после облучения [47].

Бактериоскопическими исследованиями обнаружено наличие различных микроорганизмов на палеонтологических останках. Микробиологическое тестирование мамонтенка Хрома продемонстрировало, что он содержит древние и потенциально смертельные микробы (также было предположение о спорах сибирской язвы и патогенах, способных вызвать болезнь черных легких (пневмокоциоз угольщика)), что требует крайних мер предосторожности при транспортировке и дальнейшем анализе.

Действительно, бактерицидное действие излучения позволяет инактивировать уже присутствующие в нем микробы, ограничивая естественные механизмы распада мягких тканей, которые запускаются при оттаивании. Тем не менее, результаты экспериментов показали, что применение гамма-облучения с поглощенной дозой (20 кГр) вызвало структурные повреждения, морфологические изменения, и др., что ухудшило возможность и качество анализа такой эксклюзивной информации [47].

*Стерилизация артефактов культурного наследия*

В 2023 году были найдены грибковые колонии на мумиях из музея города Гуанахуато, по мнению специалистов, экспонирование в стеклянных кейсах недостаточно для защиты от инфекции. Случаи смертельного исхода при заражении грибами после контакта с мумиями хорошо известны, например, 10 ученых, присутствовавших на открытии гробницы короля Казимира IV в 1970-м году в Польше, умерли в течение недели в результате грибковой инфекции [48]. Кураторы выставки должны принимать более эффективные меры для правильного хранения и демонстрации мумий для обеспечения безопасности персонала, гостей выставки и всех тех людей, кто изучает и контактирует с данными объектами.

Технологии с использованием ионизирующего излучения становятся все более распространенными среди различных организаций, ответственных за работу с культурным наследием. Радиационные методы обычно используются для:

- защиты артефактов от микроорганизмов и т.д.;
- улучшения их сохранности;
- детального обследования древних ископаемых;
- улучшения свойств археологических объектов и борьбы с разрушением.

Хорошо известны случаи радиационной стерилизации культурных артефактов, например стерилизация Капсулы времени (законсервированные послания из прошлого) в Бразилии с помощью гамма-лучей. Выбранная доза облучения составляла 10 кГр [19, 20] (рисунок 5).



**Рис. 5.** "Капсула времени" подвергается противогрибковой обработке, Сан-Паулу, Бразилия.

В Национальном музее Лиссабона португальские изразцы XVIII века (Азулежу, традиционная португальская расписанная плитка; обычно глазурованная, глиняная, обожжённая и квадратной формы) были облучены для

инактивации грибков и бактерий. В дальнейшем, выбранная доза (4 кГр) оказалась слишком маленькой, так как через 6 лет повторные исследования показали рост микроорганизмов.

На Мумии Рамзеса Второго были обнаружены разнообразные грибки, а также личинки насекомых. В 1976 году, мумия перевезли во Францию для стерилизации с помощью ионизирующего излучения. После забора множества проб для тестирования и определения необходимой дозы для санитарной обработки и сохранения тканей, выбранная доза составляла 18 кГр (рисунок 6).

Радиационная стерилизация гамма-излучением (дозы 3 – 8 кГр) также была проведена для микробиологически загрязненных старинных фотографий в исследовательском центре Casacchia (Итальянское национальное агентство по новым технологиям и энергетике) для уничтожения вредителей и микрогрибов.



**Рис. 6.** Мумия Рамзеса Второго после облучения (Гренобль, Франция, 1977).

Было обнаружено, что при дозе 10 кГр стойкость фотографий, напечатанных на бумаге или чистой целлюлозе, сохраняется независимо от того, какой связующий слой (прозрачное вещество, такое как альбумин, коллодий или желатин, которое удерживает изображение) используется, что свидетельствует о целесообразности использования технологий с ионизирующим излучением.

Упомянутый ранее, обнаруженный в вечной мерзлоте Сибири, редкий образец доисторического детеныша мамонта по имени Хрома был отправлен во Францию для анализа, радиационной стерилизации от микробов и выставлен в Музее на выставке, посвященной мамонтам и их доисторическим современникам.

Таким образом, для научного изучения, долговременной и безопасной

сохранности, защиты мирового культурного наследия (хрупкий и чувствительный материал) необходима тщательная, эффективная стерилизация ископаемых объектов.

В рамках деятельности Музея мамонта Северо-Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова и создаваемого Всемирного Центра мамонта планируется безопасное и длительное хранение костных останков, что требует их предварительной обработки с целью стерилизации и консервации для дальнейшего изучения и экспонирования.

Из-за недостаточной изученности результатов влияния методов стерилизации в целях безопасности на древние ископаемые предлагается методика комбинированной стерилизации и комплекс методов для анализа воздействия озона и радиации во время процесса обработки, в ходе которой рассматривается изменения параметров кости. Мониторинг изменений качества кости осуществляется с применением современного физического оборудования. Также в работе проводились исследования биологических образцов для улучшения качества пробоподготовки. В дальнейшем планируется продолжить исследования на примере других биообъектов с использованием оборудования Всемирного центра мамонта.

## **1.2. Проблема таяния многолетней мерзлоты и опасность возникновения древних патогенов и вирусов**

Актуальной проблемой в настоящее время является опасность древних бактерий и вирусов, попадающих в окружающую среду с ископаемых биологических останков в результате оттаивания многолетних мерзлых грунтов.

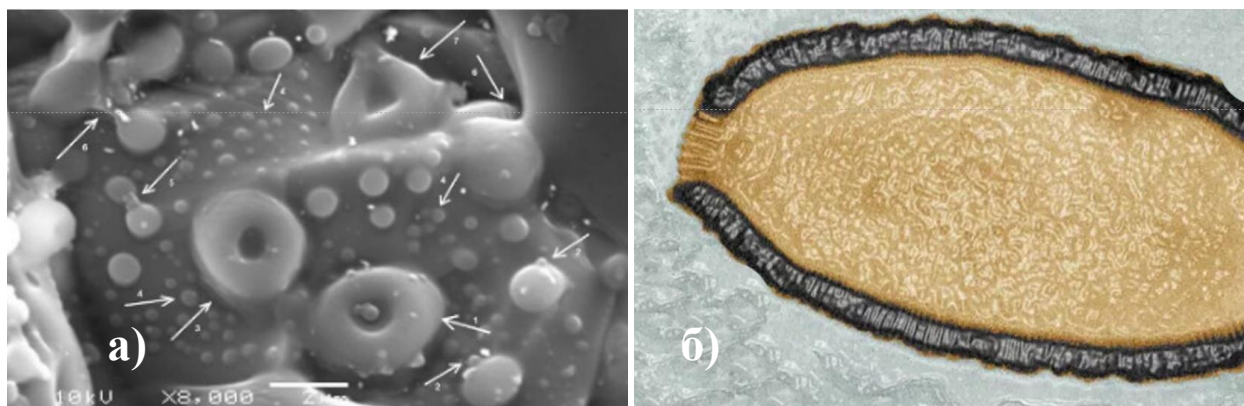
Микроорганизмы обитают в разнообразных условиях окружающей среды, и в том числе в криолитозоне и палеонтологических останках мамонтовой фауны. Например, на территории современной Якутии были обнаружены бактерии рода *Bacillus*, по известным данным насчитывается 285 захоронений скотомогильников с сибирской язвой [49-63] и т.д.



Данная проблема особенно распространена в условиях глобального потепления, берегообрушений, обнажения останков древних животных, скотомогильников, различных захоронений вследствие вспышек особо опасных заболеваний и возбудителей болезней.

В Институте геологии алмаза и благородных металлов (ИГАБМ) Сибирского отделения Российской академии наук (г. Якутск) впервые в мире обнаружили, что ранние предки криптококков (лат. *Cryptococcus*) (рисунок 7) — одноклеточных, вызывающих у людей грибковые заболевания различных органов (сердце, легкие, кожа, конечности), — развились не позднее 550 млн лет назад [14, 50].

Данные криптококки (сферические объекты диаметром не более 2 микрон) были обнаружены в минерализованном состоянии в строматолитах столбчатой формы на юго-западе Якутии, в бассейне реки Олекмы, в слоях карбонатных пород, накопившихся в вендском (эдиакарском) периоде не позднее 600-550 млн лет назад.



**Рис. 7.** а) Ранние криптококки, присутствуют споры б) Вирус возрастом 30 тысяч лет, найденный в вечной мерзлоте в Сибири.

Обнаружение древнейших грибов на территории современной Якутии объясняется тем, что Сибирская платформа представляет собой крупную геологическую структуру, где в позднем докембрии существовал огромный неглубоководный теплый морской бассейн, и где процветали цианобактерии и водоросли, которые создали строматолиты. Чтобы найти микроскопические остатки криптококка, были вырезаны тонкие пластинки из образцов строматолитов

и детально исследованы в лаборатории с помощью электронного микроскопа.

Ранее в Якутии ученые ИГАБМ СО РАН обнаружили паразитирующие на водорослях дрожжевые грибы в вендских отложениях, грибы и древнейшие грибы-сапрофиты в виде одиночных клеток, которые размножаются почкованием и делением, как и современные дрожжи. Были найдены споры дрожжей и грибы, которые проникают в клетки водорослей, подобно современным лишайникам [49]. Считается, что многие из этих микроорганизмов очень устойчивы [51-53].

Вспышка сибирской язвы в июле 2016 г. в Ямало-Ненецком округе впервые за 75 лет возникла на фоне широкомасштабной эпизоотии (распространения заболевания) среди северных оленей, в результате чего пало 2572 оленя, заболело 24 человека, один из них погиб. Причиной, как известно, исследователи назвали аномально высокие температуры июня и июля 2016 г., повлиявшие на оттаивания спор сибирской язвы из многолетних мёрзлых грунтов. При этом есть другое мнение – предпосылки для возникновения эпизоотии, затем и эпидемической вспышки в результате отмены вакцинации оленей и населения. Учеными приведены данные о количестве захоронений сибирской язвы, на территории Ямало-Ненецкого округа – более 60, в архангельской области и Республике Коми – более 100, в Якутии – более 250 захоронений.

Международная группа ученых (Институт молекулярно-клеточной биологии и генетики вместе с сотрудниками Института молекулярной клеточной биологии) изучили нематодов (круглых червей, тип первичноротых беспозвоночных животных), найденных в вечной мерзлоте в Сибири.

Результаты исследования показали, что такие особи относятся к ранее неизвестному виду. Новый вид разделяет адаптивные механизмы криптобиотического выживания с личинкой *C. elegans dauer*. Данный механизм позволил им находиться в криптобиозе более 46 000 лет [50].

Ранее в 2018 году ученые Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН обнаружили круглых червей, найденных в вечной мерзлоте, которые продемонстрировали способность восстанавливаться после долгого периода заморозки [51].

В 2021 году российские ученые выделили живых бделлоидных коловраток возрастом около 24.000 лет из многолетней мерзлоты, которые находились в состоянии анабиоза и вернулись к активной жизни после того, как окружавший их лед был растоплен [15, 52].

В последние годы в Российской Арктике среди животных наблюдается всплеск различных заболеваний (например, лептоспироз, клещевой энцефалит, бруцеллез, бешенство, туляремия, сибирская язва), многие, из которых могут передаваться человеку. Такие патогены находят в образцах ледяного керна (цилиндрические образцы, собранные с ледника) и на мумифицированных останках ископаемых животных после пребывания в вечной мерзлоте [52-63].

Данная проблема не ограничивается Арктической зоной РФ и носит глобальный характер. 10 апреля 2024 года в Казахстане талые воды затопили 8 скотомогильников и 14 захоронений животных, зараженных сибирской язвой (патоген сохраняется в почве и может заразить домашний скот).

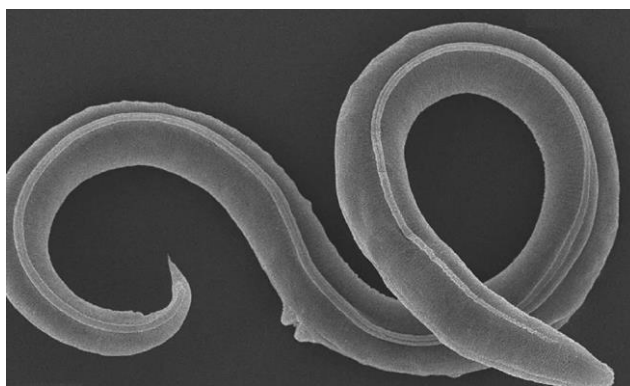
Во льдах Антарктиды и в тибетских ледниках были обнаружены ранее неизвестные бактерии, устойчивые ко многим антибиотикам [12, 64-72]. Чилийские ученые обнаружили во льдах Антарктиды бактерии, устойчивые ко многим антибиотикам, китайские ученые обнаружили ранее неизвестные бактерии в тибетских ледниках и др. [67-72]. Было обнаружено 968 уникальных видов бактерий, 98% из которых никогда ранее не встречались (взяты образцы снега и льда с 21 ледника за 2010-2016 годы). Некоторые из этих бактерий и вирусов могут передаваться животным и людям, а таяние снега и льда из-за изменения климата может привести к попаданию с водой в реки и ручьи, которые являются пресноводными и источниками питьевой воды для людей и животных, в густонаселенные районы Китая и Индии [12, 69].

Таким образом, проблема таяния льдов и опасность возникновения древних патогенов и вирусов становится все более актуальной не только в России, но и в мире.

Данные примеры появления микроорганизмов, которые вызывают

различные виды заболеваний у людей, животных и растений, указывает не только на необходимость поиска и их изучения с целью получения новых знаний о механизмах их появления, полезных для прогнозирования возможных случаев эпидемий, но и на обеспечение условий работы при потенциальной опасности древних бактерий и вирусов, попадающих в окружающую среду в результате оттаивания «вечной» мерзлоты (рисунок 8).

Экспериментальные данные многих исследований последних лет показывают, что не только вирусы и бактерии, но и «высокоорганизованные» организмы как нематоды могут оставаться жизнеспособными в течение длительного периода времени (например, более 46000 лет) в состоянии анабиоза в мерзлоте [15].



**Рис. 8.** Извлеченные из многолетней мерзлоты нематоды.

Обеспечение условий безопасности и эффективной работы с находками мамонтовой фауны заключается в их надежной стерилизации в контексте решения проблемы опасности патогенов и наличия микроорганизмов, что является важной и актуальной задачей.

### **1.3. Методы стерилизации**

#### ***Существующие методы стерилизации костных материалов***

Выбор эффективных и адекватных методик стерилизации напрямую зависит от особенностей стерилизуемого материала и объекта исследования [16]. Эффективность стерилизационных мероприятий и качество подобных процедур

зависит от технологии обработки, вида аппаратуры и упаковок для стерилизации. Обработка материалов осуществляется по определенным установкам и режимам, которые указаны в руководстве по эксплуатации соответствующей модели стерилизатора и в инструкции по применению определенного стерилизующего средства.

В России задачи стерилизации костных материалов регулируются установленными стандартами, которые соответствуют положению ISO 11137-3. Вероятность присутствия жизнеспособных микроорганизмов в обработанных костных материалах составляет  $10^{-6}$  по данному стандарту [73].

**Термический метод стерилизации.** Термическая обработка (таблица 3) использует неустойчивость микроорганизмов к высоким температурам для предотвращения их роста и жизнедеятельности. Основные параметры эффективности данного способа стерилизации – это величина температуры и продолжительность процесса. Одно из наиболее распространенных форм подобной технологии является использование пара [16].

**Таблица 3.** Преимущества и недостатки термического метода стерилизации.

<b>Преимущества:</b>	<b>Недостатки:</b>
Наиболее распространенный метод контроля роста микроорганизмов	Вероятностная - не абсолютная стерилизация
Очень эффективен в уничтожении нежелательных микробов	Может разрушать термически нестабильные среды
Низкая стоимость	

Также в автоклавах стерилизация осуществляется потоком горячего влажного пара под давлением. В жарочных шкафах – потоком горячего и сухого воздуха.

**Влажное тепло.** Основные параметры эффективности обработкой влажным теплом являются температура и продолжительность процесса нагрева, а также правильный выбор их оптимальных значений. При этом, также можно отметить параметр давления, так как нужная температура в некоторых случаях достигается при увеличении давления. Рекомендуемые минимальные параметры воздействия:

- обработка на протяжении 15 мин. при температуре 121 градусов по

Цельсию.

- обработка (10 мин.) при температуре 126 градусов по Цельсию.
- обработка (3 мин.) при температуре до 134 градусов по Цельсию.

Данный стандарт соответствует международному стандарту ISO/TS 17665-2:2009 "Стерилизация медицинской продукции. Влажное тепло. Часть 2. Руководство по применению ИСО 17665-1" ("ISO/TS 17665-2:2009 "Sterilization of health care products – Moist heat – Part 2: Guidance on the application of ISO 17665-1") [74].

Однако, высокотемпературный метод, характеризующийся длительным процессом нагрева, негативно влияет на биобъекты. Например, результатом данной обработки является деформация материала, денатурации белка, нарушение внутренней структуры и т.д. Данный метод стерилизации рекомендуется в основном для изделий из металла, резины и стекла.

Для стерилизации костных тканей был предложен метод автоклавирования (обработка в течение 30 мин. при температуре 134 градусов по Цельсию), но существует ряд исследований, которые показывают, что при использовании технологии автоклавирования, механическая устойчивость костного материала (к нагрузкам и сжатию) снижается почти на 70% [75].

**Метод стерилизации сухим теплом.** Обычно данный процесс стерилизации происходит в специальных сухожаровых шкафах-стерилизаторах. Стерилизатор со статическим воздухом называется стерилизатором печного типа.

Преимущества стерилизации сухим теплом заключаются в том, что данный метод нетоксичен, не наносит вреда самому материалу и окружающей среде, проникает в материалы и не вызывает коррозии в металлических устройствах и инструментах.

К недостаткам метода сухого нагрева можно отнести медленную скорость проникновения тепла, трудоемкость, высокие температуры (например, большинство пластмасс не могут выдерживать стандартные для стерилизации значения температуры) и более длительное время воздействия по сравнению со стерилизацией паром. Рекомендуемые минимальные параметры воздействия.

- обработка в течение 2 часов при температуре 160 град. [76]
- в течение 1 часа при температуре 170 град.
- в течение 6-12 мин. при температуре 190 град.

Температура, время обработки и другие параметры процесса определяются для каждого типа стерилизуемого материала, а также для количества и конфигурации загрузки в камеру автоклава. Перед обработкой материал должен быть сухим, так как вода может помешать процессу. Для термостойких материалов можно использовать более высокие температуры и более короткое время.

Сухое нагревание обычно считается непригодным для чувствительных материалов, пластмасс из-за низких теплопередающих свойств самого материала и сложности в создании условий, обеспечивающих воздействие необходимой температуры на все части материала при адекватном времени обработки. Стандартом, определяющим требования к стерилизации сухим теплом, является ISO 20857.16. [76]

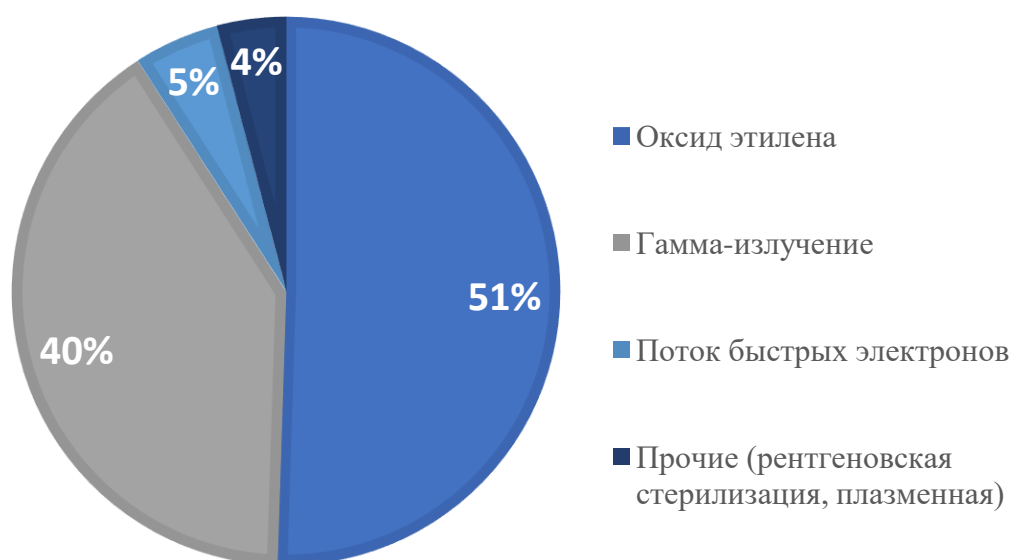
Стерилизация сухим теплом осуществляется за счет теплопроводности (кондукция). Тепло поглощается внешней поверхностью материала и передается внутрь к следующему слою по всему материалу до достижения заданной температуры. Сухое тепло убивает микроорганизмы, окисляя молекулы, при этом основные клеточные компоненты разрушаются. Температура поддерживается практически в течение часа, чтобы уничтожить наиболее устойчивые споры.

Для контроля процесса обычно используют споры *Bacillus subtilis* или *Bacillus atrophaeus*, так как они более устойчивы к сухому нагреву, чем споры *Bacillus stearothermophilus*.

Большинство костных материалов либо разрушаются при длительной стерилизации сухим нагревом, либо деформируются (температуры термической деформации приведены выше). Метод стерилизации сухим теплом может вызвать высыхание и даже сжигание клеток. Данная технология в основном рекомендуется для металлических и стеклянных (термостойких) предметов.

## Химическая стерилизация

**Использование окиси этилена.** Данный метод признан универсальным и одним из самых древних и наиболее распространённых низкотемпературных методов стерилизации в мире. Окись этилена (органическое химическое гетероциклическое вещество,  $C_2H_4O$ ) – сжатый сжиженный газ, представляющий собой прозрачную и бесцветную жидкость. Газ обладает широким спектром действия (включая спороцидное), проникающая способность газа обеспечивает уничтожение микроорганизмов. При стерилизации величина уровня остаточного количества оксида этилена на исследуемом материале не должна превышать установленное значение (ГОСТ ISO 10993-7-2016) [77].



**Рис. 9.** Анализ мирового рынка стерилизации.

**Раствор формальдегида.** Водный раствор (35 – 40%) формальдегида или формалин содержит примеси метилового спирта и муравьиной кислоты для стабилизации раствора. Стерилизация формальдегидом осуществляется за счет его взаимодействия с белком протоплазмы клеток, далее происходит свертывание и гибель клеток. Рекомендуемые параметры воздействия: обработка при влажности (75 – 100 %), температуре (60 – 80 %) градусов по Цельсию и при отрицательном давлении. Время воздействия и стоимость стерилизации формальдегидом гораздо меньше, чем при стерилизации окисью этилена.



**Пары перекиси водорода.** Стерилизация парами перекиси водорода – низкотемпературный процесс низкого давления, с температурой от 6°C до 60°C, с использованием пар перекиси водорода для снижения наличия микроорганизмов. К достоинствам данного метода можно отнести: низкую температуру; быстрое время цикла (30-45 минут); экологически безопасные побочные продукты ( $H_2O$ , кислород [ $O_2$ ]); простоту при эксплуатации; простоту при мониторинге.

При этом, существуют ограничения, связанные с этим методом, например, он не подходит для ряда материалов. Например, нейлон становится хрупким, целлюлоза не поддается обработке и т.д. Проникающая способность у паров перекиси водорода ниже, чем у окиси этилена. Было продемонстрировано, что углекислый газ в сверхкритических условиях способен инактивировать вегетативные формы как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Введение таких добавок, как перекись водорода или этанол, приводит к успешной инактивации бактериальных эндоспор, поэтому данные технологии часто применяются несмотря на свою токсичность.

Следует отметить, что существуют и развиваются и другие методы стерилизации, использующие такие факторы воздействия, как, например, ИК и микроволновое излучение, озоновое и криовоздействие. Эффективной альтернативой перечисленным методам является радиационная стерилизация.

#### **1.4. Радиационные методы стерилизации**

Среди большого разнообразия методов, используемых для исследования, анализа, характеристики, сохранения и консервации объектов мамонтовой фауны и артефактов культурного наследия, многие из них основаны на использовании ионизирующего излучения.

В том числе, стерилизация с помощью радиации считается наиболее подходящим методом обработки биообъектов из-за высокой проникающей способности и своей эффективности [78, 79].

Если проанализировать мировой рынок стерилизации в промышленности,

то обработка оксидом этилена несмотря на высокую токсичность и известные негативные побочные эффекты до сих пор стоит на первом месте и занимает 51%. Однако, все более значительное место занимают перспективные радиационные методы. Распространены установки, использующие гамма-излучение (40,5%). Около 4,5% рынка приходится на стерилизацию быстрыми электронами.

При этом гамма-излучению присущи определенные недостатки. Например, возможен длительный период процесса облучения, проблема фиксирования конечной поглощённой дозы, падающей на объект. Также при гамма-стерилизации обычно используются источники, которые излучают постоянно и требуют обеспечения постоянной радиационной защиты [80].

**Гамма-излучение.** В настоящее время для различных применений, включая радиационную стерилизацию, обеззараживание и модификацию материалов преобладают комплексы, основанные на источниках гамма-излучения [81].

В процессе гамма-облучения используется источник кобальт-60 ( $^{60}_{27}\text{Co}$ ) для инактивации микроорганизмов на множестве различных материалов в специально сконструированной камере. Кобальт-60 (синтетический изотоп кобальта) представляет собой радиоактивный нуклид химического элемента кобальта с массовым числом 60 и атомным номером 27 с периодом полураспада  $\sim 5,27$  лет.

Ключевой характеристикой гамма-облучения является высокая проникающая способность, позволяющая доставлять дозу облучения в труднодоступные области продуктов, плотность которых может быть выше.

Доставка и поглощение дозы объектом определяется плотностью объекта, мощностью дозы, временем воздействия, конструкцией установки и размером упаковки. Гамма-излучение обеспечивает хорошее проникновение в плотные продукты и подходит для многих типов материалов и их упаковок [82].

В качестве постоянно развивающейся и совершенствующейся альтернативы гамма-излучению используются пучки ускоренных электронов.

**Стерилизация с помощью ускорительной техники.** Стерилизация с использованием ускорителя электронов – это форма радиационной стерилизации, при которой бета-частицы используются для уничтожения микробов.

Интенсивность пучка заряженных частиц от ускорителя может быть значительно выше, чем у гамма-источника [79, 80].

Установки сканируют материалы сфокусированными электронами (бета-частицами) для их стерилизации. Проникновение электронного пучка в материал ограничивается ионизационными потерями энергии в материале ( $-\frac{dE}{dx}$ ).

Стерилизация быстрыми электронами набирает популярность в медицине с момента разработки метода в 1960-х годах благодаря своей скорости, безопасности и незначительным выбросам.

Для санитарных целей обычно применяются: высокоэнергетические ускорители (обладает высокой проникающей способностью,  $E = 5-10$  МэВ), среднеэнергетические ( $E = 1-5$  МэВ) и низкоэнергетические ускорители ( $E = 400 - 700$  кэВ). Высокоэнергетические ускорители электронов имеют широкий диапазон облучения (например, 50 см при  $E = 10$  МэВ при двухстороннем облучении, ширина пучка может достигать 1,8 м).

Существуют различные виды ускорителей электронов: линейные, высоковольтные, микротроны и бетатроны [80, 81].

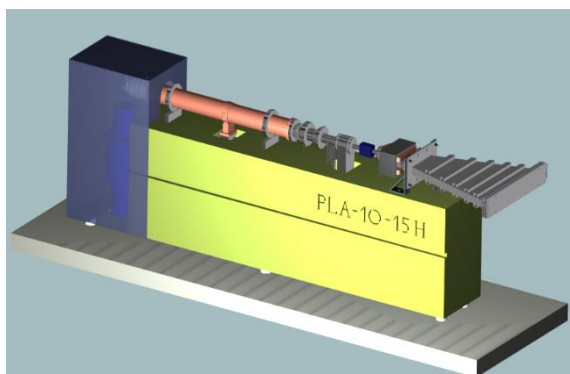
Линейные ускорители электронов более распространенные, чем протонные линейные ускорители. Они используются в научных исследованиях, в промышленности (таблица 4) (где энергия обычно колеблется от 100 кэВ до 50 МэВ), в медицине (при диагностике и лучевой терапии) и т.д. (рисунки 10, 11).

**Таблица 4.** Характеристики основных промышленных ускорителей электронов.

Название	Производитель	Энергия	Максимальная мощность пучка	Тип ускорителя
Dynamitron	IBA Industrial	0.5–5 МэВ	50 – 200 кВт	Высоковольтный тип
Mevex High power	Mevex	10 МэВ	30 кВт	Импульсный тип
Rhodotron	IBA Industrial	1–10 МэВ	10 – 560 кВт	Импульсный тип

Современные линейные ускорители в основном работают на принципе

бегущей волны. Например, ускоритель электронов, построенный в Национальной ускорительной лаборатории SLAC (Центр Стэнфордского линейного ускорителя, США) [80].



**Рис. 10.** Линейный ускоритель на энергию 10 МэВ.



**Рис. 11.** Линейный ускоритель на энергию 1.2 МэВ.

### **Применение радиационных технологий для стерилизации в медицине.**

На сегодняшний день, потребность в пластическом материале для реконструктивно-восстановительных операций значительно возросла. Данная тенденция объясняется увеличением количества проводимых процедур (костная

пластика), высоким уровнем заболеваний опорно-двигательного аппарата, производственного травматизма, последствием военных ранений и т.д. [16, 83].

Также, например, перенесенный коронавирус вызывает хрупкость костей (из-за снижения усвояемости кальция и его доставки к костям). Резко возросла частота возникновения асептического некроза после COVID-19, и количество операций эндопротезирования. И при всем при этом, существует хроническая нехватка аллотрансплантатов для лечения тканевой недостаточности. Для решения этой проблемы установлены факторы, определяющие эффективность изготовления биоимплантатов, их стерилизации и хранения [83, 84].

По данным Всемирной организации здравоохранения около 2-ух миллиардов человек в мире страдают от болезней костно-мышечной системы. Количество операций по костной пластике только возрастает [83]. По данным Минздрава в России ежегодно проводится около 5 миллионов операций на опорно-двигательном аппарате, и почти в половине из них используются костные трансплантаты. При этом, имплантат должен удовлетворять определенным требованиям, и, в первую очередь, это высокий уровень безопасности, исключающий возможность попадания инфекции. Среди всех технологий стерилизации костных имплантатов, как уже отмечалось выше, наиболее широкое применение получил радиационный способ обработки костных фрагментов потоком гамма-квантов.

