

---

---

**Износ материалов имплантатов.  
Полимерные и металлические частицы  
продуктов износа. Выделение и  
определение характеристик**

*Wear of implant materials — Polymer and metal wear particles —  
Isolation and characterization*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 17853:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/94a2ce20-86df-48bb-90ee-4ee5533af047/iso-17853-2011>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R  
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер  
ISO 17583:2011(R)

**Отказ от ответственности при работе в PDF**

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на интегрированные шрифты и они не будут установлены на компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe - торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованные для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 17583:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/94a2ce20-86df-48bb-90ee-4ee5533af047/iso-17583-2011>



**ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ**

© ISO 2011

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO по адресу ниже или представительства ISO в соответствующей стране.

Бюро авторского права ISO  
Почтовый ящик 56 • CH-1211 Женева 20  
Тел. + 41 22 749 01 11  
Факс + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Опубликовано в Швейцарии

## Содержание

Страница

Предисловие .....	iv
Введение .....	v
1 Область применения .....	1
2 Термины и определения .....	1
3 Принцип, реагенты и аппаратура .....	1
3.1 Принцип .....	1
3.2 Реагенты .....	2
3.3 Аппаратура .....	2
4 Метод отбора и анализа полимерных и металлических частиц продуктов износа из образцов ткани .....	3
4.1 Хранение и подготовка образцов .....	3
4.2 Процедура выделения полимерных частиц .....	4
4.3 Процедура выделения металлических частиц .....	5
4.4 Сбор частиц .....	6
4.5 Определение характеристик формы и размера частиц .....	7
4.6 Идентификация частиц .....	9
5 Методы отбора и анализа полимерных и металлических частиц из смазочного материала моделей суставов .....	9
5.1 Общие положения .....	9
5.2 Процедура для полимерных материалов. Например, UHMWPE и полиэфирэфиркетон (polyetheretherketone, ПEEK) .....	9
5.3 Процедура для металлических частиц .....	11
5.4 Процедуры для керамических частиц .....	14
6 Протокол испытания .....	14
Библиография .....	15

## Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. Что касается стандартизации в области электротехники, то ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

Проекты международных стандартов разрабатываются в соответствии с правилами Директив ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов заключается в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего международного стандарта могут быть объектом патентных прав. ISO не может нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO 17583 был подготовлен Техническим Комитетом ISO/TC 150, *Имплантаты хирургические*, Подкомитетом SC 4, *Заменители костей и суставов*.

Настоящее третье издание отменяет и заменяет второе издание (ISO 17583:2010), в которое внесены незначительные изменения.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/94a2ce20-86df-48bb-90ee-4ee5533af047/iso-17583-2011>

## Введение

Биологическая реакция на частицы продуктов износа способствует отказу имплантата сустава из-за резорбции кости и последующего отсоединения имплантата. Стандартизированный метод извлечения частиц из тканей и последующего определения характеристик частиц необходим для обеспечения того, что исследования влияния частиц продуктов износа осуществляются с использованием единого подхода. Описание характеристик частиц, получаемых из имплантатов в моделях суставов, также представляют ценную информацию о свойствах и рабочих характеристиках изучаемых имплантатов.

В протоколах, включенных в настоящий международный стандарт, для выделения и определения характеристик частиц, как из тканей, так и из жидкой испытательной среды в модели сустава, частицы выделяются, а затем распределяются с помощью фильтрации или введения в смолу для анализа с использованием сканирующей электронной микроскопии (scanning electron microscopy, SEM) и трансмиссионной электронной микроскопии (transmission electron microscopy, TEM). В последнее время были разработаны альтернативные протоколы выделения и описания характеристик металлических частиц испытываемых имплантатов в модели сустава, в которых частицы осаждаются на пластинах для анализа SEM, без фильтрации или введения<sup>[1]</sup>. На момент публикации настоящего международного стандарта, этот альтернативный метод еще не был проверен на выделение и описание характеристик частиц из тканей, и прямое сравнение различных методов было не доступно. Таким образом, не были включены детали последнего метода.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 17583:2011](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/94a2ce20-86df-48bb-90ee-4ee5533af047/iso-17583-2011)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/94a2ce20-86df-48bb-90ee-4ee5533af047/iso-17583-2011>



# Износ материалов имплантатов. Полимерные и металлические частицы продуктов износа. Выделение и определение характеристик

## 1 Область применения

В данном международном стандарте установлены методы отбора проб частиц продуктов износа, образованных имплантатами для замены сустава в организме человека и в моделях суставов. В нем определены приборы, реактивы и методы испытаний для выделения и определения характеристик как полимерных, так и металлических частиц продуктов износа из образцов ткани, вырезанных из областей, окружающих разные имплантаты для замены сустава, полученных при повторной операции или после смерти, и из образцов жидкой испытательной среды при испытаниях в модели. Некоторые из этих процедур, безусловно, могут быть адаптированы для выделения и определения характеристик частиц из биологических жидкостей человека (например, синовиальной жидкости).