Определяющим параметром является величина поглощенной дозы. Доза, установленная МАГАТЭ для стерилизации костных имплантатов – 25 кГр. При этом, при использовании такой стандартной дозы в 25 кГр в костном материале возникают негативные побочные эффекты. (потеря остеокондуктивных свойств биоимпланта, инактивация морфогенетических белков и т.д). Трансплантология имеет несколько направлений и имплантаты делятся на биологические и искусственные.

В Российской Федерации существует сеть различных тканевых банков, в которых происходит изготовление и стерилизация костных имплантатов. Банки тканей должны обеспечивать безопасность реципиента, достигать требуемого

уровня стерильности и создавать условия для исключения возможности передачи инфекции пациенту [84].

Стерильность является важнейшим показателем качества любого имплантируемого медицинского изделия, определяющим безопасность его использования при проведении реконструктивно-восстановительных оперативных вмешательств. Для снижения риска заражения необходимо сочетание асептических методов и выбора эффективных методов стерилизации, совместимых с медицинским изделием. Отсутствие эталонной процедуры стерилизации, обеспечивающей эффективность и безопасность материала, влияет, в том числе, и на биокаркасы нового поколения, которые распространены на мировом рынке.

Традиционные методы стерилизации (стерилизация паром/теплом, этиленоксидом и гамма-стерилизацией) несовместимы с большинством полимерных биоматериалов из-за возникновения физико-химических изменений после воздействия стерилизации.

Радиационные технологии также используют для стерилизации научных артефактов и объектов мамонтовой фауны. Например, данный метод применялся для обработки мамонтенка Хрома, который был обнаружен охотником в тающей вечной мерзлоте на берегу реки Хрома примерно в 2000 километрах (1300 миль) к северу от Якутска, недалеко от Северного Ледовитого океана.

Замороженный мамонтенок Хрома (установлен возраст более 30,000 лет), заключенный в изолированный контейнер, был направлен в лабораторию в Гренобле, которая специализируется на стерилизации гамма-излучением, но до этого случая не имевшая опыта работы с ископаемыми биообъектами. Тот же метод использовался и на других доисторических и археологических объектах, в том числе, гамма-облучение мумии Рамзеса II (возраст менее 1800 лет) в 1977 году, которая была заражена грибком.

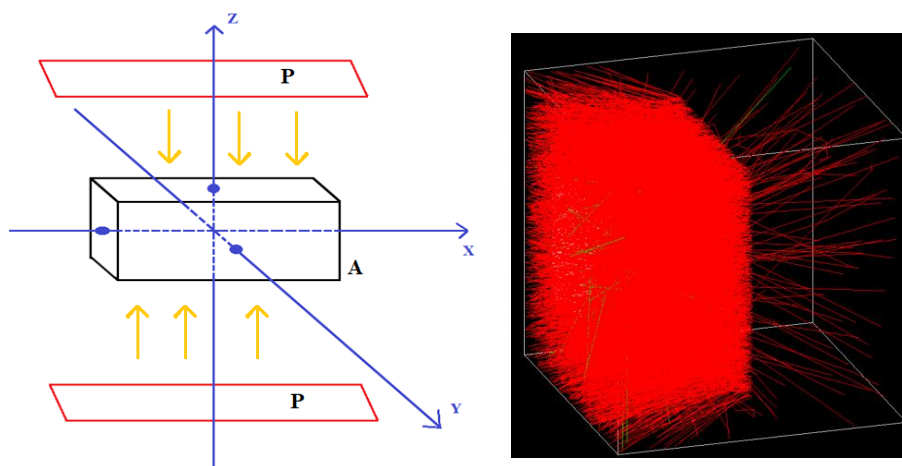
### **1.5. Моделирование процесса стерилизации**

При наличии целого ряда преимуществ использование радиационных

технологий при стерилизации биообъектов связано и с опасностью негативных последствий. Причем все они (изменение структуры костной ткани, ее морфомеханических и других свойств и характеристик [21-24, 83, 87-94]) имеют выраженный дозозависимый характер. В связи с этим важно правильно планировать и контролировать величину поглощенной дозы при радиационном воздействии. Однако прямые инструментальные и расчетные методы не всегда могут обеспечить полную картину. При этом важное значение приобретает использование модельных подходов.

Моделирование взаимодействия излучения с веществом имеет приложения во многих направлениях научных исследований. В работе были использованы ранее полученные результаты на программном комплексе GEANT4 для моделирования прохождения частиц через вещество методом Монте-Карло коллективом авторов [85].

Модель позволяет получать оценки глубинного распределения дозы в костном материале с учетом конкретных параметров процесса радиационного воздействия. Для получения количественной оценки равномерности распределения дозы в костном образце использовалась величина коэффициента неравномерности, определяемого как отношение максимальной поглощенной дозы к минимальной.



**Рис. 12.** Схема моделируемой установки: P – источники, A – облучаемый образец,  
b) Визуализация моделируемого объекта

Моделирование процесса радиационной стерилизации может служить полезным инструментом при планировании оптимального излучения для

корректировки технологий воздействия, энергетических параметров процессов радиационного излучения, позволяет получать оптимальное распределение дозы в костном образце. Численное моделирование позволяет получать оценки глубинного распределения дозы в костном материале с учетом определенных параметров процесса радиационного воздействия, а также выработать рекомендации по его оптимизации.

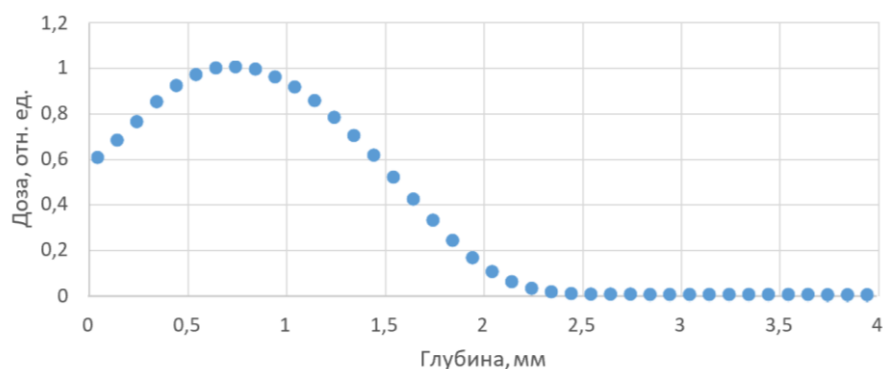
Полученные результаты могут быть полезны при создании эффективного метода обработки биологических образцов древних животных с минимально возможными изменениями их структуры, свойств и характеристик, установить оптимальные параметры процесса стерилизации образцов.

В рамках математической модели рассчитано пространственное распределение поглощенной дозы для образцов различной толщины (1 мм, 4 – 10 мм). Расстояние от источника до образца в качестве начального условия при моделировании задано 15 см. При расчетах для количественной оценки равномерности распределения дозы в костном образце использовалось значение коэффициента неоднородности, которое определяется как отношение максимальной поглощенной дозы к минимальной:

$$K = \frac{D_{min}}{D_{max}} - \text{коэффициент однородности облучения (1)}$$

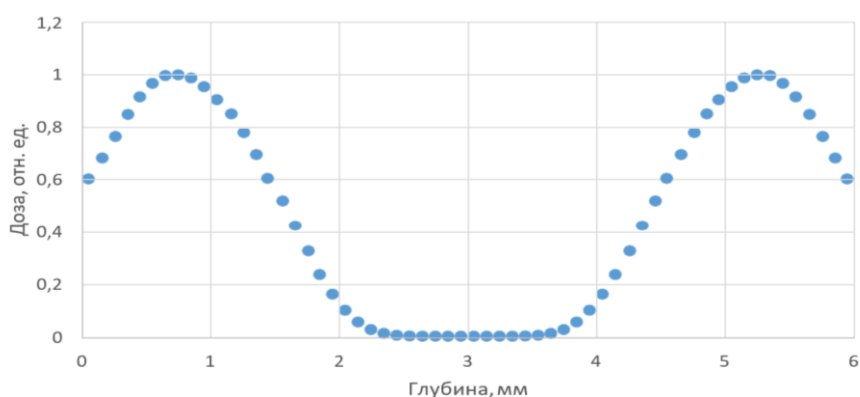
То есть, когда разница между дозами, поглощенными в разных частях материала, не превышает 10 – 15% от общего облучения, это называется равномерным облучением, а когда разница превышает эту величину, это называется неравномерным облучением [85]. Если коэффициент неоднородности мал, то основные патологические признаки поражения, характерные для равномерного облучения, сохраняются. При этом тот же эффект возникает даже при дозах, которые при неравномерном облучении выше, чем при равномерном.





**Рис. 13.** Распределение дозы по глубине (в относительных единицах) для образца кости толщиной 4 мм, облученного с одной стороны

При одинаковой средней дозе, поглощенной тканями, тяжесть поражения в случае неравномерного распределения значительно ниже, чем при равномерном облучении. Графики распределения дозы при облучении с одной стороны образца толщиной 4 мм и при облучении с противоположной стороны приведены ниже (рисунки 13, 14).



**Рис. 14.** Распределение дозы по глубине (относительные единицы) для образца кости толщиной 6 мм при облучении с двух сторон

Были определены коэффициенты неравномерности (при облучении электронами с одной стороны и с противоположной стороны) (таблица 5).

**Таблица 5.** Значения коэффициента неравномерности при облучении с одной и с противоположных сторон.

Толщина, мм	$k(1) = \frac{D_{max}}{D_{min}}$	$K(2) = \frac{D_{max}}{D_{min}}$
4	86,813	5,668
5	94,438	43,096

6	108,696	53,215
7	126,63	64,564
8	140,5481	66,12
9	149,8352	86,362
10	149,9475	87,155

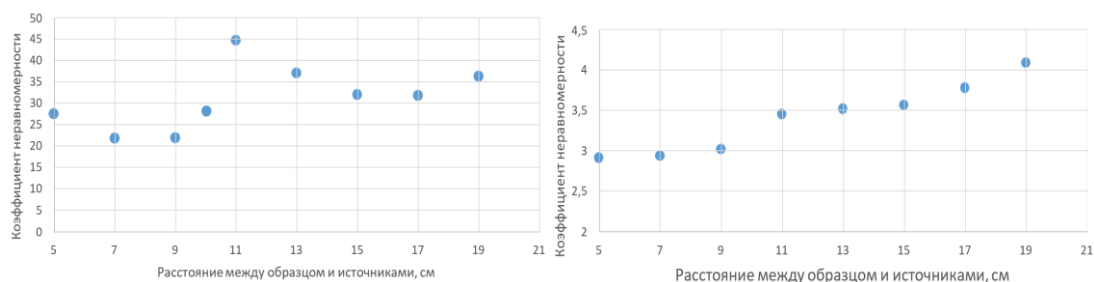
- $k^{(1)}$  – коэффициент неравномерности для одностороннего облучения,
  - $K^{(2)}$  – при облучении с противоположных сторон,
  - $D_{max}$  – максимальная поглощенная доза,
  - $D_{min}$  – минимальная поглощенная доза

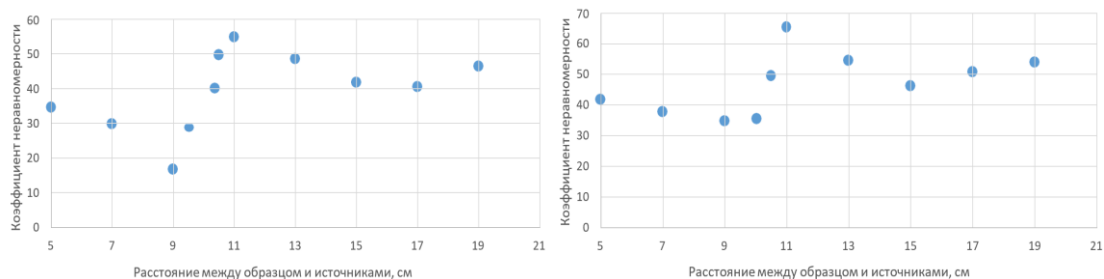
Облучение с разных сторон костных фрагментов приводит к большей однородности. Следовательно, образец следует поворачивать или облучать с двух сторон для получения более равномерного распределения.

При высокоскоростном электронном облучении равномерность достигается при значениях, меньших толщины образца, из-за низкой пропускающей способности электронов. Расчеты проводились для образцов кости толщиной 4 мм, 6 мм, 8 мм, 10 мм [85].

**Зависимость распределения поглощенной дозы от расстояния между источником и объектом.** Была рассчитана зависимость коэффициента неоднородности от расстояния источник-объект (рис. 15 а-г). Костные образцы облучались при энергии 1 МэВ. При такой энергии однородность достигается на расстоянии менее 9 см для костных фрагментов толщиной 4 мм.

Для фрагментов с толщиной 6, 8, 10 мм требуемая однородность в этих условиях не достигается (рисунок 15).





**Рис. 15** (а – г). График зависимости коэффициента неравномерности  $K$  от расстояния между источником и образцом: а) 4 мм; б) 6 мм; в) 8 мм; г) 10 мм.

Дальнейшие расчеты показывают, что наиболее подходящее расстояние между образцом и источником света составляет 9 см при толщине 4 мм ( $K = 3,02$ ), 7 см при 6 мм ( $K = 21,84$ ), 9 см при 8 мм ( $K = 16,86$ ) и 10 см при 10 мм ( $K = 35,31$ ) [85].

Таким образом, по полученным расчетам, установленные режимы и условия процесса радиационной стерилизации [85,86] являются наиболее оптимальными и выгодными для применения. Расчеты и полученная математическая модель, были использованы в дальнейшем для выработки рекомендаций по совершенствованию технологий комбинированной радиационной обработки материалов и изделий (в том числе и в настоящей работе).

### **1.6. Сложности, ограничения и побочные эффекты, связанные с радиационной стерилизацией**

В целом ряде работ различных авторов, как уже отмечалось выше, по мере возрастания дозы, начиная с 15 кГр, было отмечено значительное нарушение структуры и функции тканей [21-24, 87-93].

При всех значительных преимуществах метода радиационной стерилизации, известно, что радиация может привести к значительному снижению физико-механических показателей и существенным изменениям морфологии облучаемого объекта. Структура костных материалов значительно меняется, начиная с дозы в 15 кГр [22-24, 87-93].

В том числе, радиационная обработка с высокой дозовой нагрузкой может негативно влиять на экспонаты и объекты мамонтовой фауны, это особенно важно в контексте получения важной информации и проведения экспериментов. Например, образцы мамонтенка Хромы были собраны до и после облучения и как утверждали сами исследователи, гамма-облучение действительно сильно воздействует на древнюю ДНК. Специалисты высказали предположение, что случайная единичная ошибка в последовательности ДНК, вызванная облучением, могла повлиять на результаты дальнейших исследования [47].

**Проблема стерилизации объектов культурного наследия.** Физическая целостность и внешний вид объектов культурного наследия – не единственные характеристики, которые необходимо учитывать. Артефакты наследия также являются источниками информации, причем некоторые из них доступны не путем наблюдения, а только путем инструментального анализа. Такие аналитические исследования включают в себя очень широкий спектр методов, от химического до физического и биологического анализа.

Сохранившийся ткани в мерзлоте являются уникальными объектами исследования. Исследования костного коллагена у шерстистых мамонтов плейстоцена позволяют расширить знания и данные об экосистеме, географии и климате того периода. Например, при изучении коллагена были идентифицированы древние белки с использованием тканей мамонта, некоторые пептиды, относящиеся к среде обитания животных и др. [94, 95] Был проведен количественный аминокислотный анализ тканей найденных детенышей мамонтов, который показал, что коллагеновый белок (типа I и типа III) избирательно сохраняется в определенных тканях в качестве основного белка. Таким образом, тройная спиральная молекула коллагена сохраняется в мягких тканях замороженных мамонтов в течение более чем 40 000 лет.

Проблема радиационной стойкости коллагена, основного компонента кости, в медицине была рассмотрена с точки зрения тканевых трансплантатов. Исследования показали, что доза в 25 кГр является приемлемой с медицинской точки зрения. Можно было предположить, что доза, необходимая для избавления

от насекомых или даже плесени и грибка, не окажет существенного влияния на механические свойства исторических объектов.

Исследования влияния радиации на коллаген были проведены в связи необходимостью ликвидации инфекции сибирской язвы при сохранении шкур животных еще в 60-х годах. Далее, в связи с широким использованием коллагена в медицине возникла необходимость стерилизации ряда объектов (искусственные артерии и клапаны сердца, трансплантаты), что стимулировало исследования по модификации параметров облучения. Было подтверждено, что побочные эффекты зависят от дозы.

Существует обстоятельный обзор о деградации кожи при радиационном консервировании [89]. Авторы исследовали влияние гамма-излучения на механические свойства пергамента при дозе 36 кГр. Работа содержит обзор основной литературы по радиационной консервации исторических предметов, изготовленных из кожи. Результаты стерилизации мамонтенка Хромы также стали основой при выработке рекомендацией для использования лучевых методов при сохранении кожных покровов [20, 47].

Анализ проведенных экспериментов по исследованию мамонтенка Хрома после облучения показали, что применение гамма-лучей с поглощенной дозой (20 кГр) могло вызвать структурные изменения, что привело к снижению качества информации [47].

Прежде чем приступить к облучению, необходимо определить, может ли быть затронута такого рода информация. Гамма-облучение не изменит результаты радиометрического датирования с использованием  $^{14}\text{C}$  или других природных радиоактивных изотопов, поскольку оно не может вызвать искусственную радиоактивность, даже в следах. С другой стороны, термолюминесцентное датирование будет невозможно после облучения, поскольку оно напрямую использует естественную дозу поглощенного излучения из окружающей среды, которая, конечно, будет резко изменена гамма-обработкой. ДНК – еще один очень важный источник информации, который становится все более доступным с момента развития анализа ДНК с использованием ПЦР-амплификации. Поскольку

биоцидный эффект обусловлен непосредственно повреждением, индуцированным ДНК, можно предположить, что облучение будет широко влиять на информацию ДНК. Однако, опять же, это следует рассматривать как вопрос дозы.

Что касается древней ДНК, которая характеризуется своим низким качеством, и измененной окружающей среды, с наличием или отсутствием свободной воды, никакого исследования эффекта облучения представлено ранее не было. Длина доступных последовательностей в древней ДНК редко превышает несколько сотен пар оснований, и количество посмертных мутаций со временем увеличивается. Это два фактора, которые должны привести к значительному количеству ошибок из-за облучения в дозах биоцидов.

### **1.7. Технологии комбинированной стерилизации**

Комбинированные методы стерилизации – это методы дезинфекции с использованием двух (или более) стерилизаторов. Комбинированная методика обработки важна, в частности, при стерилизации имплантатов для проведения реконструктивно-восстановительных операций костных тканей, лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата, эндопротезирования в последствии военных конфликтов, производственного травматизма и др.

Для улучшения эффективности и расширения возможностей радиационной обработки были предложены различные комбинированные методики. Помимо исследования воздействия радиации на костные образцы [87-89], при которой облучаемая кортикальная кость стала хрупкой, проводились исследования воздействия комбинированного влияния радиационной (использованная доза 25 кГр) стерилизации вместе с:

- 1) термообработкой;
- 2) сушкой;
- 3) заморозкой.

В результатах был выявлен ряд негативных эффектов, например, возникновение микротрещин, снижение упругости, предельной деформации и др.

[90, 91]. Была установлена связь между механическими свойствами костных трансплантатов и процессом повреждения структуры коллагена во время облучения [92-94]. Стоит отметить, данные комбинированные методики, например, термообработка в свою очередь сами влияют на физические параметры объектов [90, 96].

В связи с этим, для успешной комбинированной методики необходимо изучить именно селективное воздействие предлагаемого метода (в работе используется озонная обработка) на исследуемый объект.

Для того, чтобы сохранить свойства материала, в том числе костной ткани, коллективом авторов (МГУ имени М.В. Ломоносова, ВИЛАР) была разработана технология комбинированной радиационной обработки. Метод комбинированной радиационной обработки основан на использовании озono-кислородной смеси на первом этапе стерилизации и радиационного облучения ускоренными электронами на втором этапе.

Данный метод позволяет достичь необходимой степени стерильности костных образцов при величине поглощенной дозы в 12 кГр с сохранением основных характеристик костной ткани [26, 97].

Вместе с тем, в предыдущем цикле исследований не изучено селективное влияния озона и его последствия, не был изучен ряд физических, морфологических, механических характеристик и других вопросов, связанных с селективным озонным воздействием на свойства и характеристики костного материала и его комбинации с радиационным облучением [26, 98, 99, 100].

Таким образом, комбинированная стерилизация является эффективным методом обработки, однако до сих пор не было исследовано селективное действие озона, а также его сочетанное воздействие с радиацией. В этом и состоит одна из задач данной работы.

**Особенности озонной стерилизации.** Бактерицидные свойства озона как природного окислителя использовались для обработки операционных еще в 19 веке. Голландский химик Ван Марум, по мнению экспертов, был первым человеком, который обнаружил газ озон [101].

Однако научное открытие озона и исследование его свойств (механизмы реакции озона) было произведено Шёнбейном в 1840 году (Мюнхенский университет). Во время эксперимента, он заметил характерный запах, который ранее пытался идентифицировать Ван Марум. Он назвал этот газ «озоном» (греческое слово, обозначающее аромат).

Озон в природе образуется во время грозы в воздухе, при окислении смолы хвойных деревьев (из молекулярного кислорода  $O_2$  при электрическом разряде), в верхних слоях атмосферы под действием ультрафиолетового излучения от Солнца.

Первый генератор озона был изготовлен фирмой Фон Сименс (Берлин, Германия), первая компания по производству озоновых установок была создана французским химиком Мариусом Полем Отто.

В начале озон стали использовать для стерилизации питьевой воды, что привело к исследованию механизма дезинфекции озоном. Первая станция озоновой водоподготовки была введена в эксплуатацию в 1860 году в Монако, а уже в 1896 г. Никола Тесла запатентовал и через десять лет запустил промышленный выпуск генераторов озона для медицинских приложений.

На сегодняшний день, для дезинфекции воды хлор используется пока еще больше, чем озон. Однако, в последнее десятилетие применение озона снова начало увеличиваться [102]. Это вызвано открытием в 1973 году тригалометанов (ТГМ) как вредного побочного продукта дезинфекции хлором. Впоследствии ученые начали искать альтернативные дезинфицирующие средства.

Еще одной проблемой стало увеличение содержания в поверхностных водах мешающих, трудно удаляемых органических микрозагрязнителей. Оказалось, что эти соединения окисляются озоном быстрее, чем хлором и соединениями хлора.

Более того, оказалось, что озон дезактивирует даже те микроорганизмы, у которых развивается устойчивость к дезинфицирующим средствам, например, криптоспоридии. Примечательно, что озон может убивать патогены даже в споровой форме (что не всегда удается с помощью радиации).

Озоновая стерилизация обладает целым рядом преимуществ:

- низкотемпературный режим работы и возможность стерилизации



биообъектов;

- короткая экспозиция;
- глубокое проникновение;
- озон не токсичен и безопасен для окружающей среды (озон распадается, не оставляя канцерогенных соединений).
- стерилизация больших объёмов;

Постоянный поиск технологий низкотемпературной стерилизации обусловлен необходимостью в безопасных стерилизующих агентах, связанных с физико-химическими характеристиками продуктов, выпускаемых на рынок, стремлением к удобству большей скорости обработки в дополнение к экологическим требованиям.

С начала 20 века озон в Европе использовался в качестве терапевтической альтернативы для лечения различных типов заболеваний при различных формах применения, местных и системных [103]. Известно множество других применений: обработка, хранение пищевых продуктов, очистка воды и сточных вод, стерилизации бутылок с водой и обеззараживании помещений, например, гостиничных и больничных палат, транспорта и проч. [102, 103].

Канадская компания (TSO3. Inc®) в 2003 году разработала процесс, используя озон в качестве единственного стерилизующего агента [104]. Такой процесс был одобрен Министерством здравоохранения Канады и Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA), поскольку он считался безопасным и быстрым, а также экономичной альтернативой низкотемпературной стерилизации [105]). Эффективность этого процесса определяется при достижении уровня обеспечения стерильности (SAL)  $10^{-6}$  [104, 105].

Озон в последние десятилетия также набирает популярность в различных областях практической медицины. Его уникальная способность оказывать одновременно обезболивающее, дезинтоксикационное, сосудорасширяющее, антигипоксическое и противовоспалительное действие, улучшать реологические свойства крови и процессы ее микроциркуляции, модулировать окислительно-восстановительный гомеостаз обусловили широкие потенциальные возможности

применения озона в таких областях, как , например, как травматология и хирургия, гастроэнтерология и косметология, дерматология, аллергология, неврология, гинекология, стоматология, ангиология, ревматология и др. [102, 103, 106-110].

Достаточно отметить, что в действующей Номенклатуре медицинских услуг, утвержденной Приказом Минздрава РФ №148 н от 05.03.2020, в подразделе А.20.30.024 «Озонотерапия» содержится 8 позиций, определяющих перечень медицинских процедур, которые производятся с применением озона – от наружного и полостного применения озонированной воды и озонированного масла до большой и малой аутогемотерапии и озонорефлексотерапии.

Полевые испытания показали, что наружное применение газообразного озона оказалось эффективным для обработки ран даже в боевых условиях, а использование мощных генераторов озона заслужило высокую оценку военных медиков в условиях специальной военной операции [103, 106].

Особое внимание было привлечено к использованию озона как сильнейшего дезинфектанта в условиях широкого распространения вирусной инфекции при пандемии COVID-19 [106, 107].

В этой связи совершенно не случайным представляется тот факт, что самым первым применением озона в медицине была санитарная обработка операционных помещений. Бактерицидное действие озона отмечено даже при низких его концентрациях.

Озоновая обработка применяется не только для социальных приложений – дезинфекции помещений, транспорта, объектов и предметов общего пользования, но и в сельскохозяйственном производстве.

Эффективным оказалось использование озона для предпосевной обработки семенного фонда, продуктов сельскохозяйственного производства при длительном хранении. Востребован озон и для обработки растительного фармацевтического сырья. Создан целый парк приборов и оборудования для озоновой стерилизации предметов медицинского назначения [102-116]

Выбор подходящего метода обработки материалов, используемых в сфере здравоохранения, имеет важное значение для обеспечения того, чтобы

потенциальные патогены, вызывающие инфекции, не передавались пациентам [117, 118].

Широта спектра бактерицидного действия озона означает, что при такой стерилизации могут быть уничтожены самые разнообразные патогенные микроорганизмы. [103, 120].

Данный способ обработки также является экономически доступным и характеризуется относительно простым процессом эксплуатации. Процесс считается безопасным для использования, поскольку при этом не требуется обращение со стерилизующим средством, отсутствуют токсичные выбросы, нет остатков для аэрации, а низкая рабочая температура означает отсутствие опасности.

Все вышеизложенное предопределило выбор озона для использования в технологии комбинированной радиационной стерилизации костных имплантатов на первом этапе двухступенчатого процесса [26]. Ранее уже предлагался вариант двухступенчатой технологии [98], но при этом на первом этапе использовался водный раствор, в котором выдерживался костный фрагмент в течение суток. Затем костный образец подвергался облучению гамма-квантами еще в течение продолжительного времени (от нескольких часов до суток).

Однако при таком подходе кроме длительности процесса использование водного раствора на первом этапе обработки требовало тщательного высушивания для предотвращения формирования свободных радикалов при последующем радиационном воздействии.

Применение на первом этапе технологического процесса стерилизации костных имплантатов газообразной озono-кислородной смеси позволило устранить эту проблему. С другой стороны, выраженные бактерицидные свойства озона позволили при непродолжительном воздействии (около 20 мин) при относительно невысокой концентрации озона в озono-кислородной смеси (6-8 мг/л) существенно ослабить популяцию патогенов.

В результате их радиорезистентность была настолько ослаблена, что радиационная обработка, осуществленная потоком ускоренных электронов, при

которой величина поглощенной дозы составила 11-12 кГр, обеспечила достаточный уровень стерильности костного фрагмента, что подтвердили микробиологические исследования. В результате был достигнут выраженный синергетический эффект стерилизующего воздействия озono-кислородной смеси с указанными параметрами и последующего радиационного воздействия (причем селективное воздействие каждого из воздействующих факторов необходимый уровень стерильности костных образцов обеспечить не могли).

Однако в процессе этих исследований не было проведено оценки последствий селективного воздействия озона и радиации и их сочетанного использования на свойства и характеристики костных имплантатов.

Ранее было проведено исследование изменения структурных характеристик и элементного состава поверхности костных образцов после воздействия радиации для широкого диапазона изменения величин поглощенной дозы. Для случаев селективного озонного воздействия и в сочетании озона с радиацией исследований не проводилось.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **2.1. Методы исследования характеристик поверхности**

Ряд лабораторных исследований костной ткани проводились в Северо-Восточном федеральном университете, в том числе в Арктическом инновационном центре, и Палеонтологическом институте имени А. А. Борисяка РАН.

В работе использовались современные инструментальные методы анализа для визуализации и исследования образцов: сканирующая электронная микроскопия (РЭМ) с насадкой для элементного анализа, атомно-силовая микроскопия и тестирование на микротвердость для оценки биофизических свойств костной ткани и их изменений. Были проведены микробиологические исследования для оценки эффективности предложенного метода стерилизации для объектов мамонтовой фауны.

#### **2.1.1. Метод инфракрасной спектроскопии (ИК)**

Для изучения возможных изменений состояний костного коллагена при стерилизующем комбинированном (озон + радиация) воздействии использовался метод ИК-спектроскопии. Особое внимание, которое уделено коллагену в настоящей работе, обусловлено тем, что именно он подвергается деструктивному воздействию в процессе радиационной стерилизации при превышении величины поглощенной дозы.

##### ***Технические характеристики ИК-спектрометра VARIAN7000 FT-IR***

Для изучения состава и структуры химических соединений образца были получены колебательные спектры с использованием инфракрасного спектрометра с преобразованием Фурье Varian 7000 FTIR [27, 120] (рисунок 16, таблица 6).

Большое преимущество метода заключается в том, что для него требуется небольшое количество образца. Можно исследовать образец без пробоподготовки (без окрашивания или деминерализации), т.к. спектры основаны на индивидуальных химических характеристиках.



**Рис. 16.** Изображение ИК-спектрометра [27].

**Таблица 6.** Характеристика ИК-спектрометра

Название	ИК-спектрометр VARIAN7000 FTIR
Производство	фирма Varian 2007 г. (Соединенные Штаты)
Стоимостная группа	от 10 млн руб.
Диапазон сканирования	400-6000 $\text{см}^{-1}$
Скорость снятия спектров	до 1,5 сек.
Технические характеристики	<p>Сканирование в инфракрасном диапазоне при частотах излучений от 15800 до 375 <math>\text{см}^{-1}</math> с выставляемым разрешением от 0,25 до 32 <math>\text{см}^{-1}</math>.</p> <p>Скорость снятия спектров до 1,5 сек.</p> <p>В данной комплектации (при наличии светоделиителя из бромида калия) возможность сканирования в диапазоне от 400 до 6000 <math>\text{см}^{-1}</math>.</p> <p>Возможность получения спектров малых объектов (10x10 мкм) с применением микроскопа Varian 600 UMA.</p>
Особенности использования	Для анализа необходимо малое количество исследуемого образца (не менее 10 мг).

Цель эксперимента с применением ИК-спектроскопии в настоящей работе – это исследование структуры и химического состава костных тканей после проведения радиационной стерилизации и комбинированной двухэтапной стерилизации для изучения деструктивных изменений костных тканей.

Для получения ИК-спектра вещества в твердой фазе образец размельчался

до порошкообразного состояния и смешивался с матрицей. В качестве матрицы применялся бромид калия: в количестве 200-300 мг смешивался с образцом (1-2 мг), вакуумировался и прессовался ручным гидравлическим прессом в таблетку (диаметром 13 и толщиной 1 мм), которая фиксировалась в специальном держателе спектрометра. Вначале эксперимента была приготовлена таблетка из чистого бромида калия, помещенная в спектрометр и принятая за спектр служащий фоном.

В настоящей работе был изучен химический состав исследуемых образцов методом ИК-Фурье анализа. В каждой серии опытов компьютер выдает диаграмму спектра (в шкале волновых чисел), полученную после выполнения обратного преобразования Фурье. Из полученных диаграмм видно, что интенсивность поглощения ИК-излучения имеет несколько сравнительно больших пиков. Это означает преобладание данных органических соединений в данном образце. Была составлена таблица пиков и определены спектра химических элементов (органические соединения) из библиотеки. Использована база данных ISI Web of Knowledge для идентификации полученных спектров.

Интерпретация спектров была выполнена путем анализа и сравнения известных и полученных спектральных данных. В настоящей работе было оценено влияние озона и ионизирующего излучения на костный коллаген.

### **2.1.2. Метод растровой электронной микроскопии**

Исследование выполнено на растровом электронном микроскопе высокого разрешения с термополевым эмиссионным катодом Шоттки и супергибридной объективной линзой JSM-7800F фирмы Japanese Electron Optics Laboratory (JEOL), Япония, год выпуска: 2012 г. (таблица 7).

В экспериментах использовались фрагменты ископаемой мамонтовой кости и современные образцы кости быка. Образцы костей мамонта для проведения экспериментальных работ были предоставлены Палеонтологическим музеем РАН (г. Москва) и Музеем мамонта СВФУ им. М.К. Аммосова (г. Якутск) – «Малоляховский» мамонт (Сертификат – ветеринарное свидетельство 214

**Таблица 7.** Описание используемых в работе микроскопов.

Исследовательское оборудование	Производитель, год выпуска	Техническая характеристика
Атомно-силовой микроскоп Solver Next	Solver Next (NT-MDT, Россия)	Область сканирование – 100x100x10 мкм; Шум XY – не более 0.3 нм; Уровень шума Z – 0.03 нм; Диапазоны измерений твердости – 1-80 ГПа, модуля Юнга – 1-1000 ГПа
Растровый электронный микроскоп JEOL JSM-7800F	JEOL (Япония), 2012 г.	Пространственное разрешение – 0.8 нм при 15 кВ; 1.2 нм при 1 кВ; 3 нм при 15кВ. Электронная пушка – термополевая, типа Шоттки. Ускоряющее напряжение – от 0.01 кВ до 30 кВ. Диапазон увеличений – от x25 до x1000000. Столик образцов – большой, эвцентрического типа. Диапазон перемещений: X:70 мм, Y:50 мм, Z:от 2 до 25 мм. Наклон: от -5 до +70 градусов. Вращение 360 градусов

Перед экспериментами костные образцы вырезались механически из нативной компактной костной ткани, предварительно тщательно обезжиривались и высушивались. Образцы помещались на специальный углеродный токопроводящий скотч для обеспечения необходимого электрического контакта с предметным столиком микроскопа и для фиксации образцов при наклоне столика [121, 122].

После пробоподготовки, описанной выше, проводили обработку образцов смесью озона и кислорода с концентрацией 6 – 8,5 мг/л. До произведения манипуляций образцы были контаминированы смешанной микрофлорой.

Для исследования морфологии поверхности костных фрагментов использовали прибор JSM-7800F (рисунок 17, таблица 8), данный растровый электронный обладает ключевым преимуществом очень высокого пространственного разрешения в сочетании с большой глубиной резкости и широким полем зрения [121-125].

***Технические характеристики оборудования:***





**Рис. 17.** Микроскоп JSM-7800 F от компании JEOL, СВФУ «Графеновые нанотехнологии» [27, 121, 122]

**Таблица 8.** Характеристика РЭМ JSM-7800 F [121-123].

Название параметра	Значения параметра
Возможное разрешение	0,8 нм (при 15 кВ); 1,2 нм (при 1 кВ).
Возможное увеличение	x25 – x1 000 000
Ток пучка	1 пА – 200 нА
Ускоряющее напряжение	0,01 кВ – 30 кВ
Электронная пушка	термополевая, тип Шоттки
Столик для образцов	эвцентрический (большой размер)
Диапазон	X:70мм; Y:50мм; Z:2 – 25 (мм) [120] от – 5° до + 70 °; Вращение: 360 градусов

В настоящей работе с помощью прибора изучались закономерности изменчивости морфологии и структурно-механических свойств костной ткани при стерилизации в целях оптимизации параметров комбинированной технологии.

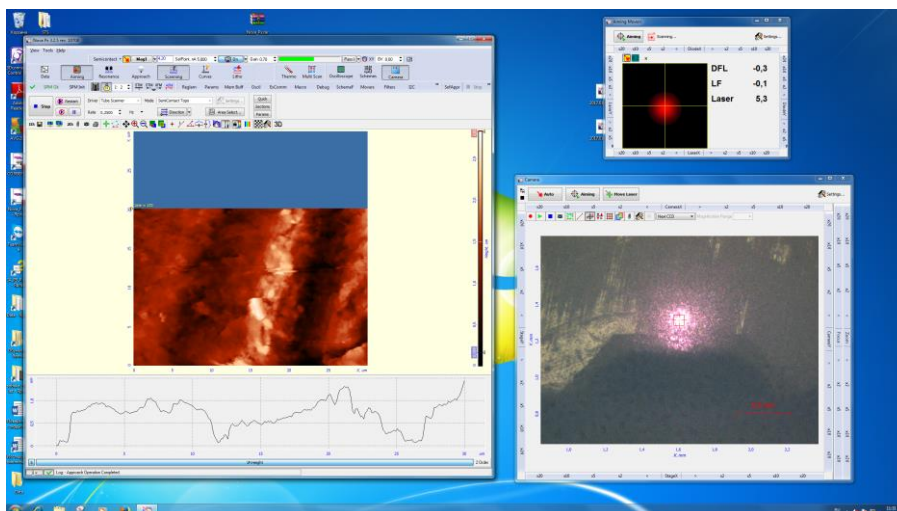
### 2.1.3. Метод атомной силовой микроскопии

Атомно-силовая микроскопия была использована для оценки качества

пробоподготовки костной ткани и методов изготовления костных образцов. Содержание органики и химический состав определяли с помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR) [121, 126, 127].

АСМ-исследования нативной костной ткани быка (образцы цилиндрического вида) проводили через 1 день, 1 неделю и 1 месяц после облучения образцов с различными дозами облучения (5 Гр, 12 кГр, 15 кГр, 25 кГр). Выбранные для АСМ исследования участки костной ткани перед сканированием фотографировались с помощью оптического микроскопа.

Костные образцы были разделены на 1) первую группу: прошедшие обработку озоном на первом этапе и 2) вторую группу: не проходившие обработку озоном были изучены в качестве эталона.



**Рис. 18.** Общий вид программы АСМ

Наиболее часто измеряемым свойством коллагеновой сети в кости является диаметр фибрилл, но поскольку вся ширина фибриллы может быть не видна, любое измерение диаметра может быть ошибочным.

Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) в работе был применен для всестороннего изучения физико-химических и механических свойств образцов, характеристики морфологии поверхности в исследованиях костных тканей. Данный метод позволяет достичь атомарного разрешения на получаемых изображениях.

#### 2.1.4. Метод измерения микротвердости

Для исследований механических характеристик поверхности костных образцов использовался микротвердомер DM8 (Италия) [128]. Данный метод позволяет измерить показатель микротвердости по Виккерсу (таблица 9).

Таблица 9. Описание микротвердомера DM 8

Шкала измерения	Микровиккерс
Тестовые нагрузки	0,0098- 0,0294- 0,049 -0,0981- 0,1962- 0,245- 0,49-0,981- 1,962 -2,94 -4,9-9,81-19,614 Н. (1, 3, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 200, 300, 500, 1000, 2000гс.)
Шкалы измерений	Микровиккерс, НV
Управление	Автоматическое
Погрешность	3%
Пределы измерений	80-1710
Напряжение в сети	230В. 50 Hz 200VA
Температура эксплуатации:	+5-+50 С
Габаритные размеры: ш х г х в, см	22x40x50

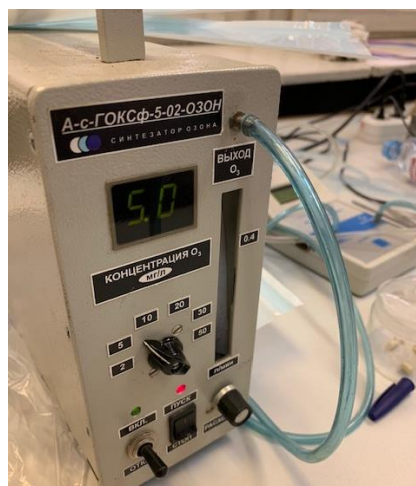
#### 2.2. Методы обработки костных образцов

Озоно-кислородную смесь получали с использованием промышленного генератора медицинского озона Ас-ГОКСф-5-02-ОЗОН (производство ОАО «Электромашиностроительный завод «Лепсе», г. Киров, Россия) и концентратора кислорода VisionAire (США). Для измерения концентрации озона в смеси в течение периода обработки был применен измеритель концентрации озона ИКО-50 (производство ОАО «Электромашиностроительный завод «Лепсе» (г. Киров, Россия).

Для стерилизации озоном на первом этапе комбинированной радиационной стерилизации был использован промышленный медицинский генератор озона (рисунок 19, таблица 10). Оборудование предназначено для выработки озоно-кислородной смеси с концентрацией озона на выходе (от 1,0 до 50,0 мг/л) при заданном расходе кислорода от 1,0 до 0,2 л/мин [129].

Герметичная упаковка исследуемых костных образцов осуществлялась с

использованием двухслойной термопленки на запаивающем аппарате F70-400 (Нидерланды) [28].



**Рис. 19.** Прибор для генерации озона.

**Таблица 10.** Технические характеристики прибора:

Название	Ас-ГОКСф-5-02-ОЗОН
Производитель	ОАО «Электромашиностроительный завод «Лепсе», г. Киров, Россия»
Концентрация озона на выходе, мг/л	до 50
Номинальное напряжение, В	220
Ток	Переменный
Частота	50 Гц
Габаритные размеры, мм	166x450x210
Масса, кг	не более 10

#### ***Технические характеристики анализатора озона ИКО-50***

Значение концентрации озона фиксировалось с помощью соответствующего измерителя ИКО-50 (Россия) [28, 129]. ИКО-50 – оптический анализатор озона в газовых средах, который позволяет измерять концентрацию озона с точностью до 0,1 мг/л (таблица 11).

#### ***Оборудование для проведения экспериментов по облучению материалов***

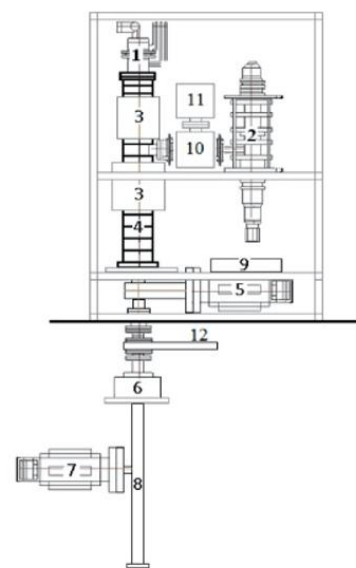
В целях проведения модельных экспериментов по изучению влияния ионизирующего излучения на образцы был использован ускоритель электронов УЭЛР-1-25-Т-001, предназначенный для проведения подобных испытаний (НИИЯФ МГУ) [130] (таблица 12, рисунок 20).

**Таблица 11.** Технические характеристики анализатора озона ИКО-50

Название	Измеритель концентрации озона ИКО-50
Производитель	ОАО «Электромашиностроительный завод «Лепсе», г. Киров, Россия»
Диапазон измерения концентрации озона, мг/л	0 – 99,9
Габаритные размеры, мм	250x100x60
Масса, кг	не более 0,7

**Таблица 12.** Основные параметры и характеристики прибора [29, 130].

Название ускорителя	Ускоритель электронов непрерывного действия УЭЛР-1-25-Т-001
Энергия пучка	1 МэВ
Ток пуска, оесулируемый	5 нА – 25 мА
Максимальная мощность пучка	25 кВт
Рабочее напряжение пушки/клизтрона	15 кв
Рабочая частота	2450 МГц



**Рис. 20.** Снимок и схема используемого ускорителя электронов. 1 – электронная пушка; 2 – клистрон; 3 – магнитный экран; 4 – ускоряющая структура; 5, 7, 11 – магниторазрядные насосы; 6 – магнит развертки; 8 – камера развертки; 9 – система СВЧ питания низкой мощности; 10 – охлаждаемая камера откачки; 12 – вакуумный затвор

Наряду с этим ряд экспериментов были проведены с использованием Сибирского резонансного импульсного ускорителя «СИРИУС» [131] (таблица 13).

**Таблица 13.** Описание и технические характеристики синхротрона [131].

Название	Синхротрон СИРИУС (Сибирский резонансный импульсный ускоритель)
Производство и дата изготовления	Томский политехнический университет, 1960 г.
Энергия	1,5 ГэВ
Частота повторения, <u>имп/с</u>	2 – 6
Длительность импульса излучения, сек	$2 \cdot 10^{-5}$ – $2 \cdot 10^{-2}$
Внутренний пучок, част/ <u>имп</u>	2500

Облучение образцов кости (помещенных в герметичную упаковку) проводили на линейном ускорителе электронов непрерывного действия на энергию 1 МэВ (Институт ядерной физики МГУ им. М.В. Ломоносова). В процессе стерилизации и при последующем хранении костных образцов использовали пакеты из двухслойной термопленки DGM Steriguard. Поглощенные дозы составляли 2, 5, 12, 15, 20 и 25 кГр, инструментальный контроль дозы облучения осуществлялся с помощью дозиметрических детекторов пленочного типа СО ПД(Ф)Р-5/50 (ГСО 7865-2000). После проведения экспериментов по облучению материалов далее выполнялось тестирование образцов.

Также были проведены микробиологические исследования (по стандартным методикам с использованием тиогликолевой среды и среды Сабуро) для оценки эффективности использованных методов воздействия. Оценка стерильности образцов проводилась в соответствии с ОФС 42006607 (Государственная фармакопия РФ, XII, часть 1., с. 131–139). [132]

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

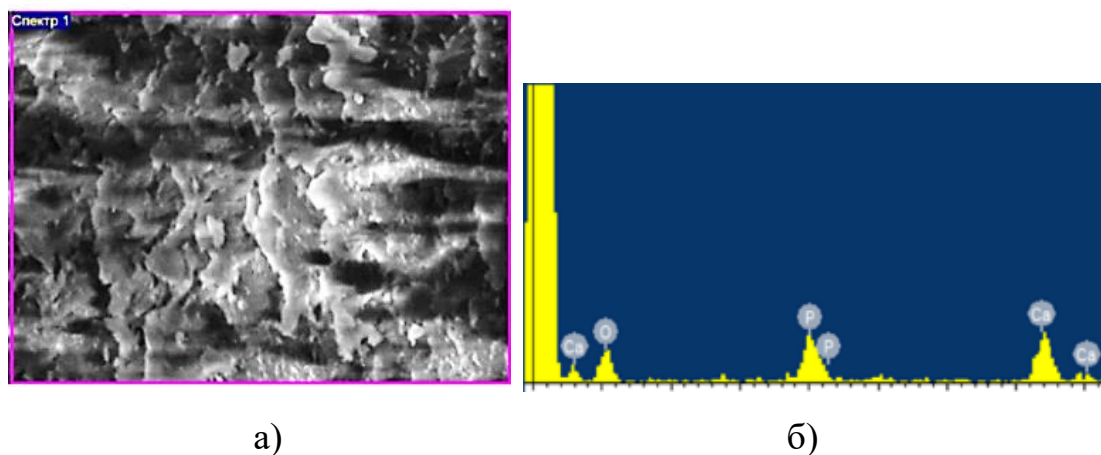
### 3.1. Селективное воздействие озона на костные образцы

Для микроскопического анализа структуры поверхностей образцов использовали растровый электронный микроскоп. При этом была использована возможность одновременной регистрации как морфологии поверхности образца, так и элементный состав на его поверхности в этой же области.

Для исследования воздействия селективного воздействия озона, костные образцы были разделены на группы:

- контрольные образцы быка без озонowego воздействия (нативные);
- образцы кости быка с озоновой обработкой, различной по времени;
- контрольные образцы мамонта без озонowego воздействия;
- образцы мамонтовой кости с озоновой обработкой, различной по времени (концентрация озон-воздушной смеси: 6-8,5 мг/л; время обработки: от 2 до 35 минут).

В ходе исследований свойств и характеристик поверхностей костных образцов после различных видов стерилизующих воздействий была получена информация, в частности, о морфологии и элементном составе образцов [133, 134].

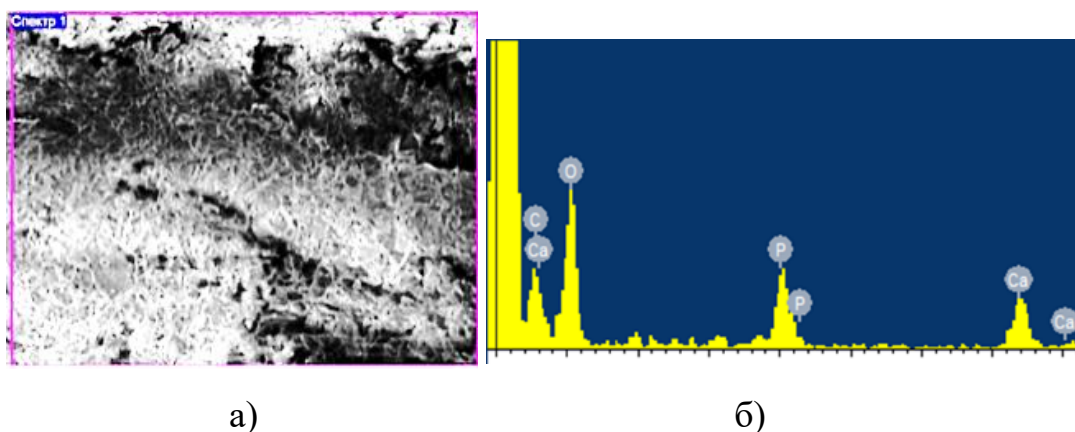


**Рис. 21.** Пример характеристик поверхности костных образцов мамонта без озоновой обработки: СЭМ-изображение поверхности костного образца (а).  
Результаты элементного анализа поверхности (б).

По итогам выполненного элементного анализа состава костной ткани (2019 – 2023 г.г., СВФУ) выявлены основные химические элементы – кальций (~18%), углерод (~32%), фосфор (~8%) и кислород (~35%). Кальций и фосфор (минеральная основа кости) выполняют важную функцию, обеспечивая механическую прочность костных структур.

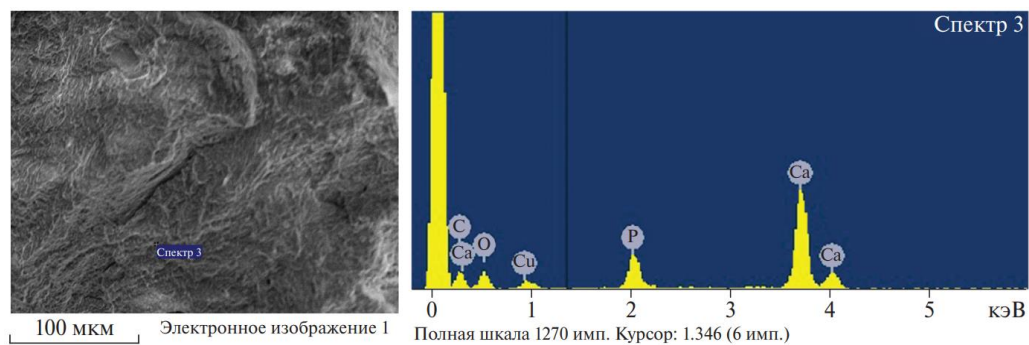
В результате обработки озоновой смесью (с концентрацией 6–8 мг/л в промежутках от 2 до 35 минут) экспериментальных костных образцов (герметично упакованных в термопленку) заметно повысилось процентное содержание кислорода  $O_2$ . В то же время, стерилизация озоном не повлияла на состояние поверхности костной ткани, не установлено существенных структурных изменений поверхностного слоя и процентного содержания элементов, отличных от кислорода.

На рисунках 22 и 24 приведены РЭМ-изображения поверхности образцов костной ткани, прошедшие первый этап стерилизации озоном с различным временем обработки. При сравнении поверхности образцов, обработанных озоном с контрольным образцом, видно, что особых изменений в морфологии поверхности не произошло.



**Рис. 22.** Характеристики поверхности образцов кости мамонта после воздействия озона (8 мг/л, 15 минут): СЭМ-изображение поверхности костного образца (а). Результаты элементного анализа поверхности (б). Образцы были упакованы в герметичные монослойные термоусадочные пленки для противовоздействия внешним факторам (влаги, влажный воздух, грязь, пыль, микробы, УФ-излучение и др.).

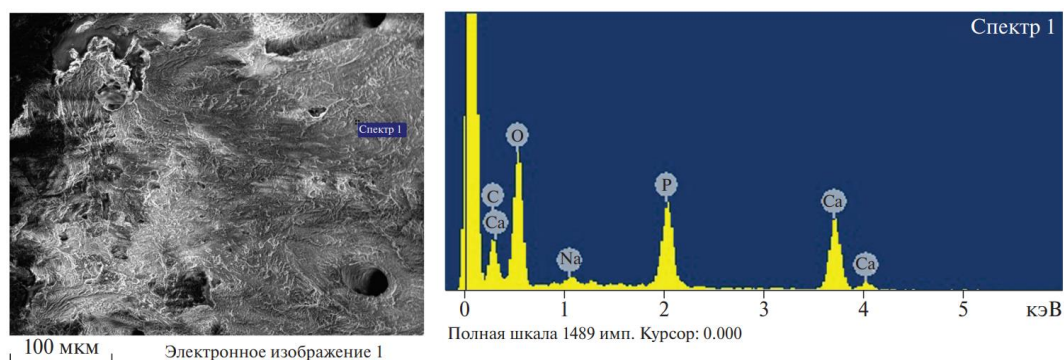




а)

б)

**Рис. 23.** Характеристики поверхности образцов бедренной кости быка без озоновой обработки: СЭМ-изображение поверхности костного образца (а). Спектр участка поверхности (б).



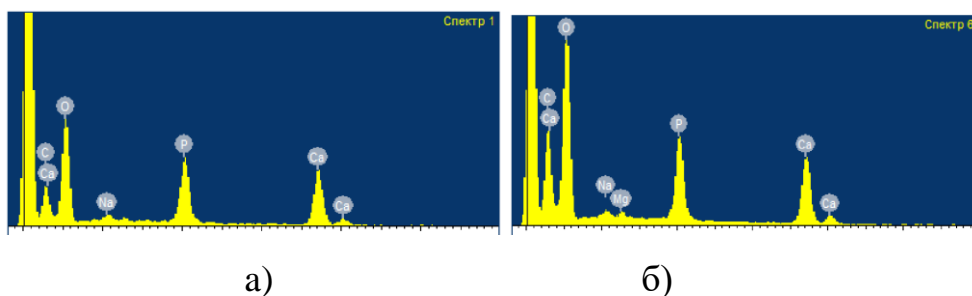
а)

б)

**Рис. 24.** Характеристики поверхности образцов бедренной кости быка после озоновой обработки (8 мг/л, 10 мин): СЭМ-изображение поверхности костного образца (а). Спектр участка поверхности (б).

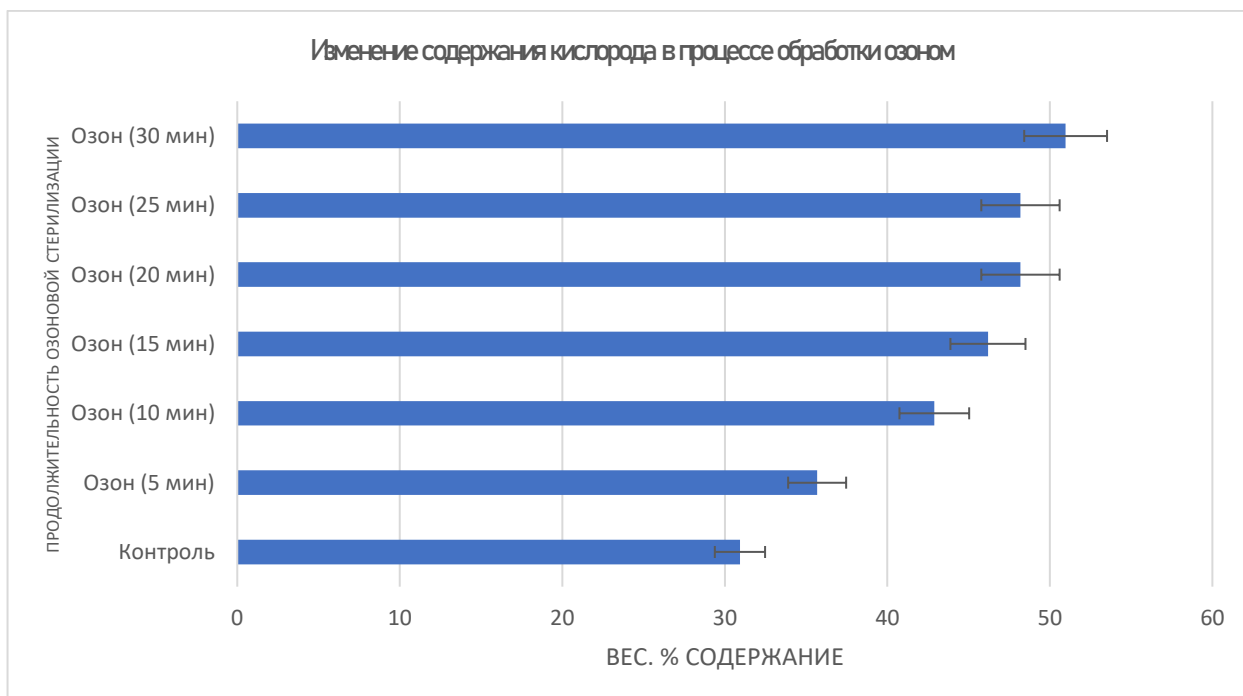
Сравнительный анализ поверхностей образцов костной ткани быка после озоновой обработки с одинаковой концентрацией в промежутках с различной длительностью времени (от 5 минут до 25 минут) особых характерных изменений в морфологии поверхностей образцов также не проявляет.

Был изучен элементный состав костных материалов, обработанных озоном в течение различных периодов времени (от 5 до 25 минут с одинаковой концентрацией).



**Рис. 25.** Элементный состав на поверхности костных образцов после обработки озоном в концентрации (8,0–8,5) мг/л. в течение различного периода времени: (а) 5 мин. (б) 10 мин.

Эксперименты показали, что содержание кислорода в поверхностном слое всех исследованных образцов (рисунки 22, 24-25) монотонно увеличивается с увеличением времени воздействия озона. При этом значительных изменений морфологии поверхности образцов в зависимости от времени обработки озоном также не наблюдается. Данный факт может иметь важное значение для эффективности последующего процесса радиационной обработки на втором этапе стерилизации.

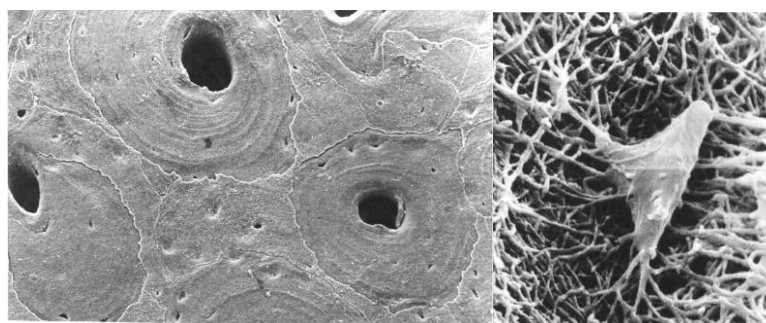


**Рис. 26.** Изменение концентрации кислорода в слое костного образца при различной продолжительности озоновой обработки.

Если на первом этапе стерилизации используется озон, далее данный газ проникает внутрь образца через поры и распространяет действие кислородного эффекта вглубь образца (рисунок 26).

Кислородный эффект – свойство молекул кислорода, присутствующих в клетках и тканях, усиливать биологическое действие ионизирующего излучения (эффект впервые изучен Л. Греем). Данное явление является универсальным, и его можно наблюдать при облучении самых разных объектов, включая организмы, клетки и др. Как известно, патологические последствия возникновения свободных радикалов зависят от уровня кислорода в тканях. Кислородный эффект обычно рассматривается в лучевой терапии при гипоксии раковых клеток для увеличения эффектов от облучения. Однако кислородный эффект имеет место и при воздействии на биообъекты других факторов, инициирующих возникновение радикалов.

В случае стерилизации озоном процентное содержание кислорода растет в образцах, что позволяет снизить дозу со стандартной (20 кГр) до (11-12 кГр) с сохранением стерильности и свойств кости. Это происходит, возможно, из-за большого эффективного сечения кислорода. При этом заслуживает внимания тот факт, что при нахождении костного образца в течение некоторого времени в атмосфере озона (а именно такая ситуация имеет место при обработке костного фрагмента озоно-кислородной смесью на первом этапе комбинированной радиационной стерилизации) часть озона проникает в объем костной ткани.