Методы, приведенные в данном международном стандарте, не определяют количественно уровень износа имплантата или степень износа какой-либо конкретной поверхности. Настоящий стандарт не распространяется на биологическое влияние частиц продуктов износа и не предоставляет метод оценки биологической безопасности.

## 2 Термины и определения

В рамках настоящего стандарта используются следующие термины и определения.

### 2.1

**полимерные частицы продуктов износа**

**polymer wear particle**

частицы, образованные при износе полимерных компонентов имплантата

### 2.2

**металлические частицы продуктов износа**

**metal wear particle**

частицы и частицы продуктов коррозии, образованные износом металлических компонентов имплантата

### 2.3

**керамические частицы продуктов износа**

**ceramic wear particle**

частицы, образованные износом керамических компонентов имплантата

## 3 Принцип, реагенты и аппаратура

### 3.1 Принцип

Полимерные и металлические частицы продуктов износа выделяются из образцов ткани и смазочных материалов модели путем гидролиза. Полученные частицы каждого вида затем очищают путем удаления всех оставшихся органических остатков.

ПРИМЕЧАНИЕ Методы для выделения полимерных и металлических частиц разные и описаны в 4.2 и 4.3, соответственно.

Частицы собираются, их характеристики определяются и подсчитываются (если применимо) с помощью сканирующей электронной микроскопии (scanning electron microscopy, SEM) и трансмиссионной электронной микроскопии (transmission electron microscopy, TEM).

### 3.2 Реагенты

Во время анализа, если не указано иное, используйте только реагенты признанной аналитической чистоты и дистиллированную воду или воду эквивалентной чистоты.

Все растворы реагентов перед использованием необходимо фильтровать через фильтр с размером пор 0,2 мкм или меньше, чтобы избежать загрязнения образцов посторонними частицами.

#### 3.2.1 Абсолютный спирт (этанол).

3.2.2 **Ацетон**, 100 % или разбавленный дистиллированной водой с объемной фракцией ацетона 80 %.

#### 3.2.3 Дистиллированная вода.

3.2.4 **Фиксатор**, например, формалин, разбавленный дистиллированной водой с объемной фракцией формалина 10 %.

3.2.5 **Раствор соляной кислоты**, HCl,  $c = 0,01$  моль/л.

3.2.6 **Смесь изопропанол-вода**,  $\rho = 0,96$  г/см<sup>3</sup> и  $\rho = 0,90$  г/см<sup>3</sup>.

3.2.7 **Раствор папаина**, содержащий 25 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) при 4,8 ЕД/1,5 мл 250 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 7,4.

3.2.8 **Натрий-фосфатный буфер**, содержащий 25 мМ ЭДТА при 250 мМ, pH 7,4.

3.2.9 **К протеиназа**, 2 г/мл на 50 мМ TRIS-гидрохлорида (TRIS-HCl), pH 7,6.

**ПРИМЕЧАНИЕ** Для частиц, выделенных из смазочных материалов моделей суставов, величина должна быть скорректирована в зависимости от процентного содержания масла в смазочном материале и начального объема смазочного материала, из которого выделены частицы. См. 5.3.2.

3.2.10 **Смола**, эпоксидная, такая как EMbed 812.

3.2.11 **Додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate, SDS)**, 2,5 г/100 мл дистиллированной воды или 3 г/100 мл 80 % ацетона.

3.2.12 **Гидрохлорид натрия**, NaOH, растворы и гранулы,  $c = 5$  М.

3.2.13 **Растворы сахаров**,  $\rho = 1,35$  г/см<sup>3</sup>, 1,17 г/см<sup>3</sup>, 1,08 г/см<sup>3</sup>, 1,04 г/см<sup>3</sup> и 1,02 г/см<sup>3</sup>.

3.2.14 **Буфер TRIS -гидрохлорид**, TRIS-HCl, на 50 мМ, pH 7,6.