**Рис. 27.** РЭМ-снимки микроструктуры костных тканей.

Костная ткань обладает уникальной структурой, которая характеризуется наличием развитой системы внутрикостных пространств. Она формируется из

целого ряда компонентов различного пространственного масштаба. Основным структурно-функциональным элементом является остеон. Внутри него – цилиндрический Гаверсов канал со средним диаметром до 100 мкм (рисунок 27, слева). Между центральными каналами образуются локальные анастомозы – прободающие или фолькмаровы каналы с таким же или вдвое меньшим диаметром, далее – лакуно-канальцевая система микронных масштабов (рисунок 27, справа).

Причем эта система распределена по объему кости более равномерно, а проведенные оценки показывают, что отношение пористости канальцев  $\varepsilon_K$  к пористости лакун  $\varepsilon_L$  может быть оценено как:

$$\frac{\varepsilon_K}{\varepsilon_L} = \frac{NZ/2\pi r^2 a}{N\pi a^3/3} = \frac{3}{2} Z \left( \frac{r}{a} \right)^2$$

где  $r$  – радиус канала,  $a$  – длина канала,  $N$  – число лакун в единице объема,  $Z$  – среднее число канальцев одной лакуны.

Результаты расчетов показывают, что для компактной кости объем системы лакун-канальцев в реальных случаях более чем на 90% определяется объемом лакун. В результате кость обладает пористой структурой. По данным измерений с использованием методики центробежной порометрии преимущественный размер пор (в нативной кости быка) составляет от 50 до 200 мкм. Эти данные хорошо коррелируют и с результатами электронной микроскопии. Причем объемная доля этих пор в зависимости от вида животного может колебаться в пределах порядка 5-10% от общего объема кости.

Таким образом, при наличии развитой системы внутрикостных пространств [135] содержание кислорода после озоновой обработки повышается не только на поверхности кости, но и в ее объеме. В результате и кислородный эффект проявляется и в объеме кости. В случае работы с ископаемой костью мамонта ситуация еще более благоприятная, так как в течении длительного срока (20 – 50 тыс. лет) кость мамонта теряет практически всю органическую составляющую.

И как следствие – реальная (эффективная) пористость таких ископаемых костей составляет до 55% от объема костной ткани, а значит и кислорода в объеме

после озоновой обработки – значительно больше, и вклад кислородного эффекта в радиационное воздействие – значительно выше. А значит и дозовая нагрузка на обрабатываемую костную ткань – меньше при сохранении эффективности стерилизующего радиационного воздействия.

**Таблица 14.** Сравнительные данные состава компактной кости человека и животных.

Объекты	Люди			Коровы (КРС)			Свинья
	Мин	Макс	Сред.	Мин	Макс	Сред.	
V <sub>пор</sub> (%)	4,2	7,4	6,2	6,8	7,9	7,54	7,6
V <sub>воды</sub> (%)	0,9	1,1	1,0	0,8	1,6	1,2	1,1
V <sub>мин</sub> (%)	43,6	49,5	46,3	49,2	53,7	52,1	50,6
V <sub>орг</sub> (%)	45,2	48,0	46,5	38,6	44,0	40,3	41,7

\*V<sub>пор</sub>, V<sub>воды</sub>, V<sub>мин</sub>, V<sub>орг</sub> – относительные (к объему образца) объёмы пор, воды, минерального и органического компонент твердого матрикса кости.

В работе было приведено качественное описание эффективности распространения озона в костной ткани при наличии описанной выше развитой системы внутрикостных пространств. Описание предложенного модельного подхода представлено в Приложении 2. Здесь же приведем основные результаты и выводы такого рассмотрения. В использованном подходе транспорт озона может описываться нестационарным уравнением конвекции-диффузии, где искомой величиной является концентрация озона  $c$ . Связь двух уравнений производится с помощью скорости фильтрации  $u = -k\nabla p$ , где  $k$  является проницаемостью, а  $p$  – поровым давлением. Дальнейшее рассмотрение происходит с использованием метода многоконтинуального усреднения [144, 145, 146] на некоторой рабочей области, ячейки или слои которой представляют систему пор различных пространственных масштабов.

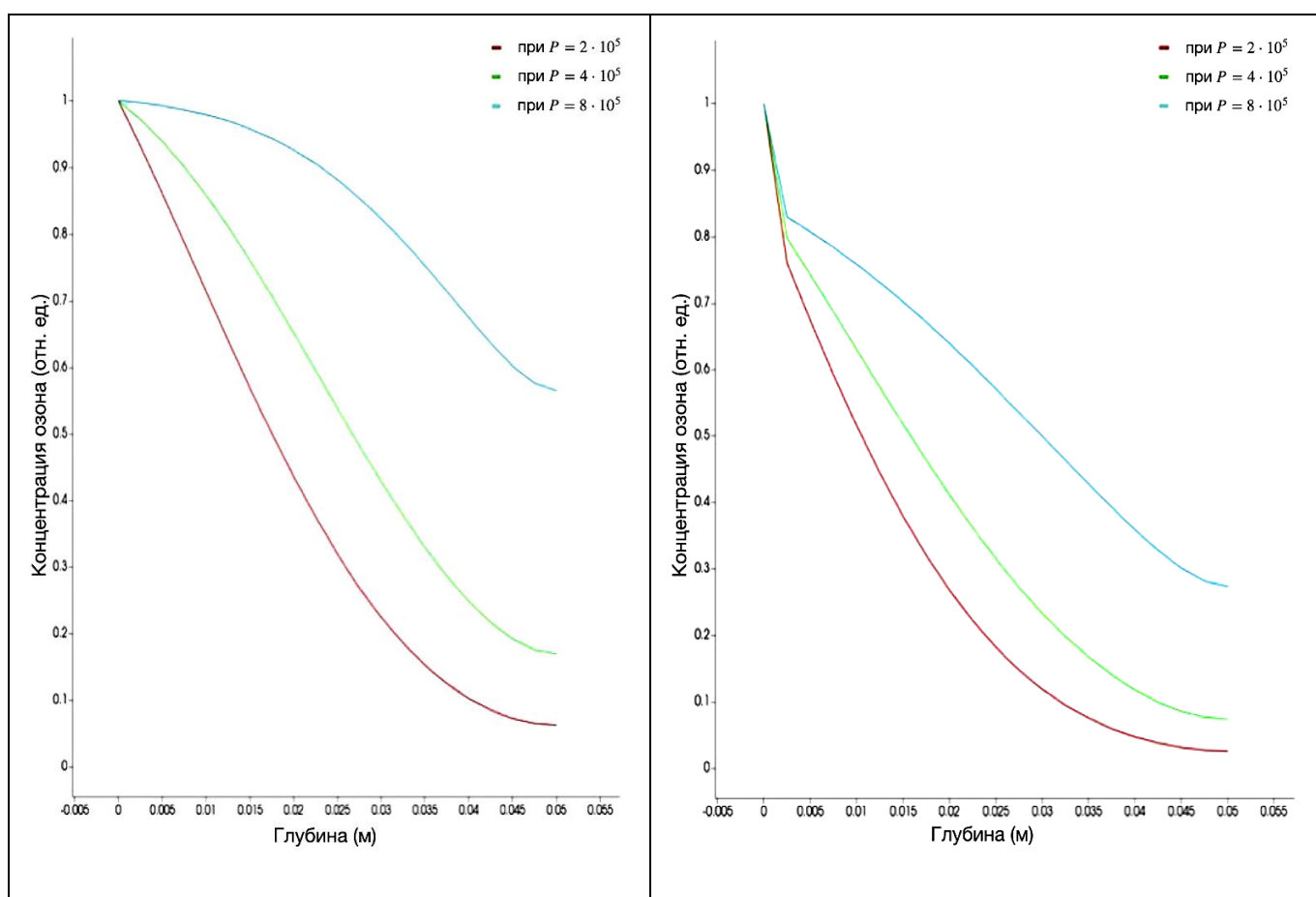
В результате была получена многоконтинуальная модель связанного потока и транспорта в перфорированной среде, с помощью которой удалось получить качественную картину распространения озона в объеме костной ткани.

Таким образом, многоконтинуальная модель связанного потока и транспорта в перфорированной среде будет иметь следующий вид:

$$-\nabla_n(\widehat{\alpha}_{ij}^{mn}\nabla_m P_j) + \widehat{\beta}_{ij} P_j = g_i. \quad (1)$$

$$\widehat{\gamma}_{ij} \frac{\partial C_j}{\partial t} - \nabla_n(\widehat{\eta}_{ij}^{mn}\nabla_m C_j) + \widehat{\xi}_{ij}^m \nabla_m C_j + \widehat{\Theta}_{ij} C_j = h_i.$$

где  $P_j$  и  $C_j$  – это давления и концентрации в континуумах  $j$  ( $j = 1, 2$ ),  $\alpha_{ij}^{mn}$  – это коэффициенты проницаемости,  $\beta_{ij}$  – это коэффициенты перетока между континуумами давления,  $\eta_{is}^{km}$  – это коэффициенты диффузии,  $\xi_{ij}^m$  – это скорости,  $\Theta_{ij}$  – переток между континуумами концентрации.



**Рис. 28.** Концентрация озона в зависимости от глубины для континуума больших пор (слева) и континуума малых пор (справа)

Расчеты были выполнены для различных значений давления озона с использованием параметров процесса, близких к реальным условиям проводившихся лабораторных исследований (продолжительность воздействия – 1200с, коэффициенты диффузии  $D = 1.86 \times 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$  в мелких поровых каналах и  $D = 1.86 \times 10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}$  в крупных поровых каналах, коэффициент проницаемости

задается равным  $k = 2.8 \times 10^{-15} \text{ м}^2 / (\text{Па} \cdot \text{с})$  в мелких порах и  $k = 2.8 \times 10^{-12} \text{ м}^2 / (\text{Па} \cdot \text{с})$  в крупных порах). Результаты модельных расчетов в виде пространственного распределения концентрации озона (в относительных единицах) по глубине образца в финальный момент времени для различных граничных условий давления приведены на рисунке 28.

Из графиков видно, что концентрация озона уменьшается по мере увеличения глубины. Заполняемость озоном малых пор меньше, чем у больших пор. Также можно наблюдать, что увеличение давления озона существенно влияет на общую концентрацию в финальный момент времени.

Проведенное модельное рассмотрение подтвердило возможность проникновения озono-кислородной смеси в толщу костных тканей в условиях существования развитой поровой структуры при озонной обработке на первом этапе комбинированной радиационной стерилизации. В результате наличие повышенного содержания кислорода не только на поверхности, но и в объеме кости за счет кислородного эффекта усиливает действие радиации и позволяет снизить дозовую нагрузку на втором этапе комбинированной стерилизации.

В качестве практической рекомендации следует отметить, что увеличение давления озono-кислородной смеси приводит к увеличению глубины ее проникновения и содержания кислорода в костном образце, что позволяет сделать соответствующие практические рекомендации для корректировки технологического режима стерилизации.

### **3.2. Морфо-механические характеристики образцов после радиационного воздействия**

Облучение образцов кости проводили на линейном ускорителе электронов непрерывного действия на энергию 1 МэВ с мощностью пучка до 25 кВт. В процессе стерилизации и при последующем хранении костных образцов (имплантатов) использовали пакеты из двухслойной термопленки DGM Steriguard, герметизацию которых осуществляли с применением термоаппарата F70-400

(Нидерланды).

Анализ результатов воздействия излучения на физические характеристики образцов свидетельствует о значительных структурно-функциональных изменениях, в том числе, об уменьшении предела прочности и изменении (до 25%) в области упругих деформаций, зоне разрушения и области текучести. Использованные параметры для оценивания механических характеристик: модуль упругости ( $E$ ), напряжение разрушения ( $\sigma_f$ ), напряжение текучести ( $\sigma_y$ ), деформация текучести ( $\varepsilon_y$ ), деформация разрушения ( $\varepsilon_f$ ). При последующем повышении дозы излучения до 25 кГр, прочность образцов снижается на треть (испытание на изгиб). Основные данные снижения механических характеристик представлены в виде таблице 16 (рисунок 26) [149].

**Таблица 16.** Динамика изменения механических характеристик исследуемых образцов кости после воздействия ионизирующего излучения.

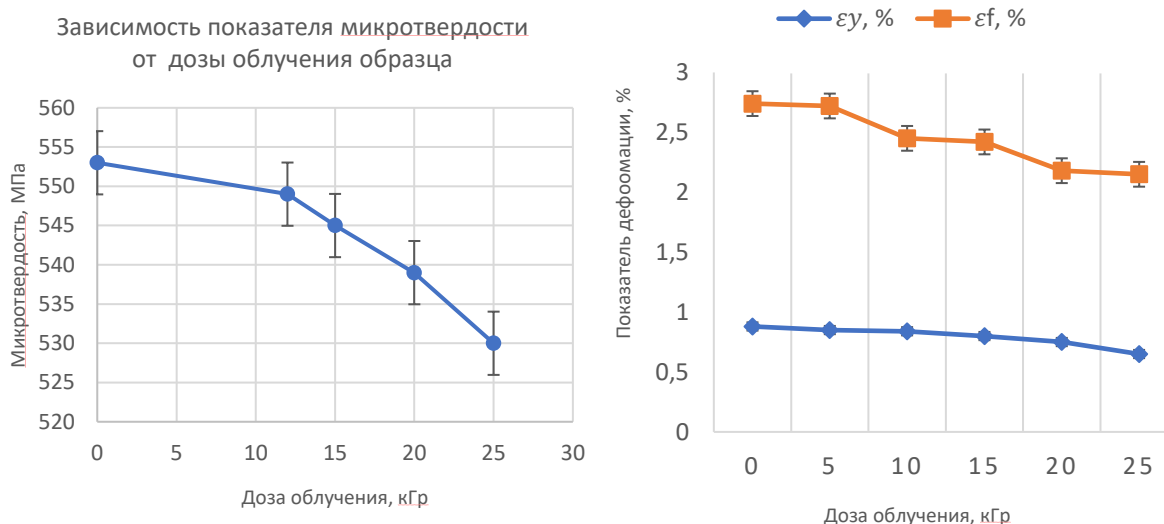
Доза, кГр	$\sigma_y$ , МПа	$\varepsilon_y$ , %	$E$ , ГПа	$\sigma_f$ , МПа	$\varepsilon_f$ , %
0	$93 \pm 1.17$	$0.87 \pm 0.01$	$10.76 \pm 0.23$	$166 \pm 3.22$	$2.74 \pm 0.08$
15	$91 \pm 1.17$	$0.82 \pm 0.01$	$11.24 \pm 0.19$	$162 \pm 3.18$	$2.43 \pm 0.07$
20	$88 \pm 0.89$	$0.80 \pm 0.01$	$10.92 \pm 0.20$	$156 \pm 3.30$	$2.26 \pm 0.06$
25	$87 \pm 1.89$	$0.80 \pm 0.02$	$10.88 \pm 0.25$	$155 \pm 2.97$	$2.24 \pm 0.05$

Результатом происходящих структурно-функциональных изменений является снижение механических показателей образцов костных материалов. Изменение прочности образцов является дозозависимым. Так, в условиях испытаний на изгиб при величине дозы 17 кГр, прочность образцов снижается на 11%, при 30 кГр – на 22%, а при 65 кГр – на 65%. При испытаниях на сжатие уменьшение прочности при дозе 28 кГр составляет 35%, а при растяжении – 10% при дозе 35 кГр. При низких значениях дозы (до 5 кГр) не отмечено существенных нарушений структуры и функции тканей. При дальнейшем повышении дозы в пределах 25–50 кГр прочность при испытании на изгиб снижается почти на треть.

Проведенный анализ механических характеристик костных образцов после радиационной обработки с шагом в 5 кГр и в диапазоне до 25 кГр свидетельствует

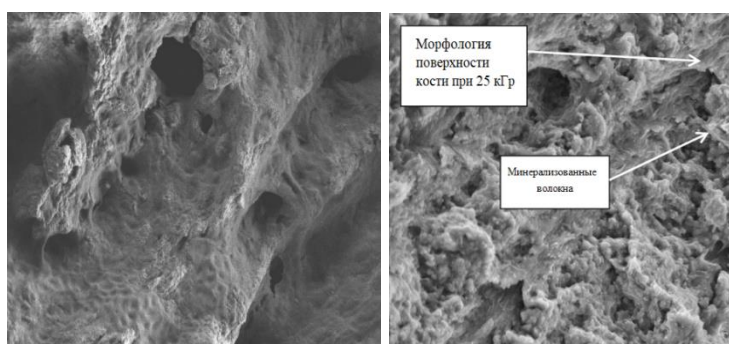


о существенном уменьшении предела прочности и относительной деформации (вплоть до 25%) вблизи границ зоны упругих деформаций, зоны текучести и разрушения [149]. При этом наименьшие изменения отмечены для модуля упругости, а наибольшие – для модуля вязкости (данные приведены в таблице 16).



**Рис. 29.** Полученные данные о механических характеристиках образцов после воздействия радиацией: а) показатель микротвердости; б) показатели деформации: текучести (синий), разрушения (оранжевый).

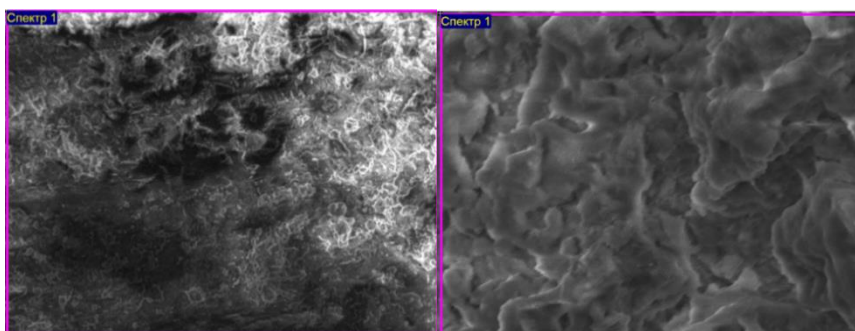
В дополнение к известным данным об изменении механических характеристик в ходе работы было исследовано состояние поверхностного слоя костного образца. После хранения в герметичной упаковке образцы подвергались радиационной стерилизации посредством облучения потоком быстрых электронов с дозой облучения 11, 15, 20 и 25 кГр. Получены РЭМ-изображения поверхности нативной костной ткани с различным увеличением (рисунки 30, 31).



**Рис. 30.** РЭМ-изображения нативной костной ткани с увеличением  $\times 5000$  при 0

кГр (слева) и при 25 кГр (справа)

При стерилизации поглощённой дозой (15 кГр и выше) на поверхности костных образцов наблюдаются микро и макротрещины. Сравнительный анализ данных элементного анализа свидетельствует о том, что в результате облучения в диапазоне поглощенных доз (от 15 кГр, 20 кГр и выше) происходят видимые изменения морфологии костных фрагментов, которые сопровождаются изменением механических характеристик, что подтверждается данными других авторов [23, 24].



**Рис. 31.** РЭМ-снимок поверхности образца после воздействия радиацией (без озона) с дозой: а) 12 кГр; б) 20 кГр.

Такие же исследования были проведены для образцов бедренной кости быка после воздействия радиации. Сравнительный анализ полученных данных с результатами исследования характеристик образцов кости быка, подвергавшихся радиационному воздействию в диапазоне доз поглощения до 27 кГр показал, что радиационная обработка в свою очередь характеризуется выраженными дозозависимыми изменениями морфологии костных фрагментов, что подтверждает необходимость уменьшения дозы облучения.

При этом отчетливо прослеживается тенденция усиления разрыва структурных связей, увеличение пористости, явление деминерализации поверхностного слоя кости [150, 151]. Эти изменения особенно выражены при высоких значениях доз поглощения. Установлено, что даже доза излучения 15 кГр вызывает усиление биологической активности коллагена и ускоряет его деградацию. В качестве возможного механизма рассматривается образование

высокоактивных гидроксильных свободных радикалов в результате радиолиза молекул воды во влажном образце кости, что ускоряет образование сшивок коллагена.

Таким образом, сравнительный анализ полученных данных с результатами исследования характеристик образцов кости быка, подвергавшихся радиационному воздействию в диапазоне доз поглощения от 0 до 25 кГр, проведенного с использованием аналогичных экспериментальных методик, показал, что в отличие от озонового воздействия радиационная обработка характеризуется выраженными дозозависимыми изменениями морфологии костных фрагментов.

Анализ полученных данных по измерению показателя микротвердости позволяет заключить, что при обработке костного образца ионизирующим излучением с дозовой нагрузкой 20-25 кГр отмечается тенденция снижения данного параметра. Приведённые данные соответствуют результатам других исследователей [21-26, 28]. Вместе с тем, селективное стерилизующее воздействие радиации с величиной поглощенной дозы до 15 кГр не приводит к существенным изменениям упруго-пластических характеристик поверхности костного фрагмента.

**Таблица 17.** Величина микротвердости поверхностного слоя костного фрагмента после радиационного воздействия [174, 175].

№ п/п	Значение дозы облучения, кГр	Микротвердость, МПа ( $M \pm \Delta M$ )
1	0 (контрольный образец)	$553 \pm 10$
2	10	$539 \pm 15$
3	15	$538 \pm 20$
4	20	$547 \pm 19$
5	25	$530 \pm 19$

Таким образом, изучение закономерностей изменения морфо-механических характеристик поверхностного слоя костных фрагментов в результате радиационного воздействия в указанных выше диапазонах и обобщение полученных данных, позволяет получить представление о тенденциях происходящих изменений в поверхностных слоях.

### **3.3. Состояние костного коллагена до и после селективного и комбинированного радиационного воздействия**

Применение ИК-спектроскопии позволило получить новые результаты относительно сохранения костного коллагена в мамонтовой кости и его изменения при стерилизующем (селективном и комбинированном) воздействии. Особое внимание, уделенное коллагену в настоящей работе, обусловлено тем, что он выполняет биомеханические функции, является важной структурой и наиболее распространенным белком в организме животных и человека. Коллаген играет огромную роль в палеонтологических (например, при определении возраста останков) и других исследованиях, имеет большое биомедицинское значение (материалы на основе коллагена широко используются в тканевой инженерии).

Целью данных экспериментов было:

- оценить содержание костного коллагена в образцах Малоляховского мамонта с помощью ИК-спектроскопии;
- выяснить оказывает ли воздействие радиации (быстрые электроны) на костные образцы (быка и мамонта) со стандартными для стерилизации поглощенными дозами (20 – 25 кГр);
- проведение отработки методики на образцах костной ткани быка;
- оценить воздействие предлагаемого комбинированного способа стерилизации на исследуемые образцы.

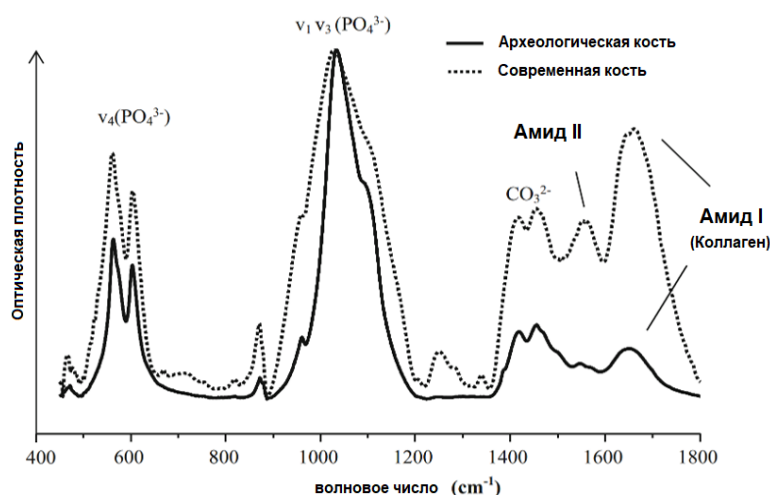
Зарегистрированные ИК-спектры дают информацию о белковых, минеральных компонентах костной ткани. Спектры кости мамонта и быка состоят из органического матрикса (в основном из коллагена I типа) и неорганического матрикса (состоящего из карбонатного гидроксиапатита).

В области спектра 1200–1800 см<sup>-1</sup> встречаются полосы, соответствующие амидным группам: амид I (1625–1700 см<sup>-1</sup>), амид II (1450–1650 см<sup>-1</sup>), амид III (1200–1305 см<sup>-1</sup>), характерные для коллагена (рисунок 32).



**Рис. 32.** Спектр поглощения контрольного образца на ИК-спектрометре.

Сравнительный анализ полученных спектров кости Малоляховского мамонта (обитавшего более 43 тыс. лет назад) и спектров других костей из археологических памятников [152-156], показал, что костный коллаген мамонтовой кости находится в относительно хорошей сохранности, вероятно, из-за условий мерзлоты (рисунок 33).



**Рис. 33.** ИК-спектры археологической и современной кости [156].

Из полученных диаграмм видно, что интенсивность поглощения ИК-излучения имеет несколько сравнительно больших пиков, что означает преобладание данных органических соединений в данном образце. Была составлена таблица пиков и определены спектра химических элементов

(органические соединения) из библиотеки. Интерпретация спектров была выполнена путем анализа и сравнения известных и полученных спектральных данных. Зарегистрированные ИК-спектры представлены в таблице 18.

Использованы различные базы данных (ISI Web of Knowledge, ZaIR и др.) для идентификации полученных результатов. Обработка данных ИК-спектров также проводилась в диапазоне 2000-400 см<sup>-1</sup>.

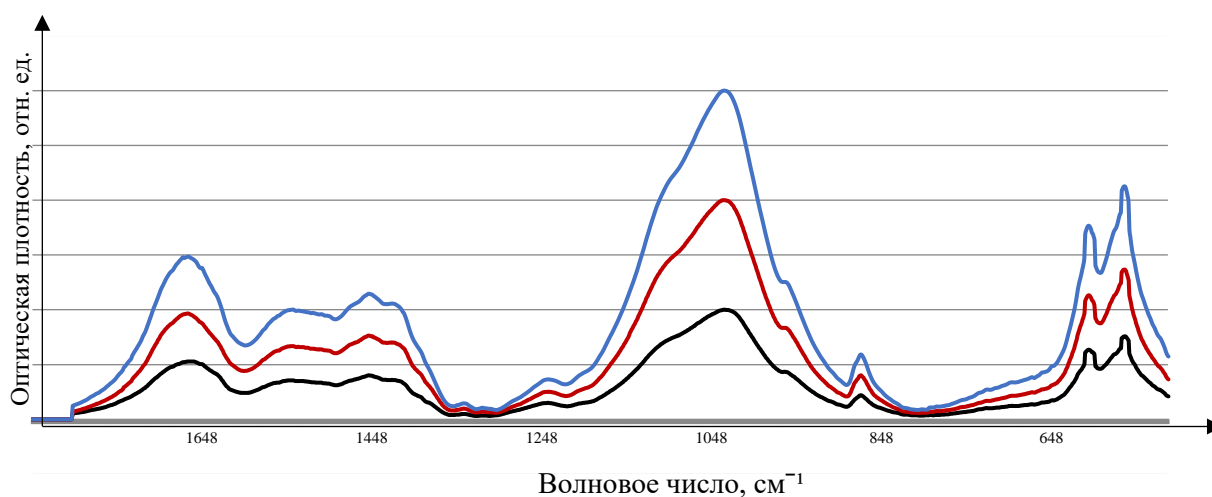
Важные выводы можно сделать и на основании анализа изменения спектров при различных значениях дозовой нагрузки при радиационном воздействии (рис. 34 демонстрирует средние значения ИК-спектров, полученных после радиационной обработки кости).

**Таблица 18.** Преобладающие органические соединения в образце.

Спектры	Органические соединения
1673 см <sup>-1</sup>	поглощение функциональной группы амида I (пептид C = O, растягивающий вибрацию коллагена), которая представляет собой органический матрикс кости (коллаген I типа)
1504,25 см <sup>-1</sup> , 1450,89 см <sup>-1</sup> , 1423,23 см <sup>-1</sup>	полоса амида II, обусловлена сочетанием режимов растяжения C–N и изгиба N–H в плоскости
1029,29 см <sup>-1</sup>	соответствует нормальным модам ν1 и ν3 апатитового фосфат-иона
871,9 см <sup>-1</sup>	карбонат ν2
562,74 и 603,4 см <sup>-1</sup>	соответствует моде изгиба ν4 апатитового фосфат-иона.

После селективного радиационного воздействия с величиной поглощенной дозы (25 кГр и более) выявлено исчезновение некоторых полос коллагена.

На рисунке 34 представлены данные, полученные для образцов костной ткани, подвергавшихся комбинированной обработке (а именно последовательному влиянию озона и радиации). ИК-спектры для контрольного образца, не подвергавшегося никакой обработке, изображены синим цветом, спектры для образцов костной ткани после последовательного озонового и радиационного воздействия с дозой 12 кГр – красным, с дозой 20 кГр – черным.



**Рис. 34.** Результаты исследований на ИК-спектрометре: спектры контрольного образца (синий); образца после облучения при 12 кГр (красный) и при 20 кГр (черный).

Анализ полученных результатов свидетельствуют о том, что при радиационной комбинированной стерилизации с поглощенной дозой (12 кГр) основные компоненты коллагена сохраняются.

При радиационном воздействии с величиной поглощенной дозы (20 кГр) зарегистрировано снижение интенсивности соответствующих пиков, что свидетельствует об уменьшении содержания костного коллагена, что в свою очередь, влияет на свойства и качество костных структур.

Данный результат подтверждает необходимость изменения стандартной дозы облучения для древних ископаемых, в которых сохранился коллаген в достаточных количествах из-за условий многолетней мерзлоты. Дозы облучения при 25 кГр и выше способствуют полной деградации органического материала. В то же время, после обработки при 12 кГр все компоненты коллагена сохраняются на ИК спектре.

Были проведены исследования насколько добавление к радиационной обработке озонowego воздействия может изменить морфологию поверхности костных образцов (кость мамонта) для радиационных воздействий с различными дозами. Анализ результатов микрофотографий на РЭМ поверхностей образцов после воздействия озоном и радиацией с дозами (12-20) кГр свидетельствует о том,

что добавление озонowego воздействия к радиационной обработке костных фрагментов не приводит к заметному изменению морфологии поверхностей.

Таким образом, селективное и сочетанное с озоном радиационное облучение быстрыми электронами с поглощенной дозой 12 кГр не способствовало существенному уменьшению какого-либо компонента кости, что подтверждает положительный эффект применения комбинированного метода стерилизации. Радиационная обработка при более высоких дозах излучения приводит к постепенному снижению интенсивности всех полос коллагена при 20 кГр и полному исчезновению некоторых полос коллагена при 25 кГр.

### **3.4. Изучение изменения коллагеновых структур образцов после воздействия радиации**

Кость состоит из органических (в основном коллагена) и неорганических (в основном биоапатита минерального) компонентов, которые организованы в иерархические структуры от нано- до макромасштабов, которые обеспечивают различные функции. На структуры и свойства кости влияют процессы ремоделирования кости, на которые влияет механотрансдукция, процесс, посредством которого механические сигналы преобразуются в биохимические сигналы в клеточной передаче сигналов.

На микромасштабном уровне сложная структура коллагена представлена коллагеновыми волокнами и их пучками. АСМ-исследования внеклеточного матрикса при различных патологических процессах показали, что изменения в расположении коллагеновых волокон могут визуализироваться с помощью АСМ в масштабах от микрон до десятков микрон [157]. С помощью метода АСМ было проведено сравнение морфологий контрольных и облученных образцов.

Исследование АСМ-визуализации, применяемое для отслеживания изменений после влияния различных доз ионизирующего излучения, при дозе в 25 кГр выявило изменения коллагеновых волокон и разрушение матрикса.

Другой характеристикой коллагена, которая поддается исследованию с



помощью АСМ, является расстояние между D-периодами фибрилл. D-период коллагена создает осциллирующую топографию поверхности с характерным осевым расстоянием повторения 67 нм. АСМ-измерения D-периода в костном коллагене дали значения, которые соответствовали теоретическому значению в  $67 \pm 2$  нм,  $66,5 \pm 1,4$  нм и  $66,6 \pm 3,8$  нм.

Используя периодическую природу D-интервала, для точного выделения D-интервала отдельных коллагеновых фибрилл было использовано 2D преобразование Фурье. Используя этот метод, обнаружено, что независимо от клеточного происхождения или анатомического расположения нормальные ткани на основе коллагена I типа (включая кость) содержат распределение D-периодических промежутков. В образцах костей наблюдались статистически неразличимые распределения. Наличие этих распределений подсказало нам, что эта метрика может представлять собой средство для наблюдения изменений, которые происходят при изменениях в кости на наноуровне.

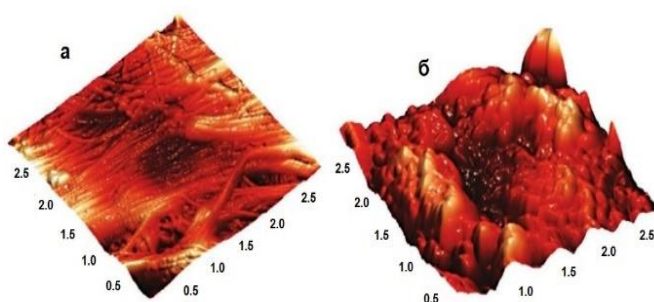
**Атомно-силовая микроскопия, отслеживающая коллагеновые фибриллы в нормальной и измененной костной ткани после воздействия стандартных доз стерилизации облучения.** Чтобы изучить коллагеновые волокна, их толщину и внутреннюю структуру коллагеновых волокон, были получены топографические изображения высокого разрешения. Как показано на следующих примерах, структура коллагеновых фибрилл также чувствительна к патологическим процессам в соединительной ткани.

При исследовании АСМ-визуализация показала, что у коллагеновых волокон костной ткани преобладает хаотическое переплетение фибрилл и пучков фибрилл. В экспериментальной группе после влияния ионизирующего излучения коллагеновые фибриллы деформируются, фрагментируются и укорачиваются по сравнению с контролем. Визуализация с высоким разрешением также использовалась для изучения деталей пучков плотно упакованного коллагена.

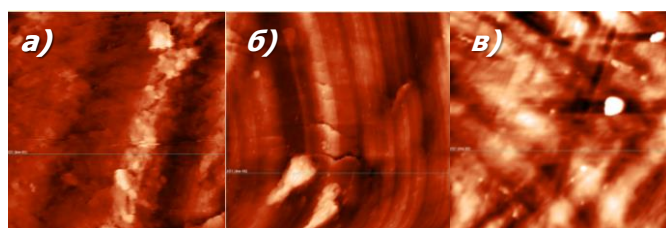
Повышение дозы радиации было связано со снижением уровня белка и прочности на сжатие, а также с увеличением неровностей поверхности. Полученные данные свидетельствуют о том, что обработанная при высокой дозе

кость, вероятно, будет быстро разрушаться.

Радиационно-индуцированное разрушение костной ткани значительно на уровне коллагеновых фибрилл, что продемонстрировано АСМ-визуализацией высокого разрешения. С увеличением дозы облучения коллагеновые фибриллы имеют тенденцию утолщаться и терять свое первоначальное локальное плотное расположение. Полная потеря плотной упаковки фибрилл и полное покрытие коллагеновых фибрилл толстым непрерывным слоем неструктурированного белкового материала после высокой дозы облучения продемонстрировано на рисунках 35-38.



**Рис. 35.** Пример 3D изображений атомно-силовой микроскопии, демонстрирующих изменение наноструктуры внеклеточного матрикса (коллагеновых фибрилл), вызванное влиянием радиации: а) контроль; б) действие радиации 20 кГр (разрешение, 2 мкм).



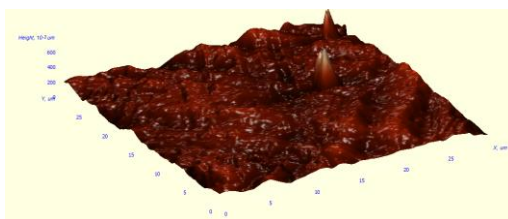
**Рис. 36.** а – АСМ-визуализация необлученного образца, б – облученный образец (12) кГр, в – облученный образец (25) кГр. Изображения структуры коллагеновых фибрилл демонстрируют изменения поверхности костного образца.

Рисунок 35 демонстрирует разницу между контрольным и облученным образцом костной ткани из-за присутствия большого количества неволокнутого материала, покрывающего коллагеновые волокна в стабильном образце.

Неволокнистый материал (контрольный образец) обеспечивает более плотную упаковку фибрилл и волокон и, следовательно, механическую стабильность, в отличие от неплотно упакованных коллагеновых структур в облученном образце, что влияет на склонность к разрыву. Данные изменения особенностей микроструктуры внеклеточного матрикса (коллагеновые волокна) связаны с увеличением дозы.

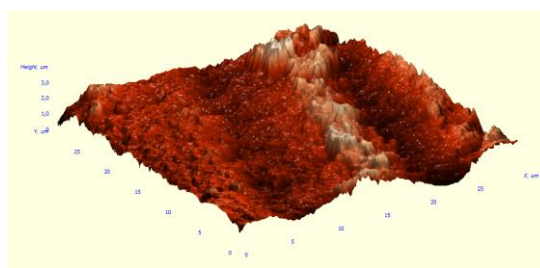
Коллагеновые волокна внеклеточного матрикса кости образуют характерный волнистый рисунок, в котором пучки волокон плотно переплетены. Коллагеновые фибриллы внутри волокон частично покрыты неструктурированным белковым материалом и частично обнажены, структура упаковки фибрилл на наноуровне (видимая в обнаженных областях) в целом напоминает структуру коллагеновых волокон, наблюдаемую на микромасштабе.

После облучения 12 кГр обнаружено уменьшение доли непокрытых областей и появление областей, полностью покрытых толстым слоем неструктурированного материала.



**Рис. 37.** Топографическое изображение поверхности костного материала при воздействии дозы облучения (12) кГр.

При дозе облучения 25 кГр произошли кардинальные изменения на всех уровнях организации коллагена в костной ткани. В отличие от костной ткани, облученной дозой 12 кГр, коллагеновые волокна имели тенденцию к слипанию в толстые локально ориентированные пучки значительной ширины. АСМ-изображения с высоким разрешением выявили плотно упакованные фибриллы с преимущественно параллельной упаковкой внутри таких волокон. В некоторых регионах коллагеновые фибриллы сохранили свою первоначальную трехмерную сеть (3D), в других регионах сферические белковые частицы покрывали фибриллы.

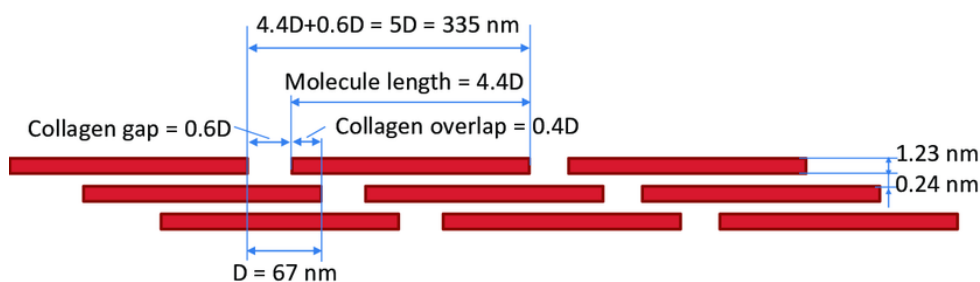


**Рис. 38.** Топографические изображения образцов кости, морфология изменяется после воздействия дозой облучения (25 кГр).

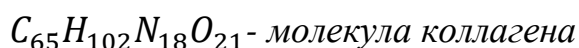
Полученные АСМ-изображения наноструктуры коллагеновых фибрилл, демонстрируют изменение поверхности костного материала (наноструктуры коллагеновых фибрилл), вызванное влиянием радиации при воздействии дозы облучения (20) кГр.

В настоящей работе с помощью атомной силовой микроскопии были исследованы образцы костной ткани в целях улучшения качества пробоподготовки. Протестированы различные физико-механические способы резки образцов. Сравнительный анализ выявил преимущества способа гидродинамической инцизии обработки костных образцов.

В результате исследования методом атомной силовой микроскопии (АСМ) было обнаружено изменение поверхностного рельефа костных образцов после воздействия радиации.



**Рис. 39.** Схематическое изображение коллагеновых структур.



Данные других авторов [23] свидетельствуют о нарушении морфологической структуры коллагена после радиационного воздействия с дозой выше 15 кГр. Анализ экспериментальных данных дает основание предполагать, что

изменение структуры коллагена частично может быть объяснено изменением расстояния между молекулами коллагена. В работе сделана попытка построить математическую модель, которая описывает изменения межмолекулярных взаимодействий коллагена при воздействии радиации.

Известно, что молекула коллагена образуется из тройной спиральной области и 2 неспиральных областей на обоих концах спиральной структуры.

Для обоснования возможного механизма деструктивного действия радиации с нарастающими дозами на структуру коллагена, используем следующий подход. Заряд диполя определяется с помощью формулы молекулы коллагена ( $C_{65}H_{102}N_{18}O_{21}$ ):  $q = 786e$ . Рассматриваем молекулу коллагена как полярную молекулу и оцениваем дипольный момент молекулярной структуры коллагена как:

$$p = bql \quad (1)$$

где  $p$  – электрический дипольный момент;  $b$  – const для оценки дипольного момента;  $q$  – заряд;  $l$  – длина молекулы и длина диполя;

Поглощенную энергию образца можем представить, как:

$$E_{\text{погл}} = Dm, \quad (2)$$

где  $E_{\text{погл}}$  – общая поглощенная энергия образца;  $D$  – поглощенная доза;  $m$  – масса образца.

Учитывая то, что масса образца 1,77 г, доза поглощения 10 кГр:

$$E_{\text{погл}} = 10 \cdot 10^3 \cdot 1,77 \cdot 10^{-3} = 17,7 \text{ Дж} \quad (3)$$

где  $d = 67$  нм – известное расстояние между молекулами коллагена, а исходное расстояние между центрами диполей (центрами двух полярных молекул коллагена) до облучения ( $r_1$ ):

$$r_1 = d + l = 67 + 300 \quad (4)$$

Здесь  $N$  – количество молекул в образце,  $M$  – молекулярная масса коллагена (300 кДа), соответственно:

$$N = \frac{m}{M} = \frac{1,77 \cdot 10^{-3}}{4,8 \cdot 10^{-22}} = 0,36 \cdot 10^{19} \quad (5)$$

Если  $r_1$  – исходное расстояние между центрами диполей (центрами двух полярных молекул коллагена) до облучения, то  $r_2$  – расстояние между центрами

диполей (центрами двух полярных молекул коллагена) после облучения. Установлено, что при увеличении дозы, увеличивается расстояние  $r_2$  (т.е., расстояние между молекулами при воздействии радиации).

Исходя из того, что потенциальную энергию межмолекулярного взаимодействия можно представить, как:  $U = -\frac{A}{r^6}$ , где  $U$  – потенциальная энергия взаимодействия между молекулами,  $A = \frac{2 p^4}{3 kT}$ ;  $k = 1,38 \cdot 10^{-23} \frac{\text{Дж}}{\text{К}}$  – постоянная Больцмана.

$$T = 27 + 273 = 300 \text{ K} \quad (6)$$

В качестве исходного соотношения мы выбираем формулу Лондона для  $A$ , которая описывает межмолекулярные взаимодействия:

$$U = -\frac{A}{r^6} \quad (7)$$

$U$  – потенциальная энергия взаимодействия между молекулами,

$U_1$  – до облучения,  $U_2$  – после облучения:

$$U_1 = -\frac{2 p^4}{3 kT} / r_1^6, \quad U_2 = -\frac{2 p^4}{3 kT} / r_2^6$$

Зная характеристики молекулы коллагена (размеры, плотность, молекулярная масса), используем формулу закона сохранения энергии, находим дипольный момент и находим  $A$ :

$$A = \frac{2 p^4}{3 kT} \quad (8)$$

Подставляем  $A$  в формулу закона сохранения энергии:

$$U_1 = U_2 + E_{\text{погл}}^* \quad (9)$$

$$U_2 = U_1 - E_{\text{погл}}^* \quad (10)$$

$$\frac{A}{r_1^6} = \frac{A}{r_2^6} + E_{\text{погл}}^* \quad (11)$$

где  $E_{\text{погл}}^*$  – поглощенная энергия молекулярной структуры.

$$\frac{A}{r_2^6} = \frac{A}{r_1^6} - E_{\text{погл}}^*$$

$$r_2^6 = \frac{A}{\frac{A}{r_1^6} - E_{\text{погл}}^*}, \quad r_2 = \sqrt[6]{\frac{A}{\frac{A}{r_1^6} - E_{\text{погл}}^*}}$$

Конечная формула, определяющая отношение расстояний между центрами диполей до и после облучения, имеет вид:

$$r_2 = \sqrt[6]{\frac{A}{\frac{A}{r_1^6} - \frac{E_{\text{поглс}}}{2N}}}, \quad (12)$$

где  $\frac{E_{\text{поглс}}}{2N}$  – поглощенная энергия молекулярной структуры, рассчитывается на основе эквивалентной дозы путем умножения поглощенной дозы на коэффициент  $k$ , отражающий способность данного вида излучения повреждать костную ткань, а также коэффициента, учитывающего расположения центра масс диполя ( $b$ ) молекулярной структуры коллагена;  $N$  – количество молекул в образце,  $N = \frac{m}{M} = \frac{1,77 \cdot 10^{-3}}{4,8 \cdot 10^{-22}} = 0,36 \cdot 10^{19}$ ;  $M$  – молекулярная масса коллагена = 300 кДа,  $c = k \cdot b$  – постоянная, которая определяет в совокупности особенность поглощающей способности костной ткани ионизирующего излучения и учет сложной структуры молекулы коллагена при определении его дипольного момента.

Решения этого уравнения с подстановкой  $r_2$  дает возможность получить оценку изменения расстояний  $\Delta r$ . Находим расстояние ( $\Delta r$ ) на которое оттолкнутся молекулы после радиационного воздействия. Конечная формула, определяющая отношение расстояний между центрами диполей до и после облучения, имеет вид:

$$r_2 - r_1 = \sqrt[6]{\frac{A}{\frac{A}{r_1^6} - E_{\text{погл}}^*}} - r_1, \quad (13)$$

$$\Delta r = r_2 - r_1, \quad (14)$$

На основании итоговой полученной формулы (14), которая определяет расстояние между структурами коллагена, произведён расчет для различных значений доз поглощения. Численные значения этих расстояний, рассчитанные по данной формуле, приведены в таблице 19.

При изменении дозы поглощения, меняются расстояния между молекулами, которые, в основном, и будут определять изменения профиля образца при исследовании методом АСМ. При увеличении дозы, увеличивается расстояние  $r_2$  (расстояние между молекулами при воздействии радиации).

Таким образом, на основании итоговой полученной формулы, произведем расчет для различных значений дозы поглощения  $D$ :

$$E_{\text{погл}}^* = \frac{E_{\text{погл}} c}{2N}$$

При  $D=10$  кГр:

$$\text{для } D=10 \text{ кГр, } E_{\text{погл}} = 17,7 \text{ Дж}$$

$$E_{\text{погл}}^* = c \cdot 24,7 \cdot 10^{-19}$$

$$\frac{E_{\text{погл}}^*}{2N} = \frac{17,7 \text{ Дж}}{2 \cdot 0,36 \cdot 10^{19}} = 24,7 \cdot 10^{-19} \text{ Дж}$$

$$p = b \cdot 728 \cdot 1,6 \cdot 10^{-19} \cdot 300 \cdot 10^{-9} = b \cdot \lambda \text{ (коэффициент } \lambda \text{ введен для удобства в проведении численных расчетов)}$$

$$p = b \cdot \lambda;$$

$$\lambda = 1,02 \cdot 10^{-22}$$

$$\alpha = \frac{2}{3kT} = 1,6 \cdot 10^{20}$$

$$\lambda^4 \cdot \alpha = 1,7 \cdot 10^{-62}$$

$$A = \frac{2 p^4}{3 kT}$$

$$A = b^4 \cdot \lambda^4 \cdot \alpha = b^4 \cdot 1,7 \cdot 10^{-62}$$

$$r_2 = \sqrt[6]{\frac{A}{\frac{A}{r_1^6} - E_{\text{погл}}^*}}; \quad r_1 = 335 \cdot 10^{-9} \text{ м}$$

$$r_2 = \sqrt[6]{\frac{b^4 \cdot 1,7 \cdot 10^{-62}}{\frac{b^4 \cdot 1,7 \cdot 10^{-62}}{(335 \cdot 10^{-9})^6} - 24,7 \cdot 10^{-19} c}} = \sqrt[6]{\frac{b^4 \cdot 1,7 \cdot 10^{-62}}{b^4 \cdot 1,13 \cdot 10^{-23} - 24,7 \cdot 10^{-19} c}}$$

$$= \sqrt[6]{\frac{b^4 \cdot 1,7 \cdot 10^{-62}}{10^{-19}(b^4 \cdot 1,13 \cdot 10^{-4} - 24,7c)}} = \sqrt[6]{\frac{b^4 \cdot 1,7 \cdot 10^{-43}}{b^4 \cdot 1,13 \cdot 10^{-4} - 24,7c}}$$

$$\text{Для } b=30, c=(190)^{-1}$$

$$r_2 = \sqrt[6]{\frac{10^4 \cdot 1,7 \cdot 10^{-43}}{10^4 \cdot 1,13 \cdot 10^{-4} - 24,7 \cdot \frac{1}{190}}} = \sqrt[6]{\frac{1,7 \cdot 10^{-39}}{1,13 - 0,13}} = 345 \text{ нм}$$



$$\Delta r = r_2 - r_1 = 345 \text{ нм} - 335 \text{ нм} = 10 \text{ нм}$$

$$D=20 \text{ кГр}$$

$$\text{для } D=20 \text{ кГр}, E_{\text{погл}} = 35,4 \text{ Дж}$$

$$b=30, c = \frac{1}{190}$$

$$E_{\text{погл}}^* = c \cdot 49,4 \cdot 10^{-19} \text{ Дж}$$

$$r_2 = \sqrt[6]{\frac{10^4 \cdot 1,7 \cdot 10^{-43}}{1,13 - 0,26}} = \sqrt[6]{\frac{1,7 \cdot 10^{-39}}{0,87}} = 353 \text{ нм}$$

$$D=5 \text{ кГр}$$

$$\text{для } D=5 \text{ кГр}, E_{\text{погл}} = 8,85 \text{ Дж}$$

$$b=30, c = \frac{1}{190}$$

$$E_{\text{погл}}^* = c \cdot 12,35 \cdot 10^{-19} \text{ Дж}$$

$$r_2 = \sqrt[6]{\frac{10^4 \cdot 1,7 \cdot 10^{-43}}{1,13 - 0,065}} = 341 \text{ нм}$$

$$D=25 \text{ кГр}$$

$$\text{для } D=25 \text{ кГр}, E_{\text{погл}} = 62,5 \text{ Дж}$$

$$b=30, c = \frac{1}{190}$$

$$E_{\text{погл}}^* = c \cdot 61,75 \cdot 10^{-19} \text{ Дж}$$

$$r_2 = \sqrt[6]{\frac{10^4 \cdot 1,7 \cdot 10^{-43}}{1,13 - 0,325}} = 359 \text{ нм}$$

Результаты этих расчетов сведены в таблицу 19. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что имеет место монотонное увеличение этих расстояний при воздействии возрастающих доз поглощения при радиационном воздействии. Такой результат может рассматриваться как обоснование возможного механизма деструктивного действия излучения в выбранном диапазоне дозовой нагрузки на структуру коллагена.

**Таблица 19.** Зависимость изменения межмолекулярного расстояния  $\Delta r$  от

значений величины поглощённой дозы.

Доза, кГр	Расстояние $\Delta r$ , нм
5	6
10	10
20	18
25	24

Таким образом, проведенные на основании разработанной модели расчеты показывают, что при увеличении радиационного воздействия увеличиваются расстояния между волокнами коллагена, что может рассматриваться как один из возможных физических механизмов деградации коллагена с ростом дозовой нагрузки, что согласуется с данными других авторов [21-25]. Предположения модели могут быть подтверждены с помощью инструментальной оценки изменений рельефа поверхности кости при воздействии радиации.

### **3.5. Изучение характеристик образцов и микробиологический анализ**

Комплексные исследования параметров изменения морфо-механических характеристик (микротвердости) поверхности костных фрагментов после различных видов стерилизующих воздействий в указанных выше диапазонах варьирования параметров (концентрация озона в озono-кислородной смеси, значение дозы облучения) [25] показали следующие результаты (таблица 20).

Анализ представленных данных позволяет заключить, что селективное стерилизующее воздействие озонowego воздействия (с концентрацией 6 – 8 мг/л и временем обработки 15 – 20 минут) и радиации вплоть до величины поглощенной дозы 20 кГр, а также их сочетанное последовательное воздействие не приводят к существенным изменениям упруго-пластических характеристик поверхности костного фрагмента. Вместе с тем, при обработке костного образца ионизирующим излучением с дозовой нагрузкой 25 кГр (как отдельно, так и в сочетании с озонowym воздействием) отмечается тенденция снижения показателя микротвердости. Приведённые данные соответствуют результатам других

исследователей [21-25].

Таким образом, изучение закономерностей изменения структурно-функциональных характеристик поверхностного слоя (микротвердости) костных фрагментов после различных видов стерилизующих воздействий в указанных выше диапазонах варьирования параметров стерилизации (концентрация озона в озono-кислородной смеси, значение дозы облучения) и обобщение полученных данных [28, 134, 158-173], позволяет получить представление о тенденциях происходящих изменений в поверхностных слоях и усреднённые результаты, их характеризующие (таблица 20).

**Таблица 20.** Величина микротвердости поверхностного слоя костного фрагмента после различных видов стерилизующих воздействий.

№ п/п	Вид и параметры обработки костного фрагмента	Параметры обработки (доза облучения, кГр)	Микротвердость, МПа ( $M \pm \Delta M$ )
1	Контрольный образец (нативная кость)	-	$553 \pm 1$
2	Озоновая стерилизация (8 мг/л)	-	$550 \pm 1$
3	Радиационная стерилизация (быстрые электроны)	12 кГр	$549 \pm 2$
4	Комбинированный способ стерилизации	12 кГр	$547 \pm 2$
5	Радиационная стерилизация (быстрые электроны)	15 кГр	$545 \pm 2$
6	Комбинированный способ стерилизации	15 кГр	$541 \pm 2$
7	Радиационная стерилизация (быстрые электроны)	20 кГр	$539 \pm 2$
8	Комбинированный способ стерилизации	20 кГр	$518 \pm 2$
9	Радиационная стерилизация (быстрые электроны)	25 кГр	$530 \pm 2$
10	Комбинированный способ стерилизации	25 кГр	$510 \pm 2$

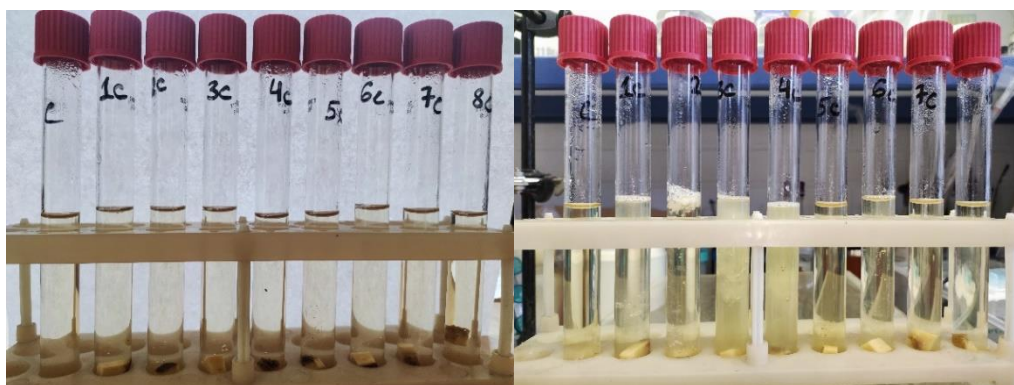
*Проведение микробиологического тестирования  
стерильности исследуемых образцов*

После прохождения различных видов стерилизаций, в том числе

предлагаемого для комбинированного метода, было проведено микробиологическое тестирование образцов на стерильность с использованием среды Сабуро и тиогликолевой среды.

Все методические работы были выполнены на нативном костном материале быка, а затем были проведены тестовые эксперименты на образцах костей ископаемого Малоляховского мамонта из коллекции Музея мамонта (данный мамонт считается одним из самых древних и сохранившихся).

Удалось вырезать пригодные для исследований фрагменты мамонтовой кости и осуществить их обработку различными стерилизующими веществами, а последующие микробиологические исследования показали, что большую эффективность показал метод комбинированной радиационной стерилизации в случае контаминации в виде грибов (именно грибы наиболее распространены в тканях ископаемых животных) с заданными параметрами озоновой и радиационной обработки.

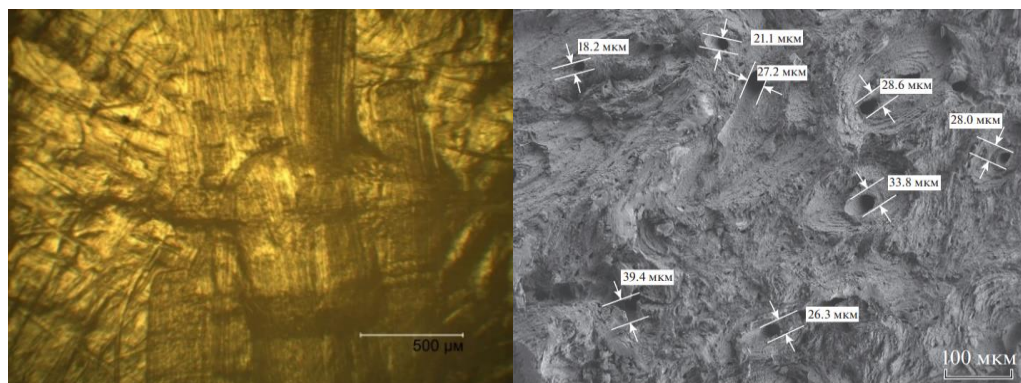


**Рис. 40.** Рост на среде Сабуро: а) посев; б) 8 день инкубации.

После проведенных наблюдений стопроцентную стерильность показали экспериментальные образцы, прошедшие комбинированное воздействие с заданными параметрами озоновой и радиационной обработки. При этом, во избежание проявления негативных эффектов воздействия, рекомендуются использовать поглощенную дозу с величиной от 12 кГр.

### **3.6. Промежуточные результаты пробоподготовки и анализ методов изготовления костных образцов**

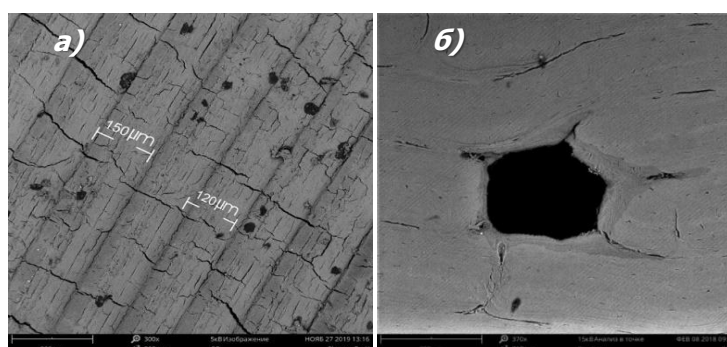
Был также проведен анализ результатов пробоподготовки, который продемонстрировал морфологии поверхностей с разной степенью пригодности для последующих экспериментов.



**Рис. 41.** Общий вид поверхности образца бедренной бычьей кости на поперечном срезе после механической обработки: а) с помощью оптического микроскопа б) с помощью РЭМ при увеличении  $\times 150$ .

### *Пробоподготовка*

В целях улучшения качества пробоподготовки были протестированы различные методы механической обработки костных фрагментов разной формы. Были использованы: традиционно применяемый для подготовки образцов зубчатый диск (рис.43а), алмазная фреза (рис.43б) и др.



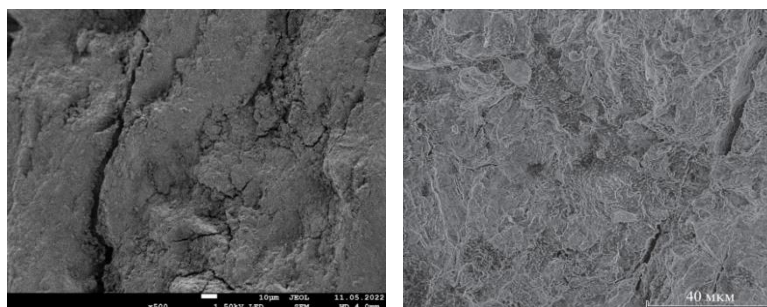
**Рис. 42.** Снимок микроструктуры поверхностей костных тканей ( $\times 300$ ) [174].

Полученные результаты показывают, что:

- зубчатый диск оставляет частые широкие параллельные борозды по всей площади образцов, при мех.испытаниях отпечатки индентора плохо определяются;

- алмазная фреза оставляет более ровные отпечатки с малыми размерами.

Полученные результаты пробоподготовки образцов демонстрируют, что несмотря на хорошую сохранность костной ткани при использовании данных физико-механических способах обработки, включая более щадящую дисковую фрезу с алмазным напылением, наблюдаются заметные изменения морфологии поверхностей. В связи с этим, к используемым методикам пробоподготовки была добавлена технология гидродинамического способа резки.



**Рис. 43.** РЭМ-снимок образца костной ткани: а) после механической обработки; б) Общий вид поверхности образца бедренной бычьей кости на поперечном срезе после гидродинамической резки.

Таким образом, получены снимки костных фрагментов с помощью растровой электронной микроскопии после гидродинамической инцизии, при условии соблюдения соответствующих технологических режимов, поверхность кости гладкая, ровная, без видимых морфологических изменений костных структур при изучении их не только на макро-, но и микроскопическом уровнях, что подтверждается результатами электронной микроскопии (рис. 43).

Данная технология создает условия для получения высококачественного костного образца с необходимыми морфо-механическими характеристиками его поверхностного слоя.

### **Практические рекомендации для комбинированной радиационной стерилизации костных фрагментов**

Для проведения комбинированной радиационной стерилизации мамонтовой и др. кости в целях сохранения морфо-механических характеристик, коллагена и т.д. при эффективной инактивации бактерий и вирусов рекомендуется

использовать комплексную озоновую и радиационную (пучки быстрых электронов) обработку в следующих параметрах (рекомендуется 2 этапа):

1) Первый этап. Для озоновой смеси оптимальной является концентрация озона от 6 до 8 мг/г в промежутках от 10 до 25 минут. Технические характеристики необходимого оборудования приведены ниже (таблица 22).

2) Второй этап. Стерилизация пучками электронов обеспечивает нужную дозу (12 кГр) за короткий период времени (до 5 мин.), при этом для обеспечения равномерности распределения поглощенной дозы требуется вращение облучаемого образца (таблица 21).

**Таблица 21.** Некоторые выбранные параметры и их оптимальные значения [85].

Параметры	Оптимальные значения параметров (при двустороннем облучении)			
Толщина образца, мм	до 8 мм	до 6 мм	до 4 мм	до 10 мм
Энергия пучка, МэВ	2 МэВ	1,5 МэВ	1 МэВ	2,5 МэВ

Для проведения второго этапа комбинированной радиационной стерилизации с помощью пучков быстрых электронов были использованы предварительные модельные расчеты на GEANT4 и выделены следующие основные параметры:

- толщина образца;
- энергия пучка;
- расстояние от источника ионизирующего излучения до объекта.

Данные модельные расчеты использовались для стерилизации костных фрагментах мамонтовой кости в лабораторных условиях. Были также получены результаты анализа механических обработок при пробоподготовке (в частности, с помощью гидродинамической резки костной ткани, особенно подходящую для бережного и щадящего выделения костных фрагментов хрупких ископаемых образцов) для повышения качества образцов.

Для возможности практической реализации обработки больших объемов материала в музейных лабораториях (Всемирный центр мамонта), музеях с криохранилищем и др. требуется специальное оборудование, например, установка

озоновых пушек.

Установка представляет собой электрический аппарат, включающий высоковольтный источник питания и озонатор, образование озона происходит при подаче на электроды высокого напряжения (6 – 8 кВ) высокой частоты, под действием которого возникает электрический разряд. Проходя через данный промежуток, молекулы кислорода воздуха попадают под ионизирующее действие электрического поля с высоким потенциалом. Данный процесс приводит к образованию озона.



**Рис. 44.** Озоновая пушка

Озоновая пушка представляет собой переносное устройство в форме цилиндра переменного диаметра с длиной 80 см и массой не более 7 кг (рисунок 44). Прибору необходимо 10 – 30 мин. для полного озонирования помещения в зависимости от объёма (генератор озона работает с производительностью до 20 г/ч).

**Таблица 22.** Технические характеристики оборудования (озоновая пушка):

Параметр	Значение параметра
Концентрация озона	до 50 мг/л
Емкость баллона	1 л
Источник питания	220 В
Размеры и вес	350 x 220 x 110 мм; 4,5 кг
Расход кислорода	0,5 л/мин
Запас кислорода	200 л
Запас кислорода	400 минут (время)

\*погрешность измерения концентрации не более 10%

Анализ полученных результатов показал, что селективное озоновое воздействие не влияет на морфологию и физические параметры костных



фрагментов, являясь эффективным и качественным средством стерилизации и экологически чистым. Образцы не подвергаются деструктивному воздействию химических веществ. Комбинированный радиационный метод обеспечивает высокий уровень безопасности, качественное удаление патогенных микробов при высокой скорости и практически отсутствием побочных эффектов.

Представленная технология комбинированной радиационной стерилизации, отработанная в лабораторных условиях, имеет реальные возможности для практического применения и может быть рекомендована для использования в практических работах на реальных образцах в Музее Мамонта (с учетом их масштабов и объемов) и на основе предыдущих исследований и опыта, радиационной обработки мамонтенка Хрома и др., а также перспективных возможностей озоновой обработки больших объемов с применением озоновой пушки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведённых исследований свидетельствуют о возможности применения комбинированной технологии радиационной стерилизации с использованием озono-кислородной смеси определенного состава на первом этапе и радиационного воздействия на втором этапе для обработки образцов костной ткани современных и древних животных.

Установлена рекомендуемая доза поглощения (12 кГр), время обработки, концентрация озона и другие параметры для эффективной и безопасной комбинированной радиационной стерилизации костных фрагментов.

Результаты исследования изменений морфологии, механических характеристик и элементного состава поверхности костной ткани при радиационном воздействии селективно и в комбинации с озоновой обработкой подтверждают данные других авторов о деструктивных изменениях, связанных с радиационным воздействием при величине поглощенной дозы 15 кГр и выше.

С помощью ИК-спектроскопии проведена оценка остаточного коллагена в образцах костей. Показано, что использование комбинированной радиационной стерилизации таких образцов с оптимизированными параметрами воздействия не приводит к снижению содержания коллагена в костной ткани древних животных. Изменения фиксируются при радиационном воздействии с большими (более 15 кГр) значениями поглощенной дозы. Разработанная модель подтверждает полученные результаты о расслоении коллагеновых фибрилл при увеличении дозовой нагрузки.

Разработаны практические рекомендации по использованию комбинированной радиационной стерилизации на основании полученных экспериментальных данных по возможности и оптимизации применения метода для ископаемых биообъектов.

Изучено влияние озono-кислородной смеси на первом этапе комбинированной стерилизации костных фрагментов на поверхность. Показано, что в выбранном диапазоне параметров (концентрация озона 6-8 мг/л,

продолжительность обработки до 20 минут) воздействие озона не приводит к морфологическим изменениям поверхности образца, отмечен рост содержания кислорода в поверхностных слоях костного образца, что создает условия для повышения эффективности радиационной обработки за счет действия кислородного эффекта при снижении общей дозовой нагрузки. Модельные исследования подтвердили возможность проникновения озона в толщу костных тканей в условиях существования развитой поровой структуры. Это приводит к повышению содержания кислорода не только на поверхности, но в объеме костной ткани и за счет кислородного эффекта – к повышению эффективности радиационного воздействия.

Подтверждена эффективность метода стерилизации на образцах мамонтовой кости после проведения микробиологических исследований (особенно для случая контаминации микроскопическими грибами). Получены результаты исследования механических способов обработки при пробоподготовке для повышения качества образцов. Сравнительный анализ поверхностного слоя костных тканей после разных видов механической обработки показал, что при гидродинамической резке, поверхность кости характеризуется минимальными морфологическими изменениями. Данный способ подходит для бережного и щадящего выделения костных фрагментов хрупких ископаемых образцов.

Результаты исследований костной ткани современных и древних животных (ИК-спектры коллагена, РЭМ-снимки, элементный состав) позволяют получить и анализировать новую информацию о молекулярном строении и составе костной ткани при радиационном воздействии в сочетании с озоном и использовать для развития технологии сохранения палеонтологических останков.

Таким образом, с использованием современных физических методов проведены комплексные экспериментальные исследования характеристик поверхности костных материалов, определена наиболее эффективная методика стерилизации биообъектов и установлены оптимальные параметры технологии комбинированной радиационной стерилизации для древней ископаемой кости, при которых не происходят морфологические и механические изменения костных

структур. Данный метод позволяет заменить или резко снизить использование токсичных химических препаратов, которые разрушительно влияют на биологические образцы.

Результаты исследований подтверждают перспективность использования комбинированной технологии обработки для стерилизации ископаемых образцов (с установленными оптимальными параметрами), позволяющей в максимальной степени сохранить нативные свойства и характеристики костного материала и при этом обеспечить эффективное подавление патогенов, безопасность последующих контактов и работы исследовательского персонала.

Синергетический эффект воздействия стерилизующих факторов (озон + ионизирующее излучение) достигается за счет эффективного ослабления популяции патогенов и снижения их радиорезистентности во время первоначального воздействия озона, что усиливает последующий эффект облучения. Кроме того, существенную роль играет кислородный эффект, который усиливает эффективность радиационного воздействия в поверхностной области и по объему костного фрагмента. В результате при этом обеспечивается возможность снижения дозовой нагрузки на втором этапе процесса комбинированной стерилизации до значений (11 – 12) кГр для достижения необходимого уровня стерильности костных фрагментов без существенных структурно-функциональных изменений.

## ВЫВОДЫ

С использованием современных методов, технологий, приборов и оборудования проведены комплексные экспериментальные исследования изменения морфо-механических характеристик и элементного состава поверхности костных материалов в результате селективного и сочетанного воздействия стерилизующих факторов комбинированной радиационной обработки (озон + радиация). В используемой технологии с применением озонowego воздействия не установлены изменения морфо-механических характеристик костных образцов. Вместе с тем отмечены изменения в процентном содержании элементного состава и в первую очередь – значительный рост содержания кислорода. В результате происходит усиление стерилизующего эффекта радиационного воздействия. Синергетический эффект воздействия различных стерилизующих факторов достигается также за счет эффективного ослабления популяции патогенов и снижения их радиорезистентности во время первоначального воздействия озона, что усиливает последующий эффект облучения. В результате при этом обеспечивается возможность снижения дозовой нагрузки на втором этапе процесса комбинированной стерилизации до значений (11 – 12) кГр, что также не вызывает существенных структурно-функциональных изменений при обеспечении необходимого уровня стерильности костных фрагментов.

Методом ИК-спектроскопии удалось показать, что использование комбинированной радиационной стерилизации позволяет снизить необходимую величину поглощенной дозы до значений менее 15 кГр, что в свою очередь способствует сохранению костного коллагена в обрабатываемых костных фрагментах.

На основании полученных экспериментальных данных и результатов ранее осуществленных модельных оценок выработать практические рекомендации по возможности и оптимизации применения комбинированной радиационной стерилизации для обработки образцов костных материалов.

Проведены пилотные эксперименты, подтвердившие возможность применения комбинированного радиационного метода стерилизации биологических образцов мамонта с использованием сочетанного (озон + радиация) воздействия. Полученные в данном исследовании результаты свидетельствуют об актуальности и перспективности использования технологий комбинированной стерилизации костных материалов для более длительного их хранения и обеспечения возможностей более полных и информативных дальнейших исследований.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Тихонов, А. Н. Мамонт / А. Н. Тихонов. – Москва ; Санкт-Петербург : Т-во научных изданий КМК, 2005. – 90 с. – (Серия: Разнообразие животных. Вып. 3).
2. Государственная программа Российской Федерации «Социально-экономическое развитие Арктической зоны Российской Федерации», утверждена постановлением Правительства Российской Федерации от 30.03.2021 г. № 484. – URL: <https://minvr.gov.ru/activity/gosprogrammy/sotsialno-ekonomicheskoe-razvitie-arkticheskoy-zony/>.
3. Указ Президента Российской Федерации от 26.10.2020 г. № 645 «О Стратегии развития Арктической зоны Российской Федерации и обеспечения национальной безопасности на период до 2035 года». – URL: <https://base.garant.ru/74810556/>.
4. Распоряжение Правительства РФ от 15.04.2021 № 996-р (ред. от 09.12.2023) «Об утверждении Единого плана мероприятий по реализации Основ государственной политики Российской Федерации в Арктике на период до 2035 года и Стратегии развития Арктической зоны Российской Федерации и обеспечения национальной безопасности на период до 2035 года». – URL: [https://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_382471/5fa8d1b8101e5c69c2c917c0907f691801bbdc59/](https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_382471/5fa8d1b8101e5c69c2c917c0907f691801bbdc59/).
5. Указ Президента Российской Федерации от 28.02.2024 № 145 «О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации». – URL: <http://publication.pravo.gov.ru/document/0001202402280003>.
6. Указ Главы Республики Саха (Якутия) от 16.09.2019 г. № 740 о создании Научно-образовательного центра «СЕВЕР: территория устойчивого развития». – URL: <https://nocsever.com/>.
7. Указ Президента Российской Федерации от 11.03.2019 N 97 «Об Основах государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу». – URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72092478/>.
8. Всемирный центр мамонта включен в Стратегию развития Арктической зоны

РФ. – URL: <https://ноц.рф/en/news/vsemirni-centr-mamonta-vklychen-v-strategiy-razvitiya-arkticheskoi-zoni-rf1606894778>.

9. Распоряжение Правительства РФ от 24 сент. 2020 г. № 2464-р «Об утверждении Национальной программы социально-экономического развития Дальнего Востока на период до 2024 г. и на перспективу до 2035 г.». – URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/74587526/>.

10. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 29.12.2023 № 4073-р. Номер опубликования: 0001202401090009. Дата опубликования: 09.01.2024.

11. Организационно-методологические и научно-методические подходы в микробиологическом и гистоморфологическом сопровождении проекта «Мамонт» / В. Ф. Чернявский, В. Е. Репин, В. Г. Пугачев [и др.] // Юкагирский мамонт : результаты первого этапа научных исследований. – Якутск, 2004. – С. 26–27.

12. Liu Y. A genome and gene catalog of glacier microbiomes. / Y. Liu, M. Ji, T. Yu et al. // *Nature Biotechnology*. – 2022. – V. 40. – № 9. – P. 1341-1348.

13. Едидин, Г. М. Филогенетический анализ микроорганизмов из мерзлых грунтов / Г. М. Едидин, А. В. Брушков, С. Г. Игнатов // *Вестник Московского университета. Серия 4: Геология*. – 2016. – № 5. – С. 92–95.

14. Kolosov P.N. The Ancestors of Cryptococci Appeared on Earth 600 Million Years Ago. / P.N. Kolosov. // *Open Access Library*. – 2022. – V. 9. – P. e9125.

15. Shatilovich A. A novel nematode species from the Siberian permafrost shares adaptive mechanisms for cryptobiotic survival with *C. elegans* dauer larva. / A. Shatilovich, V.R. Gade, M. Pippel et al. // *PLoS Genetics*. – 2023. – V. 19. – № 7. – P. e1010798.

16. Розанов, В. В. Современное состояние и перспективные инновационные направления развития способов стерилизации биоимплантатов / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук // *Альманах клинической медицины*. – 2019. – № 47 (7). – С. 634–646.

17. Mandrioli P. Cultural heritage and aerobiology. Methods and measurement techniques for biodeterioration monitoring / P. Mandrioli, G. Caneva, C. Sabbioni. // – Rome : Kluwer Academic Publishers. – 2003. – P. 243.

18. Wiszniewska M. Occupational exposure and sensitization to fungi among museum



workers. / M. Wiszniewska, J. Walusiak-Skorupa, I. Pannenko et al. // Occupational Medicine. – 2009. – V. 59. – № 4. – P. 237-242.

19. International atomic energy agency. Nuclear Techniques for Cultural Heritage Research. – Vienna : IAEA Radiation Technology Series. – 2011. – № 2.

20. Обзор ядерных технологий – 2017. GC(61)/INF/4. Отпечатано МАГАТЭ в Австрии. Август 2017 года. IAEA/NTR/2017.

21. Nguyen, H. Sterilization of Allograft Bone: is 25 kGy the Gold Standard for Gamma Irradiation? / H. Nguyen, D.A.F. Morgan, M.R. Forwood // Cell and Tissue Banking. – 2007. – V. 8. – № 2. – P. 81-91.

22. Singh, R. Trends in radiation sterilization of health care products. Vienna: Intern Atomic Energy Agency. / R. Singh, D. Singh, A. Singh. // World Journal of Radiology. – 2016. – V. 8. – № 4. – P. 355-369.

23. Шангина, О. Р. Влияние радиационной стерилизации на структуру и свойства биоматериалов / О. Р. Шангина, Р. Т. Нигматуллин // Морфология. – 2006. – Т. 129. – С. 44.

24. Nguyen, H. Reducing the radiation sterilization dose improves mechanical and biological quality while retaining sterility assurance levels of bone allografts / H. Nguyen, A. Cassady, M. Bennett et al. // Bone. – 2013. – V. 57. – № 1. – P. 194-200.

25. Litvinov, Y.Y. Influence of the methods of mechanical processing and sterilization on the structural-and-functional condition of the surface layer of bone samples. / Y.Y. Litvinov, I.V. Matveychuk, V.V. Rozanov et al. // Russian Journal of Biomechanics. – 2021. – V. 25. – № 2. – P. 159-164.

26. Патент № 2630464 Российская Федерация. Комбинированный способ стерилизации костных имплантатов : № 2016131336; заявл. 29.07.2016, опубл. 08.09.2017 / Матвейчук И. В., Розанов В. В., Гордонова И. К. [и др.] ; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений». Бюл. № 25.

27. Реестр оборудования СВФУ. – URL: Список оборудования лаборатории (s-vfu.ru). <https://www.s-vfu.ru/universitet/rukovodstvo-i-struktura/strukturnye-podrazdeleniya/dnii/aic/lb/polimer/oborudovanie.php/>.

28. Розанов В. В. Исследование структурно-функциональных характеристик поверхности костных имплантатов при комбинированной стерилизации / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, А. П. Черняев // Известия РАН. Серия физическая. – 2020. – Т. 84. – № 11. – С. 1587–1592. DOI:10.31857/S0367676520110241.
29. Ускорительный комплекс МГУ. – URL: <http://beam.sinp.msu.ru>.
30. [Кафедра общей и экспериментальной физики ФТИ СВФУ \(s-vfu.ru\)](http://s-vfu.ru)
31. Аникович, М. В. Человек и мамонт в палеолите Восточной Европы / М. В. Аникович, Н. К. Анисюткин, Н. И. Платонова // Stratum plus. 2010 – № 1. – С. 99–136.
32. Фишер, Д. К. Анализ истории жизни Юкагирского мамонта / Д. К. Фишер // Юкагирский мамонт : результаты первого этапа научных исследований = The Yukagir mammoth: outcome of the first stage of Research work : Материалы международной научной конференции, г. Якутск, 17–19 ноября. – Якутск, 2004. – С. 16–17.
33. Grigoriev S.E. A woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*) carcass from Maly Lyakhovsky Island (New Siberian Islands, Russian Federation). / S.E. Grigoriev, G.P. Novgorodov, M.Y. Cheprasov et al. // Quaternary International. – 2017. – V. 445. – P. 89-103.
34. Роль бактерий рода *Bacillus* в сохранении останков мамонтовой фауны в многолетних мерзлых грунтах / Н. П. Тарабукина, М. П. Неустроев, М. П. Скрыбина [и др.] // Проблемы региональной экологии. – 2018. – № 6. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rol-bakteriy-roda-bacillus-v-sohranении-ostankov-mamontovoy-fauny-v-mnogoletnih-merzlyh-gruntah>.
35. Жизнеспособные простейшие в вечной мерзлоте арктики viable protists in arctic permafrost / А. Шатилович, Л. Шмакова, Л. Губин, Д. Гиличинский // Криосфера Земли. – 2010. – № 14 (2). – С. 69–78.
36. Sponheimer M. Saving Old Bones: a non-destructive method for bone collagen prescreening. / M. Sponheimer, C. M. Ryder, H. Fewlass et al. // Scientific Reports. – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 13928.
37. Верещагин, Н. К. Почему вымерли мамонты? / Редактор В. А. Зубаков. –

Ленинград : Наука, 1979. – 195 с.

38. Боескоров, Г. Г. О времени вымирания мамонтовой фауны на территории Якутии / Отв. ред. Ю. В. Лабутин // Наземные позвоночные Якутии: экология, распространение, численность. – Якутск : Издательство СО РАН, ЯФ, 2002. – С. 102–110.
39. Аристов, А. А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Хищные и ластоногие / А. А. Аристов, Г. Ф. Барышников. – Санкт-Петербург : Наука, 2001. – 558 с.
40. Боескоров, Г. Г. Многолетняя мерзлота – уникальное «хранилище» останков мамонтов / Г. Г. Боескоров, П. А. Лазарева, Е. М. Васильев // Влияние климатических и экологических изменений на мерзлотные экосистемы, 12–17 августа 2002 г., Якутск. – Якутск : Издательство СО РАН, ЯФ, 2003. – С. 393–399.
41. Верещагин, Н. К. Исследование бивней мамонта из мерзлоты северо-востока Сибири / Н. К. Верещагин, А. Н. Тихонов // Зоол. журн. – 1987. – Т. 66. – № 4. – С. 632–634.
42. Верещагин, Н. К. Берелехское «кладбище» мамонтов / Н. К. Верещагин // Мамонтовая фауна Русской равнины и Восточной Сибири. – Ленинград : Издательство ЗИН АН СССР, 1977. – С. 5–50.
43. Боескоров, Г. Г. Находки остатков мамонтовой фауны на территории Национального парка «Ленские столбы» / Г. Г. Боескоров, Н. Н. Бурнашов, Н. Г. Соломонов // Наука и образование. – 1998. – № 2. – С. 95–97.
44. Лазарев, П. А. Новые находки остатков мамонтов с мягкими тканями в Якутии / П. А. Лазарев, Г. Г. Боескоров, А. Н. Тихонов // Мамонт и его окружение : 200 лет изучения. – Москва : ГЕОС, 2001. – С. 139–144.
45. Исследования новых находок ископаемых млекопитающих с севера Яно-Индибирской низменности / Г. Г. Боескоров, А. В. Протопопов, Е. Н. Мащенко [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – № 8. – С. 252–254.
46. Gutarowska B. Disinfection as a factor reducing microbial threat at workposts in museum and library - a comparison of the effectiveness of photocatalytic ionization, UV

irradiation and chemical misting. / B. Gutarowska, K. Pietrzak, J. Skóra. // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2014. – V. 3. – № 3. – P. 945-959.

47. Głuszewski W. Maria Skłodowska Curie — the precursor of radiation sterilization methods. / W. Głuszewski, Z. P. Zagórski, Q. K. Tran et al. // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2011. – V. 400. – № 6. – P. 1577-1582.

48. Жукова, Н. В. «Проклятие фараонов» или грибковые инфекции легких (пневмомикозы) / Н. В. Жукова, И. М. Кривошеева // Крымский терапевтический журнал. – 2010. – № 2. – С. 16–26.

49. Сибирская язва (стационарно-неблагополучные очаги) и их эпизоотолого-эпидемиологическая оценка / В. Ф. Чернявский, И. Я. Егоров, О. И. Никифоров [и др.] ; под ред. А. И. Белых // Сб. статей межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 80-летию ИГМУ. – Иркутск, 2010. – С. 127–132.

50. Колосов, П. Н. Экосистема строматолитов бюкского времени вендского периода / П. Н. Колосов, И. Ф. Охлопкова // Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова. – 2023. – Т. 20, № 2. – С. 5-14.

51. Миндлин, С. З. О происхождении и распространении устойчивости к антибиотикам : результаты изучения древних бактерий из многолетнемерзлых отложений / С. З. Миндлин, М. А. Петрова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2017. – № 35 (4). – С. 123–132. DOI 10.18821/0208-0613-2017-35-4-123–132.

52. Виром мумии ископаемого волка (*Canis lupus*) как потенциальный источник вирулентных бактериофагов для фаготерапии / А. Е. Гончаров, Я. А. Ахременко, Д. В. Азаров [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2023. – № 1(91). – С. 35-37.

53. Van Bergeijk D.A. Taxonomic and metabolic diversity of Actinomycetota isolated from faeces of a 28,000-year-old mammoth. / D. A. Van Bergeijk, H. E. Augustijn, S. S. Elsayed et al. // Environmental Microbiology. – 2024. – V. 26. – № 2. – P. e16589.

54. Alempic J.M. An Update on Eukaryotic Viruses Revived from Ancient Permafrost. / J.M. Alempic, A. Lartigue, A.E. Goncharov et al. // Viruses. – 2023. – Vol. 15. – № 2.

– P. 564.

55. Mardanov A.V. Molecular analysis of the intestinal microbiome composition of mammoth and woolly rhinoceros. / A.V. Mardanov, V.V. Kadnikov, A.V. Beletskii et al. // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2012. – V. 445. – № 1. – P. 203-206.

56. Goncharov A. Draft genome sequence of *Enterococcus faecium* strain 58m, isolated from intestinal tract content of a woolly mammoth, *Mammuthus primigenius*. / A. Goncharov, A. Karaseva, V. Kolodzhieva et al. // *Genome Announcements*. – 2016. – V. 4. – № 1. – P. e01706-15.

57. Goncharov A. Reply to "isolating viable ancient bacteria: What you put in is what you get out". / A. Goncharov, A. Karaseva, V. Kolodzhieva et al. // *Genome Announcements*. – 2016. – V. 4. – № 4. – P. e00734-16.

58. Prys-Jones T. Metagenomic analysis of coprolites from three Late Pleistocene megaherbivores from the Southwestern United States. / T. Prys-Jones, T. Furstenau, A. Abraham et al. // *Preprint*. – 2022. doi: 10.1101/2022.05.06.490351.

59. Палеомикрофлора мамонтов из вечной мерзлоты / Н. П. Тарабукина, М. П. Неустроев, И. Б. Павлова [и др.] ; ответственный редактор Г. Г. Боескоров ; [перевод Е. И. Троевой] // Тезисы докладов IV Международной мамонтовой конференции. – Якутск, 2007. – С. 73.

60. Егоров, И. Я. Историзм и современность на службе медико-экологических проблем Крайнего Севера / И. Я. Егоров, А. П. Протодяконов, В. Ф. Чернявский // *Материалы Международного симпозиума*. – Хабаровск, 2000. – С. 97.

61. Буланцев, А. Л. Спонтанные генетические процессы у *Bacillus anthracis* и у близкородственных бацилл / А. Л. Буланцев, А. В. Линницкий // *Проблемы особо опасных инфекций*. – Саратов, 2003. – № 86. – С. 79–85.

62. Neustroev M.P. Research of bacteria of sort *Bacillus* allocated from the Yukagir Mammoth (electronical-microscopic research). / M.P. Neustroev, N.P. Tarabukina, A.M. Smirnov, L.V. Pavlova. // *Recent Advance in Yukagir Mammoth Researches : Proceedings of International Symposium on Yukagir Mammoth, Nagakute, Japan, 01–30 июня 2005 года / Japan Association for the 2005 World Exposition*. – Nagakute, Japan : Printing is works Co., Ltd. – 2005. – P. 19.

63. Готовцев, С. П. Деградация вечной мерзлоты – серьёзная опасность / С. П. Готовцев // Наука и техника в Якутии. – 2016. – № 1. – С. 49–50.
64. Chan, M. Antimicrobial resistance in the European Union and the World: Keynote address at the conference on Combating antimicrobial resistance: time for action / M. Chan. – Denmark, Copenhagen, 2012. – URL: [www.who.int](http://www.who.int)
65. Benveniste R. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. / R. Benveniste, J. Davies. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1973. – V. 70. – № 8. – P. 2276-2280.
66. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. / J. Davies. // Science. – 1994. – V. 264. – № 5157. – P. 375-381.
67. Davies J. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. / J. Davies, D.I. Smith. // Annual Review of Microbiology. – 1978. – V. 32. – P. 469-518.
68. Esiobu N. Antibiotic resistance in soil and water environments. / N. Esiobu, L. Armenta, J. Ike. // International Journal of Environmental Health Research. – 2002. – V. 12. – № 2. – P. 133-144.
69. Yu H. Detection of the mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from different hospitals in China. / H. Yu, X. Zhang, F. Qu et al. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2016. – V. 60. – № 8. – P. 5033-5035.
70. Shimizu K. Comparison of aminoglycoside resistance patterns in Japan, Formosa, and Korea, Chile, and the United States. / K. Shimizu, T. Kumada, W.C. Hsieh et al. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1985. – V. 28. – № 2. – P. 282-288.
71. Price K.E. Epidemiological studies of aminoglycoside resistance in the U.S.A. / K.E. Price, P.A. Kresel, L.A. Farchione et al. // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1981. – V. 8 Suppl A. – P. 89-105.
72. Shaw K. J. Correlation between aminoglycoside resistance profiles and DNA hybridization of clinical isolates. / K. J. Shaw, R. S. Hare, F. J. Sabatelli et al. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1991. – V. 35. – № 11. – P. 2253-2261.
73. Национальный стандарт Российской Федерации, Sterilization Of Health Care Products. Radiation Sterilization. Part 3. Guidance On Dosimetric Aspects. – URL:

<https://docs.cntd.ru/document/1200075559>.

74. Национальный стандарт Российской Федерации, Sterilization Of Health Care Products. Moist Heat. Part 1: Requirements for development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200133302>.

75. Современные способы обработки и стерилизации аллогенных костных тканей (обзор литературы) / К. А. Воробьев, С. А. Божкова, Р. М. Тихилов, А. Ж. Черный // Травматология и ортопедия России. – 2017. – Т. 23, № 3. – С. 134-147. (дата обращения: 31.08.2024).

76. Национальный стандарт Российской Федерации. Стерилизация медицинской продукции. Горячий воздух. Требования к разработке, валидации и текущему контролю процесса стерилизации медицинских изделий. – URL: ГОСТ Р ИСО 20857-2016 | НАЦИОНАЛЬНЫЕ СТАНДАРТЫ (gost.ru).

77. Национальный стандарт Российской Федерации. Medical devices. Biological evaluation of medical devices. Part 7. Ethylene oxide sterilization residuals. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200140725>.

78. Sterilisation of Tissues Using Ionising Radiations. / N. Yusof, A. Hassan, A. R. Shamsudin et al. – Cambridge : Woodhead Publishing Limited, Abington. – 2005. – P. 319-329.

79. Yusof N. Radiation in Tissue Banking – Basic Science and Clinical Applications of Irradiated Tissue Allografts. / N. Yusof. – Singapore : World Scientific Publishing Co Pte Ltd. – 2007. – P. 129.

80. Черняев, А. П. Ускорители в современном мире // А. П. Черняев. – Москва : Издательство МГУ, 2012. – 368 с.

81. Черняев, А. П. Ионизирующие излучения / А. П. Черняев. – Москва : Университетская книга, 2014. – 314 с.

82. Smith M.A. Evaluation and Comparison of Medical Device Radiation Sterilization Modalities. / M.A. Smith. // North Carolina : CHP Ionaktis. – 2012.

83. Заболевания опорно-двигательного аппарата. Всемирная организация здравоохранения. – URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact->

sheets/detail/musculoskeletal-conditions.

84. Банки тканей. Мировой опыт. История развития и современные подходы / А. С. Миронов, Н. В. Боровкова, М. С. Макаров [и др.] // Трансплантология. – 2021. – 13 (1). – С. 49–62. – URL: <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2021-13-1-49-62>.
85. Khutsistova A.O. Modeling the Dose Distribution in a Bone Implant during Sterilization with a Fast Electron Flow. / A.O. Khutsistova, V.V. Rozanov, I.V. Matveychuk. // Moscow University Physics Bulletin. – 2021. – V. 76. – № 1. – P. 62-67.
86. Nikolaeva N.A. Mathematical modeling of radiation sterilization process. / N.A. Nikolaeva, D.A. Ammosov, V.V. Rozanov et al. // 10th International Conference on Mathematical Modeling. Yakutsk : NEFU. – 2023. – P.111-112.
87. Nguyen H. Sterilization of allograft bone: effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. / H. Nguyen, D.A. Morgan, M.R. Forwood. // Cell Tissue Bank. – 2007. – V. 8. – № 2. – P. 93-105. doi: 10.1007/s10561-006-9020-1. PMID: 17063262.
88. Rahman N. Investigation of the Mechanism of Gamma Irradiation Effect on Bovine Bone. / N. Rahman, R. Khan, T. Hussain, et al. // Cell Tissue Bank. – 2020. – V. 21. – № 2. – P. 249-256. doi: 10.1007/s10561-020-09817-4.
89. Шахин С. Эффект гамма-излучения на коже и парчемине / С. Шахин, Л. Б. Вильмонт // Наследственная культура и биологические изменения. Акты научных исследований S.F.I.I.C, 1988.
90. Voggenreiter G. Effects of preservation and sterilization on cortical bone grafts. A scanning electron microscopic study. / G. Voggenreiter, R. Ascherl, G. Blümel, et al. // Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery. – 1994. – V. 113. – № 5. – P. 294-296. doi: 10.1007/BF00443821. PMID: 7946822.
91. Yusof N. 7.13 – Radiation Biology of Tissue Radiosterilization. / N. Yusof, N. Hilmy. // Comprehensive Biomedical Physics. – 2014. – V. 7. – P. 263-287. doi: 10.1016/B978-0-444-53632-7.00813-3.
92. Розанов, В. В. Технологии радиационной стерилизации костных имплантатов. Современное состояние, проблемы, перспективы / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, Н. А. Николаева // Всероссийская научно-образовательная



конференция с международным участием «Интеграция наук : междисциплинарность в медицине» ВКМиФ-2022, Республика Саха (Якутия), г. Якутск, 20–22 июня 2022 г. – Якутск, 2022. – С. 24–25.

93. Akkus O. Sterilization by gamma radiation impairs the tensile fatigue life of cortical bone by two orders of magnitude. / O. Akkus, R.M. Belaney. // *Journal of Orthopaedic Research*. – 2005. – V. 23. – P. 1054-1058. doi: 10.1016/j.orthres.2005.03.003.

94. Baker M. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. / M. Baker, J. Trevisan, P. Bassan et al. // *Nature Protocols*. – 2014. – V. 9. – № 8. – P. 1771-1791. doi: 10.1038/nprot.2014.110.

95. Baum J. Case study 2: Folding of the collagen triple-helix and its naturally occurring mutants. In: *Mechanism of Protein Folding*. / J. Baum, B. Brodsky, R.H. Pain (ed.) // Oxford : Oxford Univ. Press. – 2000. – P. 330-351.

96. Tomford W.W. Frozen musculoskeletal allografts. A study of the clinical incidence and causes of infection associated with their use. / W.W. Tomford, J. Thongphasuk, H.J. Mankin, et al. // *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. – 1990. – V. 72. – № 8. – P. 1137-1143.

97. Комбинированные воздействия на биообъекты для повышения эффективности радиационной обработки / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, А. П. Черняев, Н. А. Николаева // *Медицинская физика*. – 2019. – № 1. – С. 54.

98. Патент № 2356224 Российская Федерация. Комбинированный способ стерилизации костных трансплантатов. Оpubл. 21.12.2007 / Савельев В. И., Булатов А. А., Рыков Ю. А. ; правообладатели ФГУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена Росмедтехнологий».

99. Литвинов, Ю. Ю. Современные подходы к оптимизации технологии получения костных имплантатов / Ю. Ю. Литвинов, И. В. Матвейчук, В. В. Розанов // *Гены и клетки*. – 2019. – Т. 14. Приложение. – С. 135–136.

100. Патент № 180532 Российская Федерация. Установка для стерилизации биоматериалов / И. В. Пантелеев, В. В. Розанов, И. В. Матвейчук [и др.] ; ФГБНУ ВИЛАР, патентообладатель. Оpubл. 15.06.2018.

101. Альтман, Н. Кислород по рецепту / Н. Альтман ; пер с англ. – Минск : Белорусский дом печати, 2009. – 464 с.
102. Опыт применения озоновых технологий в стерилизации биоимплантатов / И. В. Матвейчук, В. В. Розанов, А. П. Черняев, Н. А. Николаева // Сборник материалов Научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения профессора Н.П. Демичева «Современные аспекты травматологии, ортопедии и реконструктивной хирургии», г. Астрахань, 22–23 марта 2019 г.
103. Пантелеев, В. И. Медицинские озоновые технологии. Новые задачи, возможности, оборудование / В. И. Пантелеев, В. В. Розанов, И. В. Матвейчук // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2013. – № 2. – С. 3–11.
104. Пантелеев, В. И. Универсальные многофункциональные озонаторные установки для медицины – постановка задачи, исследования, разработка / В. И. Пантелеев, Ю. В. Кротов // 4-я научно-техническая конференция «Медико-технические технологии на страже здоровья» – «Медтех-2002», Турция, Анталия, 7–13 октября 2002 г. Сборник докладов. – С. 86.
105. Змызгова, А. В. Клинические аспекты озонотерапии / А. В. Змызгова, В. А. Максимов. – Москва : Озонотерапия, 2003. – 287 с.
106. Пантелеев, И. В. Озоновые технологии: медико-биологические приложения в условиях современных вызовов / И. В. Пантелеев, В. В. Розанов, И. В. Матвейчук // Русский инженер. – 2021. – № 3. – С. 43–46.
107. Розанов, В. В. Биомедицинские приложения современных озоновых технологий / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, И. В. Пантелеев // Медицинская техника. – 2022. – № 5 (335). – С. 43–36.
108. Murphy L. Ozone – the latest advance in sterilization of medical devices. / L. Murphy. // Can Oper Room Nurs J. – 2006. – V. 24. – № 2. – P. 28, 30-2, 37-8. PMID: 16869464.
109. Sousa C. Sterilization with ozone in health care: an integrative literature review. / C. Sousa, L. Torres, M. Azevedo et al. // Revista da Escola de Enfermagem da USP . – 2011. – V. 45. – № 5. – P. 1238-1244. doi: 10.1590/S0080-62342011000500030.

110. Колесова, О. Е. Стимулирующий эффект озонированного физиологического раствора на антиоксидантную систему организма / О. Е. Колесова // Озон в биологии и медицине : Тезисы докладов I Всероссийской научно-практической конференции. – Нижний Новгород, 1992. – С. 18–19.
111. Тарасова, А. И. Влияние озона и гутимины на микроциркуляцию и реологию крови при искусственном кровообращении : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Казань, 1991. – 24 с.
112. Густов, А. В. Озонотерапия в неврологии / А. В. Густавов, К. Н. Конторщикова, Ю. П. Потехина. – Нижний Новгород : Изд. НГМА, 2012. – 192 с.
113. Алехина, С. П. Озонотерапия : клинические и экспериментальные аспекты / С. П. Алехина, Т. Г. Щербатюк. – Нижний Новгород : Литера, 2003. – 240 с.
114. Масленникова, О. В. Руководство по озонотерапии / О. В. Масленникова, К. Н. Конторщикова, Б. Е. Шахов. – Нижний Новгород : Кирилица, 2018. – 346 с.
115. Сибельдина, Л. А. Стерилизация озоном / Л. А. Сибельдина // Медицина и здоровье. – 2007. – № 11 (19). – С. 24–25.
116. Лекишвили, М. В. Технологии изготовления костного пластического материала для применения в восстановительной хирургии (экспериментальное исследование) : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Лекишвили М. В. – Москва, 2005. – 289 с.
117. Инновационные подходы к стерилизации имплантатов / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, М. В. Лекишвили [и др.] // Технологии живых систем. – 2015. – Т. 12. – № 4. – С. 74–76.
118. Инновационные подходы к совершенствованию процесса стерилизации для решения задач биоимплантологии / И. В. Матвейчук, В. В. Розанов, В. И. Пантелеев [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 11. – С. 92–8.
119. Rozanov V.V. Biomedical Applications of Contemporary Ozone Technologies. / V.V. Rozanov, I.V. Matveichuk, I.V. Panteleev. // Biomed Eng. – 2023. – V. 56. – № 5. – P. 341-344. doi: 10.1007/s10527-023-10232-8
120. Rozanov V.V. Changes in the Morphological and Mechanical Characteristics of

- Bone Implants upon Radiation Sterilization. / V.V. Rozanov, I.V. Matveichuk, A.P. Chernyaev et al. // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics.* – 2019. – V. 83. – № 10. – P. 1311-1315. doi: 10.3103/S1062873819040208.
121. Пентин, Ю. А. Основы молекулярной спектроскопии / Ю. А. Пентин, Г. М. Курамшина. – Москва : Мир, 2008. – 398 с.
122. Using Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy to Study the Formation of Nanoparticles on Red Blood Cell Surface in Cervical Cancer Patients / S. N. Mamaeva, I. V. Kononova, M. Ruzhansky [et al.] // *International Journal of Biomedicine.* – 2020. – Vol. 10, No. 1. – P. 70-75.
123. Scanning electron microscope: A model for determining of main emission characteristics for the Schottky cathode in the mode of working with biological samples / S.N. Mamaeva, G.V. Maksimov, N.V. Egorov [et al.] // *AIP Conference Proceedings.* – 2021. – Vol. 2328. – Art. 0042476
124. Сканирующая (растровая) электронная микроскопия : исследование биологических образцов / С. Н. Мамаева, Н. А. Николаева, Т. А. Крылова [и др.]. – Якутск : Издательский дом СВФУ, 2023. – 128 с.
125. Beresheim A. Use of backscattered scanning electron microscopy to quantify the bone tissues of midthoracic human ribs. / A. Beresheim, S. Pfeiffer, M. Grynepas et al. // *American Journal of Physical Anthropology.* – 2019. – V. 168. – № 2. – P. 262-278. doi: 10.1002/ajpa.23716.
126. Растровая электронная микроскопия для нанотехнологий: методы и применения / Под ред. У. Жу, Ж. Л. Уанг ; пер. с англ.: С. А. Иванов, К. И. Домкин. – Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 600 с.
127. Georgiadis M. Techniques to assess bone ultrastructure organization: orientation and arrangement of mineralized collagen fibrils. / M. Georgiadis, R. Müller, P. Schneider. // *Journal of the Royal Society Interface.* – 2016. – V. 13. – P. 119. doi: 10.1098/rsif.2016.0088.
128. Shah F.A. Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface. / F.A. Shah, P. Thomsen, A. Palmquist. // *Acta Biomater.* – 2019. – V. 84. – P. 1-15. doi: 10.1016/j.actbio.2018.11.018.

129. Описание оборудования. Микротвердомер DM8. – URL: <https://ank-ndt.ru/catalog/kontrol-tverdosti/tverdomery-statsionarnye/tverdomer-po-mikrovikkersu-affri-dm8>.
130. Розанов, В. В. Биомедицинские технологии / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, Ю. И. Денисов-Никольский // ВИЛАР. – 2006. – Т. 24. – С. 200.
131. Описание ускорителя электронов УЭЛР-1-25-Т-001. – URL: Ускоритель электронов непрерывного действия – ЦКП УНО ([msu.ru](http://msu.ru)).
132. Синхротрон ТПИ на 1,5 ГэВ / А. А. Воробьев, И. П. Чучалин, А. Г. Власов [и др.]. – Москва : Атомиздат, 1968. – 160 с.
133. Развитие технологий стерилизации природных наноструктурированных материалов / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, А. П. Черняев [и др.] // Российские нанотехнологии. – № 18 (4). – С. 547–552.
134. Mamaeva S.N. Scanning electron microscope: A model for determining of main emission characteristics for the Schottky cathode in the mode of working with biological samples. / S.N. Mamaeva, G.V. Maksimov, N.V. Egorov et al. // AIP Conference Proceedings. AIP Publishing LLC. – 2021. – V. 2328. – № 1. – P. 040002.
135. Nikolaeva N.A. The Influence of Combined Sterilization Factors on the Structural and Functional Characteristics of Bone Implants. / N.A. Nikolaeva, V.V. Rozanov, A.P. Chernyaev, et al. // International Journal of Molecular Sciences – 2023. – V. 24. – № 19. – P. 1-11. doi: 10.3390/ijms241914426.
136. Луньков, А. Е. Порометрические методики морфометрии костной ткани / А. Е. Луньков. – Саратов : Изд-во Саратовского медицинского университета, 2015. – 120 с.
137. Talonov A. On numerical homogenization of shale gas transport. / A. Talonov, M. Vasilyeva. // Journal of Computational and Applied Mathematics. – 2016. – V. 301. – P. 44-52. doi: 10.1016/j.cam.2016.01.021.
138. Efendiev Y. Numerical homogenization of nonlinear random parabolic operators. / Y. Efendiev, A. Pankov. // SIAM Journal on Multiscale Modeling and Simulation. – 2004. – V. 2. – № 2. – P. 237-268. doi:10.1137/030600266.
139. Altmann R. Numerical homogenization beyond scale separation. / R. Altmann, P.

Henning, D. Peterseim. // *Acta Numerica*. – 2021. – V. 30. – P. 1-86.  
doi:10.1017/S0962492921000015.

140. Barenblatt G.I. Basic Concepts in the Theory of Seepage of Homogeneous Liquids in Fissured Rocks. / G.I. Barenblatt, I.P. Zheltov, I.N. Kochina. // *Journal of Applied Mathematics and Mechanics*. – 1960. – V. 24. – № 5. – P. 1286-1303.

141. Arbogast T. Derivation of the double porosity model of single phase flow via homogenization theory. / T. Arbogast, J.J. Douglas, U. Hornung. // *SIAM Journal on Mathematical Analysis*. – 1990. – V. 21. – № 4. – P. 823-836.

142. Panasenko G.P. Multicontinuum wave propagation in a laminated beam with contrasting stiffness and density of layers. / G.P. Panasenko. // *J Math Sci*. – 2018. – V. 232. – P. 503-515.

143. Rubinštein L.I. On the Question of the Process of Propagation of Heat in Heterogeneous Media (in Russ.) / L.I. Rubinštein. // *Izv Akad Nauk SSSR, Ser Geograph Geophys*. – 1948. – V. 12. – P. 27-45.

144. Efendiev Y. Multicontinuum homogenization and its relation to nonlocal multicontinuum theories. / Y. Efendiev, W.T. Leung. // *Journal of Computational Physics*. – 2023. – V. 474. – №3. – P. 111761.

145. Chung E. Multicontinuum homogenization. General theory and applications. / E. Chung, Y. Efendiev, J. Galvis et al. // *Journal of Computational Physics*. – 2024. – V. 510. – P. 112980.

146. Leung W.T. Some convergence analysis for multicontinuum homogenization. / W.T. Leung. // *arXiv preprint arXiv:2401.12799*. – 2024.

147. Ammosov D. Multicontinuum Homogenization for Coupled Flow and Transport Equations. / D. Ammosov et al. // *arXiv preprint arXiv:2405.14572*. – 2024.

148. Logg A. Automated solution of differential equations by the finite element method: The FEniCS book. / A. Logg, K.A. Mardal, G. Wells. (ed.) // *Lecture Notes in Computational Science and Engineering*. – Springer-Verlag. – 2012. – V. 84.  
doi:10.1007/978-3-642-23099-8.

149. Geuzaine C, Remacle J.F. Gmsh: A 3-D finite element mesh generator with built-in pre-and post-processing facilities. / C. Geuzaine, J.F. Remacle. // *International Journal*

- for Numerical Methods in Engineering. – 2009. – V. 79. – № 11. – P. 1309-1331.
150. Изменения морфомеханических характеристик костных имплантатов при радиационной стерилизации / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, А. П. Черняева, А. Н. Николаева // Известия Российской академии наук. Серия физическая. – 2019. – № 83 (10). – С. 1435–1440. DOI: 10.31857/S0367676521050185.
151. Современное состояние и направления дальнейшего развития высокотехнологичных методов радиационной стерилизации / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, А. П. Черняев [и др.] // Известия Российской академии наук. Серия физическая. – 2020. – Т. 84. – № 4. – С. 521–524.
152. Розанов, В. В. Современное состояние и перспективные инновационные направления развития способов стерилизации биоимплантатов / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук // Альманах клинической медицины. – 2019. – № 47 (7). – С. 634–646.
153. Kawahara K, et al. Identification of animal species by the MALDI-MS of collagen in animal glues of Chinese ink sticks. / K. Kawahara et al. // Proceedings of 59th ASMS Conference and Allied Topics, Denver, CO. – 2011.
154. Nakazawa T, et al. Mass Spectrometry of Collagen Preserved in Neolithic Animal Bones for the Identification of Species. / T. Nakazawa et al. // Proceedings of 66th ASMS Conference and Allied Topics, San Diego, CA. – 2018.
155. Brown S. Identification of a new hominin bone from Denisova Cave, Siberia using collagen fingerprinting and mitochondrial DNA analysis. / S. Brown, C. Higham, V. Slon et al. // Scientific Reports. – 2016. – V. 6. – № 1. – P. 23559. doi: 10.1038/srep23559.
156. Лечение ожогов и ран донорского поля с использованием повязок на основе аллогенного коллагена I типа / Е. А. Жиркова, А. В. Сачков, Т. Г. Спиридонова [и др.] // Трансплантология. – 2022. – 14 (4). – С. 432– 443. – URL: <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2022-14-4-432-443>.
157. Leskovar T. Separating forensic, WWII, and archaeological human skeletal remains using ATR-FTIR spectra. / T. Leskovar, I.Z. Pajnič, I. Jerman et al. // International Academy of Legal Medicine. – 2020. – V. 134. - № 2. – P. 811-821. doi: 10.1007/s00414-019-02079-0. PMID: 31172274.
158. Zhou Y. Atomic force microscopy (AFM) and its applications to bone-related

- research. / Y. Zhou, J. Du. // Progress in biophysics and molecular biology. – 2022, – V. 176. – P. 52-66. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2022.10.002.
159. Особенности изменения характеристик костных имплантатов при комбинированной стерилизации / Н. А. Николаева, В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, А. П. Черняев // Гены и клетки. – 2022. – № 17 (3). – С. 162–163.
160. О возможности применения комбинированных радиационных технологий для стерилизации и консервации ископаемых биообъектов / Н. А. Николаева, В. В. Розанов, И. В. Матвейчук [и др.] // 73-я международная конференция по ядерной физике «ЯДРО-2023 : Фундаментальные вопросы и приложения». 9–13 октября 2023. – Саров, 2023.
161. Возможности и перспективы совершенствования комбинированных методик стерилизации биоимплантатов / Н. А. Николаева, В. В. Розанов, И. В. Матвейчук [и др.] // Гены и клетки. – 2019. – № 14 (Приложение) – С. 167.
162. Исследование состояния поверхности костных имплантатов при комбинированной стерилизации / Н. А. Николаева, В. В. Розанов, А. П. Черняев [и др.] // Медицинская физика. – 2022. – № 3 (95). – С. 35–36.
163. Стратегия развития комбинированных радиационных технологий стерилизации костных имплантатов / В. В. Розанов В. В., Матвейчук И. В., Черняев А. П. [и др.] // Известия Российской академии наук. Серия физическая – 2021. – № 85 (5) – С. 745–748. – DOI: 10.31857/S0367676521050185.
164. Розанов, В. В. Технологии радиационной стерилизации костных имплантатов : современное состояние, проблемы, перспективы / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, Н. А. Николаева // Медицинская физика. – 2022. – № 3 (95) – С. 13.
165. Application of the combined method of radiation sterilization for the effective processing and preservation of bone material of ancient animals. / N. A. Nikolaeva, V. V. Rozanov, I. V. Matveychuk et al. // International Conference on Radiation Applications. (RAP 2023). – Greece, Attica, Anavyssos: Hellenic Centre of Marine Research, 2023. – P. 51.
166. Rozanov V.V. Investigation of the features of bone implants surface condition



during combined radiation sterilization. / V.V. Rozanov, I.V. Matveichuk, A.P. Chernyaev et al. // LXXII International conference “NUCLEUS-2022: Fundamental problems and applications” (Moscow, July 11–16, 2022): Book of abstracts. – Saratov : Amirit. – 2022. – P. 377.

167. Влияние комбинированной радиационной стерилизации на структурно-функциональные характеристики поверхности костных имплантатов / М. П. Макарова, Н. А. Николаева, В. В. Розанов, А. П. Черняев // XXIV межвузовская молодежная научная школа-конференция имени Б. С. Ишханова «Концентрированные потоки энергии в космической технике, электронике, экологии и медицине». – 2023. – С. 140.

168. Николаева, Н. А. Влияние способов обработки и стерилизации на структурно-функциональное состояние поверхностного слоя костных образцов / Н. А. Николаева, М. П. Макарова, В. В. Розанов // Сборник материалов республиканской научно-практической конференции студентов и магистрантов, посвященной 100-летию образования Якутской АССР: Аммосов-2022, Якутск. – Якутск, 2022. – С. 734–735.

169. Актуальные вопросы исследования наноструктурированных биополимеров при создании матриц-носителей лекарственных средств / И. В. Матвейчук, В. В. Розанов, Н. А. Николаева, А. О. Хуцистова // Сборник научных трудов, ФБГНУ ВИЛАР, г. Москва, 2023 г. – Москва, 2023. – С. 363–367.

170. Медико-биологическое значение элементного анализа для оптимизации технологий изготовления костных имплантатов / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, А. П. Черняев [и др.] // Сборник материалов международной научной конференции «Радиобиология : современные проблемы-2020». Гомель, 24–25 сентября 2020 г. – Минск, 2020. – С. 115–118

171. Инновационные технологии комбинированной стерилизации костных имплантатов. Анализ и перспективы / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, Н. А. Николаева, А. П. Черняев // Сборник материалов XIV Международной научной конференции «Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии – ФРЭМЭ-2020». – Владимир ; Суздаль, 2020. – Т. 1. – С. 192–196.

172. Изучение структуры костной ткани для создания современных здоровьесберегающих технологий в биоимплантологии / Н. А. Николаева, А. А. Николаева, И. В. Матвейчук // Сборник материалов VII Международной научной конференции «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения», ФГБНУ ВИЛАР. Сб. науч. трудов. – 2019. – С. 465–472
173. Совершенствование традиционных и создание перспективных технологий стерилизации биоимплантатов с учетом требований государственных стандартов / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, А. П. Черняев, Н. А. Николаева // Научно-техническая конференция «Медико-технические технологии на страже здоровья», 22 сентября–29 сентября 2019 г. – Москва : МГТУ им. Н.Э.Баумана. ISBN 978-5-4384-0038-7. – 2019. – С. 75–77.
174. Анализ инновационных и альтернативных технологий комбинированной стерилизации биоимплантатов / В. В. Розанов, И. В. Матвейчук, А. П. Черняев, Н. А. Николаева // Радиобиология : современные проблемы. Материалы международной научной конференции (26–27 сентября 2019 г.). – Гомель. ISBN 978-985-540-514-7, 2-19. – С. 147–150.
175. Влияние способов механической обработки и стерилизации на структурно-функциональное состояние поверхностного слоя костных образцов / Ю. Ю. Литвинов, И. В. Матвейчук, В. В. Розанов, В. В. Краснов // Российский журнал биомеханики. – 2021. – Т. 25. – № 2. – С. 186–191.

## **Федеральные и региональные программы по сохранению и изучению объектов мамонтовой фауны, создание Всемирного центра мамонта**

Для развития промышленности, сельского хозяйства, традиционных промыслов народов Арктики и Севера и т.д. С учетом экстремальных природно-климатических условий АЗ РФ, интенсивного потепления климата в Арктике, снижения естественного прироста населения, миграционного оттока, сокращения численности населения, чувствительности экологических систем к различным факторам, климатических изменений, способствующих возникновению как новых экономических возможностей, так и рисков для хозяйственной деятельности и окружающей среды, ориентированностью экономики на добычу природных ресурсов, крайне низкой плотности населения, в целях создания условий по сохранению и развитию человеческого капитала населения на территории АЗ РФ, сохранения и развития объектов историко-культурного наследия народов АЗ, в т.ч. 19 коренных малочисленных народов, имеющих историческую и культурную ценность общемирового наследия, Правительствами РФ и регионов АЗ РФ разработаны ряд нормативно-правовых актов.

*Государственные нормативные документы (федеральные, региональные стратегии и программы развития):*

- 1.1. Указ Президента РФ №474 от 14.07.2020 г.;
- 1.2. Стратегия развития Арктической зоны РФ (до 2035 года);
- 1.3. Распоряжение Правительства РФ от 29 декабря 2023 г. №4073 – р «О внесении изменений в распоряжение Правительства РФ от 31.07.2023 г. о строительстве Всемирного центра мамонта (2025 – 2029 гг.)
- 1.4. Государственная программа «Социально-экономическое развитие Арктической зоны Российской Федерации» (министерство по развитию Дальнего Востока и Арктики);
- 1.5. Программа НОЦ «Север: территория устойчивого развития» (грант

Минобрнауки РФ);

1.6. Программа развития Дальнего Востока;

1.7. Республиканские: Концепция создания Всемирного центра мамонта в Республике Саха (Якутия) – Академия наук РС(Я);

1.8. Республиканские: Научный концепт Всемирного центра мамонта:

- Создание криохранилища мамонтовой фауны;
- Станции мониторинга, организация экспедиций;
- Музейно-выставочный комплекс;
- Парк Ледникового периода;
- Научно-лабораторный комплекс.

*Дополнительно:*

- Федеральный проект «Развитие международного экономического сотрудничества в Арктической зоне Российской Федерации»;
- Программа «Создание санитарного щита»;
- Программа развития Арктики (Институт Палеонтологии РАН);
- Прогноз Института мерзлотоведения СО РАН (лаборатория криогенных ландшафтов).

Цель данных федеральных и региональных программ – интеграция и консолидация ресурсов научных и образовательных учреждений, занимающихся изучением мамонтовой фауны, для создания единого научно-образовательного пространства, обеспечивающего устойчивое развитие арктического региона Якутска и Российской Федерации.

Основным механизмом реализации государственной политики РФ в Арктике является Стратегия развития Арктической зоны РФ и обеспечения национальной безопасности на период до 2035 г., утвержденная Указом Президента РФ от 26 октября 2020 г. №645 «О Стратегии развития АЗ РФ и обеспечения национальной безопасности на период до 2035 г.»<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> Основным документом для реализации Стратегии является «Социально-экономическое развитие Арктической зоны РФ», государственная Программа утверждена Постановлением Правительства РФ от 30 марта 2021 г. за №484 (в ред. от 30.12.2022 г.).

В IV разделе Основных направлений реализации Стратегии развития АЗ РФ в п.26 для создания современных объектов инфраструктуры хранения и изучения палеонтологических находок запланирована реализация проекта «Всемирный центр мамонта», обеспечивающего развитие научного, культурно-этнографического и экспедиционного туристического кластера в Республике Саха (Якутия).

В условиях глобального потепления, таяния льдов, периодически происходящих берегообрушения и наводнений в Арктике, обнажения останков древних животных, в рамках деятельности Музея мамонта в СВФУ и создаваемого Всемирного Центра мамонта планируется безопасное и более длительное хранение палеонтологических находок, бивней и костных останков.

Всемирный Центр Мамонта (Центр является частью программы Научно-образовательного центра "Север: территория устойчивого развития"), который планируется в Якутии, призван вести всю научную и образовательную работу в области мамонтовой фауны. В центре можно будет изучать находки, сохранять их в первозданном виде, проводить комплексные исследования археологических памятников и демонстрировать их широкой аудитории. Центр включает в себя научную лабораторию, криохранилище музей, выставочные залы и исследовательский комплекс "Парк ледникового периода". Проекты центра также предусматривают строительство сети станций мониторинга, которые будут служить экспедиционными базами в арктическом районе и логистическими центрами.

Миссией Всемирного Центра мамонта определены сохранение в природной мерзлоте и в криохранилище мамонтовой фауны – уникальных культурных и научных объектов в интересах освоения Арктики, получение новых знаний о климате и экологии позднего плейстоцена, конструирование древних геномов, клеточных и тканевых культур, сохранение биоценоза путем проведения фундаментальных и прикладных научных исследований в области естественных наук. Научным концептом Всемирного Центра мамонта является обеспечение условий оптимального сохранения палеонтологических находок в криогенных условиях, длительное хранение мерзлых мумий, хранение бивней и костных

останков в период мамонтовых аукционов, для экспонирования объектов мамонтовой фауны, организации передвижных выставок, изучение методов консервации музейных экспонатов, проведение анатомо-морфологических исследований и др. Планируется создание Парка Ледникового периода, в структуре которого планируется деятельность сектора палеонтологии, сектора радиографических и изотопных исследований, сектора палеогеномики.

**Предпосылки** для создания Всемирного Центра Мамонта (концепция):

- мировое лидерство Республики Саха (Якутия) по запасам мамонтовой фауны (МФ);
- устойчивый спрос на бивень мамонта в странах Азиатско- Тихоокеанского региона за счет международного запрета на торговлю слоновою костью. 90% бивня мамонта экспортируется в страны Азии, в том числе Китайскую Народную Республику, куда из Российской Федерации до 2018 года экспортировалось более 60 тонн бивня ежегодно, большая часть которого добыта на территории Республики Саха (Якутия);
- высокий научно-технологический потенциал изучения МФ в области палеонтологических исследований мирового уровня, биотехнологий для разработки и реализации инновационных решений по борьбе с глобальным изменением климата, утратой биологического разнообразия, деградацией криолитозоны и арктических экосистем;
- популяризация и активное развитие исследований в области палеогенетики, в том числе технологий культивирования клеток, тканей и клонирования;
- рост количества НИОКР по возрождению вымерших животных, в том числе странствующего голубя, тасманийского волка, птицы дронг. Крупнейшим вызовом для мировой палеогенетики остается возрождение мамонта;
- растущий спрос на экологичные технологии на фоне распространения механизмов устойчивого, в том числе "зеленого" финансирования, ориентированного на принципы экологической, социальной и управленческой ответственности. растущая потребность в разработке и реализации инновационных решений по борьбе с глобальным изменением

климата, утратой биологического разнообразия, деградацией криолитозоны и арктических экосистем:

- темпы вымирания животных в XX–XXI веках приблизились к темпам исчезновения биологических видов 65,5 млн лет назад в период мел-палеогенового вымирания, когда исчезли динозавры, морские рептилии и птерозавры;
- согласно докладу Межправительственной научно-политической платформы по биоразнообразию и экосистемным услугам около 1 млн видов животных и растений находятся на грани полного исчезновения. Многие животные и растения могут быть бесследно потеряны уже в ближайшие десятилетия;
- по оценке Межправительственной группы экспертов по изменению климата, начиная с 1970-х годов в мире наблюдается глобальное изменение климатических условий, которое проявляется в росте температуры и связано с увеличением концентрации парниковых газов в атмосфере;
- согласно заявлению Всемирной метеорологической организации о состоянии глобального климата в 2021 году, несмотря на ожидаемое снижение уровня антропогенных выбросов на 7% в результате распространения коронавируса, глобальная молярная доля парниковых газов в атмосфере в 2020 году достигла рекордных уровней;
- по оценке рабочей группы по реализации программы арктического мониторинга и оценки зона мерзлоты в северном полушарии уменьшится на 20% к 2040 году и на 2/3 к 2080 году. В Якутии установлены рекорды по самым древним и самым глубоким слоям многолетней мерзлоты. Мощность мерзлоты достигает 800 м, при этом летнее оттаивание грунта — всего до 150 см;
- при потеплении на 1 градус в мире теряется 4 млн кв. км вечной мерзлоты. По данным Арктического совета около 20% вечной мерзлоты у поверхности могут растаять к 2040 году, высвободив

углерод, которого в криолитозоне содержится больше, чем в атмосфере.

Уникальная инфраструктура позволяет реализовать планируемый на территории Якутии Всемирный мамонтовый центр как один из знаковых проектов Российской Федерации, который имеет огромное символическое значение как глобальный центр научно-технических инноваций на Дальнем Востоке и в Арктике. Северный научно-технический центр, который планируется создать в Якутске, объединит четыре дальневосточных региона – Якутию, Чукотский автономный округ, Камчатскую и Магаданскую области. Центр будет работать по трем направлениям: "человек Севера", "рациональное недропользование" и "эффективная социально-экономическая инфраструктура".

Кроме того, последствия изменения климата и угроза исчезновения биоразнообразия требуют специальных комплексных решений для Крайнего Севера и Арктики. Глава Республики Саха (Якутия) Айсен Николаев считает, что предлагаемый центр [2-10] станет одним из таких решений. Объект также может стать центром компетенции по правовому регулированию, сертификации и мониторингу добычи мамонтовых находок. Только бивней мамонта в Якутии добывается до 120 тонн в год, но в настоящее время вопрос регулирования добычи мамонта остается нерешенным. По мнению специалистов, Всемирный центр мог бы стать основой для систематизации этой отрасли, включая аукционные площадки и паспортизацию экспонатов. Глава Республики Саха (Якутия) Айсен Николаев обозначил первостепенные задачи по исследованию мамонтовой фауны, которые стоят перед регионом. Одна из них – вывести добычу мамонтовой кости в сферу нормативно-правового регулирования.

“Всемирный центр мамонта” включен в Стратегию развития Арктики и обеспечения национальной безопасности Российской Федерации (до 2035 года) Указом Президента Российской Федерации, а также во многие другие стратегические документы Российской Федерации и Республики Саха (Якутия).



## **Математическая модель распространения озона в костной ткани при наличии развитой системы внутрикостных пространств**

Моделирование распространения озона в поровом пространстве костной ткани сопряжено с рядом сложностей. Главной из них является пористая структура костной ткани, которая характеризуется высокой степенью неоднородности и многомасштабности. В костных образцах можно выявить как тонкие поровые каналы, так и крупные, которые соединяются друг с другом. Для учета всех особенностей пористой структуры необходимо применять подробные вычислительные сетки, которые ведут к существенному увеличению вычислительной стоимости.

Для снижения вычислительных затрат в подобных случаях широко применяются различные методы усреднения [137, 138, 139]. Основная идея данных методов состоит в вычислении эффективных свойств в каждой крупномасштабной точке путем решения задач на ячейках. Таким образом, можно получить крупномасштабную модель, которая позволяет проводить расчеты на грубых вычислительных сетках. Однако во многих случаях такие модели не позволяют добиться необходимой точности ввиду недостаточного количества эффективных параметров. Подход многоконтинуального усреднения позволяет ввести дополнительные параметры путем выделения компонентов (или континуумов), в которых свойства среды сильно отличаются. Таким образом, мы получаем модель, определяемую системой уравнений для каждого континуума с отдельными эффективными свойствами. Среди работ в данном направлении можно выделить [140, 141, 142, 143].

Недавно был представлен новый метод многоконтинуального усреднения, который представляет собой строгую, но в то же время гибкую процедуру построения многоконтинуальных моделей [144, 145, 146]. Основная идея данного метода состоит в формулировке специальных задач на ячейках с ограничениями для учета различных средних эффектов. После решения данных задач можно

получить разложение решения по континуумам, которое схоже с разложением в классическом усреднении.

**Мелкомасштабная модель.** Для моделирования распространения газа в пористых средах зачастую строят модели связанного потока и транспорта. В зависимости от характера потока и масштабов моделирования могут использоваться различные математические модели. При моделировании потока газа в масштабе пор часто используют уравнения Стокса. Однако многоконтинуальное усреднение уравнения Стокса сопряжено с рядом трудностей. С другой стороны, в качестве первого приближения можно рассмотреть более простую модель Дарси, для которой процедура усреднения является более доступной. Транспорт озона может описываться нестационарным уравнением конвекции-диффузии, где искомой величиной является концентрация озона  $c$ . Связь двух уравнений производится с помощью скорости фильтрации  $u = -\kappa \nabla p$ , где  $\kappa$  является проницаемостью, а  $p$  – поровым давлением. Таким образом, мелкомасштабная математическая модель распространения озона в области  $\Omega \subset R^2$  принимает вид:

$$-\nabla \cdot (\kappa \nabla p) = g, \quad x \in \Omega, \quad (1)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} + u \cdot \nabla c - \nabla \cdot (D \nabla c) = h, \quad x \in \Omega, \quad t \in (0, t_{max}], \quad (2)$$

где  $g$  и  $h$  являются некоторыми источниками,  $t_{max}$  обозначает максимальное время (продолжительность моделируемого процесса).

Отметим, что  $\Omega$  представляет собой перфорированную область, и, следовательно, ее граница может быть представлена в виде  $\partial\Omega = \Gamma_L \cup \Gamma_R \cup \Gamma_B \cup \Gamma_T \cup \Gamma_P$ , где  $\Gamma_L$ ,  $\Gamma_R$ ,  $\Gamma_B$ ,  $\Gamma_T$  являются левой, правой, нижней и верхней границами, а  $\Gamma_P$  – границы перфораций (непроницаемых областей скелета). В таком случае можно рассмотреть следующие граничные условия

$$p = p_{in}, \quad x \in \Gamma_L, \quad p = p_{out}, \quad x \in \Gamma_R, \quad -\kappa \frac{\partial p}{\partial \nu} = 0, \quad x \in \partial\Omega \setminus (\Gamma_L \cup \Gamma_R), \quad (3)$$

$$c = c_{in}, \quad x \in \Gamma_L, \quad -D \frac{\partial c}{\partial \nu} = 0, \quad x \in \partial\Omega \setminus \Gamma_L, \quad (4)$$

где  $\nu$  – внешняя единичная нормаль к  $\partial\Omega$ .

Также для задачи транспорта нужно задать некоторое начальное условие

$$c|_{t=0} = c_0, \quad x \in \Omega. \quad (5)$$

С учетом граничных условий можно получить следующую вариационную постановку данной математической модели: найти  $p \in W_p$  и  $c \in W_c$ , такие что

$$\int_{\Omega} \kappa \nabla p \cdot \nabla q = \int_{\Omega} g q, \quad \forall q \in \widehat{W}_p, \quad (6)$$

$$\int_{\Omega} \frac{\partial c}{\partial t} v + \int_{\Omega} (u \cdot \nabla c) v + \int_{\Omega} D \nabla c \cdot \nabla v = \int_{\Omega} h v, \quad \forall v \in \widehat{W}_c, \quad (7)$$

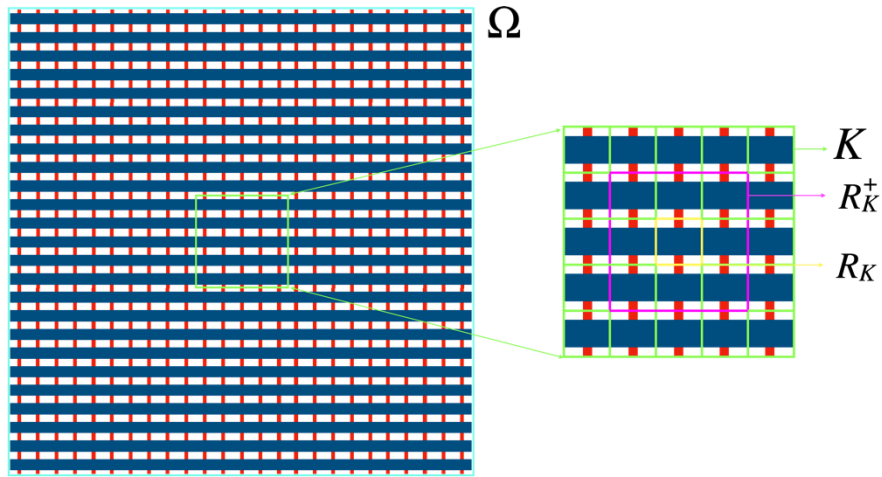
где функциональные пространства заданы следующим образом:

$$W_p = \{w \in H^1(\Omega): w|_{\Gamma_L} = p_{in}, \quad w|_{\Gamma_R} = p_{out}\}, \quad W_c = \{w \in H^1(\Omega): w|_{\Gamma_L} = c_{in}\},$$

$$\widehat{W}_p = \{w \in H^1(\Omega): w|_{\Gamma_L \cup \Gamma_R} = 0\}, \quad \widehat{W}_c = \{w \in H^1(\Omega): w|_{\Gamma_L} = 0\}.$$

Вывод многоконтинуальной модели основан на данной вариационной формулировке.

**Многоконтинуальное усреднение.** Предположим, что область  $\Omega$  была разделена на грубые блоки  $K$ . При этом в каждом грубом блоке можно выделить представительный элемент  $R_K$ , такой что он может представлять весь блок с точки зрения неоднородностей. Более того, предположим, что мы можем расширить данный элемент путем послойного добавления других элементов и получить расширенный представительный элемент  $R_K^+$  (рисунок 45). Также предполагается, что внутри каждого представительного элемента можно выделить  $N$  компонент (континуумов). В данном случае это поровые каналы различных размеров. При этом для каждого континуума можно определить характеристические функции  $\psi_j$ , которые равны 1 в подобласти своего континуума и 0 в других.



**Рис. 45.** Иллюстрация вычислительной области и представительных элементов. Синяя подобласть - континуум крупных пор, красная подобласть - континуум мелких пор

Рассмотрим усреднение задачи потока. В начале нужно сформулировать задачи на ячейках для учета градиентных эффектов

$$\int_{R_K^+} \kappa \nabla \varphi_i^{m,p} \cdot \nabla q - \sum_{j,l} \frac{\beta_{ij}^{ml}}{\int_{R_K^l} \psi_j^l} \int_{R_K^l} \psi_j^l q = 0,$$

$$\int_{R_K^l} \varphi_i^{m,p} \psi_j^l = \delta_{ij} \int_{R_K^l} (x_m - \widetilde{x}_m) \psi_j^l, \quad (8)$$

$$\int_{R_K^{l_0}} (x_m - \widetilde{x}_m) \psi_j^{l_0} = 0,$$

и задачу для учета средних значений

$$\int_{R_K^+} \kappa \nabla \varphi_i^p \cdot \nabla q - \sum_{j,l} \frac{\beta_{ij}^l}{\int_{R_K^l} \psi_j^l} \int_{R_K^l} \psi_j^l q = 0, \quad (9)$$

$$\int_{R_K^l} \varphi_i^p \psi_j^l = \delta_{ij} \int_{R_K^l} \psi_j^l.$$

С помощью решения данных задач можно получить следующие многоконтинуальные разложения

$$p \approx \varphi_i^p P_i + \varphi_i^{m,p} \nabla_m P_i, \quad q \approx \varphi_s^p Q_s + \varphi_s^{k,p} \nabla_k Q_s, \quad (10)$$

Далее используем аппроксимацию с помощью представительных элементов

$$\int_{\Omega} g q = \int_{\Omega} \kappa \nabla p \cdot \nabla q = \sum_K \int_K \kappa \nabla p \cdot \nabla q \approx \sum_K \frac{|K|}{|R_K|} \int_{R_K} \kappa \nabla p \cdot \nabla q. \quad (11)$$

Путем подстановки многоконтинуальных разложений и ряда преобразований (более подробный вывод изложен в [147]) получаем следующую

многоконтинуальную вариационную постановку

$$\int_{\Omega} \kappa \nabla p \cdot \nabla q \approx \int_{\Omega} \widehat{\alpha}_{ij}^{mn} \nabla_m P_i \nabla_n Q_j + \int_{\Omega} \widehat{\beta}_{ij}^m \nabla_m P_i Q_j + \int_{\Omega} \widehat{\beta}_{ij}^m P_i \nabla_m Q_j + \int_{\Omega} \widehat{\beta}_{ij} P_i Q_j, \quad (12)$$

где эффективные свойства задаются следующим образом

$$\widehat{\alpha}_{is}^{km} = \frac{1}{|R_K|} \int_{R_K} \kappa \nabla \varphi_i^{m,p} \cdot \nabla \varphi_s^{k,p}, \quad \widehat{\beta}_{ik}^m = \frac{1}{|R_K|} \int_{R_K} \kappa \nabla \varphi_i^p \cdot \nabla \varphi_k^{m,p},$$

$$\widehat{\beta}_{ik} = \frac{1}{|R_K|} \int_{R_K} \kappa \nabla \varphi_i^p \cdot \nabla \varphi_k^p.$$

Сумма второго и третьего членов справа пренебрежима (см. [144]). Таким образом, получаем следующую многоконтинуальную модель потока

$$-\nabla_n (\widehat{\alpha}_{ij}^{mn} \nabla_m P_j) + \widehat{\beta}_{ij} P_j = g_i. \quad (13)$$

Многоконтинуальное усреднение задачи транспорта проводится аналогичным образом. Первая задача на ячейке примет вид

$$\int_{R_K^+} D \nabla \varphi_i^{m,c} \cdot \nabla v - \sum_{j,l} \frac{\theta_{ij}^{ml}}{\int_{R_K^l} \psi_j^l} \int_{R_K^l} \psi_j^l v = 0,$$

$$\int_{R_K^l} \varphi_i^{m,c} \psi_j^l = \delta_{ij} \int_{R_K^l} (x_m - \widetilde{x}_m) \psi_j^l, \quad (14)$$

$$\int_{R_K^{l_0}} (x_m - \widetilde{x}_m) \psi_j^{l_0} = 0,$$

а вторая задача

$$\int_{R_K^+} D \nabla \varphi_i^c \cdot \nabla v - \sum_{j,l} \frac{\theta_{ij}^l}{\int_{R_K^l} \psi_j^l} \int_{R_K^l} \psi_j^l v = 0, \quad (15)$$

$$\int_{R_K^l} \varphi_i^c \psi_j^l = \delta_{ij} \int_{R_K^l} \psi_j^l.$$

Получаем следующие многоконтинуальные разложения

$$c \approx \varphi_i^c C_i + \varphi_i^{m,c} \nabla_m C_i, \quad v \approx \varphi_s^p V_s + \varphi_s^{k,p} \nabla_k V_s, \quad (16)$$

С помощью аппроксимации представительными элементами и подстановкой многоконтинуальных разложений получаем следующую многоконтинуальную вариационную постановку:

$$\begin{aligned}
& \int_{\Omega} \frac{\partial c}{\partial t} v + \int_{\Omega} (u \cdot \nabla c) v + \int_{\Omega} D \nabla c \cdot \nabla v \\
& \approx \int_{\Omega} \widehat{Y}_{ij} \frac{\partial C_i}{\partial t} V_j + \int_{\Omega} \eta_{ij}^{\widehat{mn}} \nabla_m C_i \nabla_n V_j + \int_{\Omega} \widehat{\Theta}_{ij}^{\widehat{m}} \nabla_m C_i V_j + \int_{\Omega} \widehat{\Theta}_{ij}^{\widehat{m}} C_i \nabla_m V_j \\
& + \int_{\Omega} \widehat{\Theta}_{ij} C_i V_j + \int_{\Omega} P_s C_i V_j \widehat{\zeta}_{sij} + \int_{\Omega} P_s \nabla_m C_i V_j \widehat{\chi}_{sij}^{\widehat{m}} + \int_{\Omega} \nabla_l P_s C_i V_j \widehat{Y}_{sij}^{\widehat{l}} \\
& + \int_{\Omega} \nabla_l P_s \nabla_m C_i V_j \widehat{\iota}_{sij}^{\widehat{lm}},
\end{aligned}$$

где эффективные свойства определяются следующими формулами

$$\begin{aligned}
\widehat{Y}_{ij} &= \frac{1}{|R_K|} \int_{R_K} \varphi_i^c \varphi_j^c, & \eta_{is}^{\widehat{km}} &= \frac{1}{|R_K|} \int_{R_K} D \nabla \varphi_i^{m,c} \cdot \nabla \varphi_s^{k,c}, \\
\widehat{\Theta}_{ik}^{\widehat{m}} &= \frac{1}{|R_K|} \int_{R_K} D \nabla \varphi_i^c \cdot \nabla \varphi_k^{m,c}, \\
\widehat{\Theta}_{ik} &= \frac{1}{|R_K|} \int_{R_K} D \nabla \varphi_i^c \cdot \nabla \varphi_k^c, & \widehat{\zeta}_{sij} &= \frac{1}{|R_K|} \int_{R_K} (-\kappa) (\nabla \varphi_s^p \cdot \nabla \varphi_i^c) \varphi_j^c, \\
\widehat{\chi}_{sij}^{\widehat{m}} &= \frac{1}{|R_K|} \int_{R_K} (-\kappa) (\nabla \varphi_s^p \cdot \nabla \varphi_i^{m,c}) \varphi_j^c, & \widehat{Y}_{sij}^{\widehat{l}} &= \frac{1}{|R_K|} \int_{R_K} (-\kappa) (\nabla \varphi_s^{l,p} \cdot \nabla \varphi_i^c) \varphi_j^c, \\
\widehat{\iota}_{sij}^{\widehat{lm}} &= \frac{1}{|R_K|} \int_{R_K} (-\kappa) (\nabla \varphi_s^{l,p} \cdot \nabla \varphi_i^{m,c}) \varphi_j^c.
\end{aligned}$$

Многоконтинуальная модель транспорта может быть записана следующим образом

$$\widehat{Y}_{ij} \frac{\partial C_j}{\partial t} - \nabla_n (\eta_{ij}^{\widehat{mn}} \nabla_m C_j) + \widehat{\xi}_{ij}^{\widehat{m}} \nabla_m C_j + \widehat{\Theta}_{ij} C_j = h_i, \quad (17)$$

где

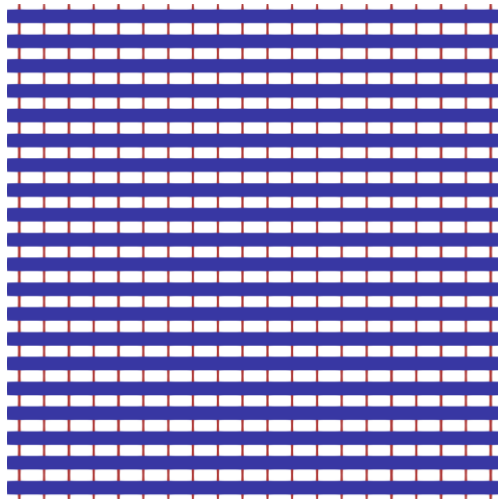
$$\widehat{\xi}_{ij}^{\widehat{m}} = P_s \widehat{\chi}_{sij}^{\widehat{m}} + \nabla_l P_s \widehat{\iota}_{sij}^{\widehat{lm}}, \quad \widehat{\Theta}_{ij} = \widehat{\Theta}_{ij} + P_s \widehat{\zeta}_{sij} + \nabla_l P_s \widehat{Y}_{sij}^{\widehat{l}}.$$

Таким образом, многоконтинуальная модель связанного потока и транспорта в перфорированной среде будет иметь следующий вид

$$\begin{aligned}
& -\nabla_n (\widehat{\alpha}_{ij}^{\widehat{mn}} \nabla_m P_j) + \widehat{\beta}_{ij} P_j = g_i. \quad (18) \\
& \widehat{Y}_{ij} \frac{\partial C_j}{\partial t} - \nabla_n (\eta_{ij}^{\widehat{mn}} \nabla_m C_j) + \widehat{\xi}_{ij}^{\widehat{m}} \nabla_m C_j + \widehat{\Theta}_{ij} C_j = h_i.
\end{aligned}$$

**Численные эксперименты.** Для проверки математической модели

проведем вычисления в области  $\Omega = [0,05] \times [0,05] \text{ м}^2$  с абстрактной пористой структурой (рисунок 46). В рисунке синим изображен первый континуум (крупные поровые каналы), а красным – второй континуум (мелкие поровые каналы). С целью определения влияния давления закачки озона будут рассмотрены различные варианты граничного условия слева для задачи потока, а справа задается фиксированное давление  $p_{out} = 10^5$  Па. Для концентрации слева задается концентрация  $c_{in} = 1$ , а начальное условие  $c_0 = 0$ .



**Рис. 46.** Структура пор (синий цвет – континуум больших пор, красный цвет – континуум малых пор)

В качестве длительности моделируемого процесса задается  $t_{max} = 1200$  с вместе с 50 временными шагами. Коэффициент диффузии устанавливается равным  $D = 1.86 \times 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$  в мелких поровых каналах и  $D = 1.86 \times 10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}$  в крупных поровых каналах. Коэффициент проницаемости задается равным  $k = 2.8 \times 10^{-15} \text{ м}^2 / (\text{Па} \cdot \text{с})$  в мелких порах и  $k = 2.8 \times 10^{-12} \text{ м}^2 / (\text{Па} \cdot \text{с})$  в крупных порах. Необходимо отметить, что данные эксперименты носят качественный характер. Точные количественные расчеты требует экспериментального определения свойств среды, пористой структуры и рассмотрения более сложных моделей потока на мелком масштабе.

Вычислительные сетки для мелкомасштабных моделей содержат 210967 вершин и 391854 треугольных ячеек. В качестве грубой сетки рассматривается равномерная сетка с 441 вершиной и  $20 \times 20$  прямоугольными ячейками. Отметим, что в данных численных экспериментах для простоты реализации мы принимаем  $R_K = K$ . Для построения  $R_K^+$  мы расширяем  $R_K$  на  $l = 6$  слоев.

Для численного решения обеих моделей используется метод конечных элементов со стандартными линейными конечными элементами. Временная дискретизация проводится с помощью неявной схемы. Вычислительная реализация методов основана на открытом вычислительном пакете FEniCS [148]. Сетки сгенерированы с помощью программы Gmsh [149].

Для проверки эффективности многоконтинуального усреднения используются следующие относительные погрешности (в финальный момент времени)

$$e^{(i)} = \sqrt{\frac{\left| \sum_K \left| \frac{1}{|K|} \int_K C_i dx - \frac{1}{\left| \int_K \psi_i dx \right|} \int_K c \psi_i dx \right|^2}{\sum_K \left| \frac{1}{\left| \int_K \psi_i dx \right|} \int_K c \psi_i dx \right|^2}}, \quad (19)$$

где  $c$  обозначает концентрацию, вычисленную с помощью мелкомасштабной модели, а  $C_i$  – концентрации в континуумах ( $i = 1, 2$ ).

Таблица 23 содержит относительные погрешности многоконтинуального усреднения в финальный момент времени, вычисленные для разных граничных условий. Как видно из таблицы, предложенный подход многоконтинуального усреднения позволяет добиться высокой точности при значительном сокращении вычислительных затрат.

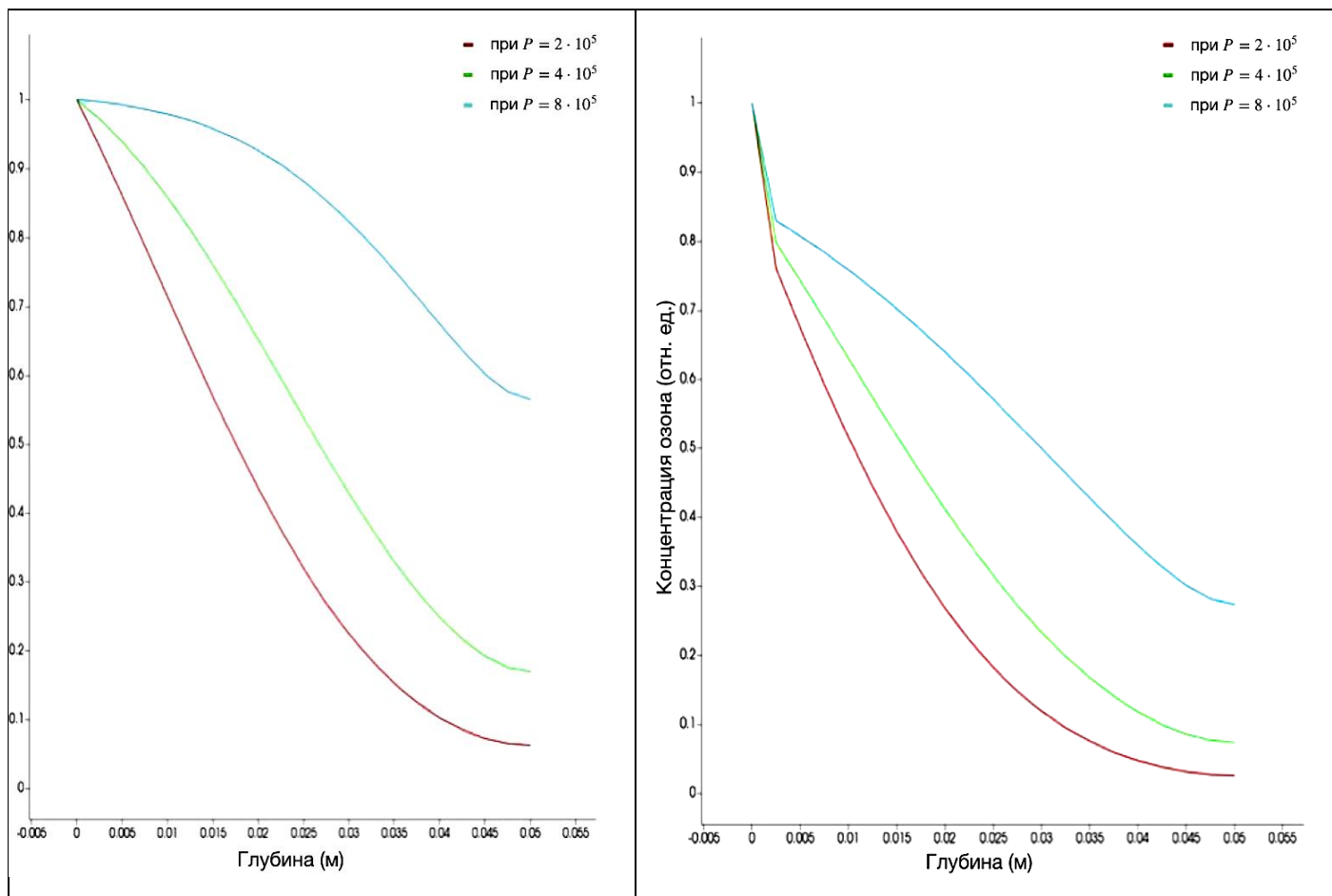
**Таблица 23.** Относительные погрешности в финальный момент времени (%)

Давление на границе	$p_{in} = 2 \cdot 10^5$		$p_{in} = 4 \cdot 10^5$		$p_{in} = 8 \cdot 10^5$	
	$e^1$ (%)	$e^2$ (%)	$e^1$ (%)	$e^2$ (%)	$e^1$ (%)	$e^2$ (%)
Погрешность	0.28	4.69	0.32	3.86	0.23	2.87

На рисунке 47 изображены графики поперечного сечения распределений концентрации озона в финальный момент времени для различных граничных условий давления. Из графиков видно, что концентрация озона уменьшается по мере увеличения глубины. Заполняемость озоном малых пор меньше, чем у больших пор. Также можно наблюдать, что увеличение давления озона



существенно влияет на общую концентрацию в финальный момент времени.



**Рис. 47.** Концентрация озона в зависимости от глубины для континуума больших пор и континуума малых пор (слева направо)

Таким образом, предложена многоконтинуальная модель для описания распространения озона в костных образцах с помощью подхода многоконтинуального усреднения. В качестве мелкомасштабной модели рассмотрена связанная модель потока и транспорта. Сформулированы специальные задачи на ячейках, получены многоконтинуальные разложения и выведены многоконтинуальные уравнения.

Численные эксперименты были проведены с целью проверки эффективности многоконтинуального усреднения и оценки общей качественной динамики распространения озона. Для этого были вычислены относительные погрешности в сравнении с эталонным усредненным решением на основе мелкомасштабной модели. Результаты показали, что предложенная многоконтинуальная модель позволяет добиться высокой точности при значительном сокращении вычислительных затрат.

С точки зрения моделируемого процесса было исследовано влияние граничного давления на проникновение озона в мелкие и крупные поры. Результаты показали постепенное снижение концентрации озона по мере увеличения глубины. Концентрация озона в малых порах меньше, чем в крупных. Граничное давление существенно влияет на общее проникновение озона. Таким образом, для оптимальной озоновой обработки следует обратить особое внимание на давление, с которым производится закачка.

Следует отметить, что данное исследование носит качественный характер. Для более точного прогнозирования следует рассмотреть более сложные мелкомасштабные модели на основе уравнений Стокса. Вместо абстрактных пористых структур необходимо рассмотреть структуры на основе реальных образцов.