### 3.3 Аппаратура

Все аппараты перед использованием должны быть очищены и трижды промыты дистиллированной водой, ранее отфильтрованной через фильтр с размером пор 0,2 мкм (3.3.6), чтобы удалить любые загрязняющие частицы.

3.3.1 **Алюминиевая стойка.**

3.3.2 **Балансир**, с точностью не менее 0,1 мг.

3.3.3 **Карбоновый клеящий материал.**



- 3.3.4 Пробирки для центрифуги, различных размеров.
- 3.3.5 Центрифуга.
- 3.3.6 Фильтры, с размером пор 0,2 мкм для фильтрации реагентов и дистиллированной воды.
- 3.3.7 Фильтрующая установка.
- 3.3.8 Медные сетки, покрытые формваром, с размером ячейки 200 для TEM анализа.
- 3.3.9 Инфракрасный спектрометр Фурье (Fourier Transform Infrared, FTIR).
- 3.3.10 Нагревательная пластина.
- 3.3.11 Ткань без ворса.
- 3.3.12 Пипетки, микропипетки и наконечники.
- 3.3.13 Поляризационный микроскоп.
- 3.3.14 Фильтры с поликарбонатной мембраной, с размером пор 10 мкм, 1 мкм, 0,1 мкм, 0,05 мкм и 0,015 мкм, для сбора частиц.
- 3.3.15 Сканирующий электронный микроскоп (scanning electron microscope, SEM), с модулем энергетического дисперсионного рентгеновского анализа (energy dispersive X-ray analysis, EDXA).
- 3.3.16 Стерильные чашки Петри, с крышками.
- 3.3.17 Шприц, с иглой с широким отверстием.
- 3.3.18 Тефлоново-стеклянный гомогенизатор ткани.
- 3.3.19 Трансмиссионный электронный микроскоп (transmission electron microscope, TEM), с модулем энергетического дисперсионного рентгеновского анализа (energy dispersive X-ray analysis, EDXA).
- 3.3.20 Ультразвуковой клеточный деструктор, оборудованный титановой микрозондом.
- 3.3.21 Ультразвуковая ванна.
- 3.3.22 Водяная баня, с контролируемой температурой и перемешиванием.

## 4 Метод отбора и анализа полимерных и металлических частиц продуктов износа из образцов ткани

### 4.1 Хранение и подготовка образцов

Храните ткани при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  (или ниже) в морозильной камере, или при комнатной температуре в фиксаторе, таком как формалин (3.2.4), разбавленном дистиллированной водой (3.2.3), до объемной доли формалина 10% . Разморозьте ткань, если применимо, и промойте ее в дистиллированной воде, прежде чем продолжить экстракцию. Удалите излишки воды из промытой ткани, промокнув ее тканью без ворса (3.3.11).

Незафиксированные ткани должны быть обработаны в обычных условиях.

Должен быть записан вид хирургических инструментов, используемых для извлечения образца, в случае загрязнения.

ПРИМЕЧАНИЕ Может наблюдаться изменчивость выборки, связанная с происхождением образцов.

## 4.2 Процедура выделения полимерных частиц

### 4.2.1 Гидролиз ткани

Есть много опубликованных методов выделения полимерных частиц из тканей, прилегающих к протезу. Методы, представленные здесь, основаны на методах К Campbell et al.<sup>[2]</sup>, Tipper et al.<sup>[3]</sup> и Richards et al.<sup>[4]</sup>.

Перед гидролизом порежьте ткань на мелкие кусочки с помощью скальпеля и лезвия для уменьшения времени гидролиза. Удалите липиды из измельченной ткани, поместив в смесь хлороформ:метанол в соотношении объемов 2:1 на 24 ч или до тех пор, пока ткань не опустится на дно контейнера. Достаньте ткань и промойте с использованием PBS (3.2.8).

Добавьте к ткани 5 М NaOH (3.2.12) (10 мл 5 М NaOH на 1 г ткани) и оставьте подвергаться гидролизу на, как минимум, 24 часа в водяной бане с перемешиванием (3.3.22) при температуре 65°C. Можно считать гидролиз завершенным, когда в суспензии не будет видимых твердых кусочков ткани.

### 4.2.2 Очистка полученных полимерных частиц

#### 4.2.2.1 Общие положения

Полимерные частицы могут быть очищены от гидролизованной ткани несколькими способами. Используйте один из методов, описанных в 4.2.2.2 или 4.2.2.3.

#### 4.2.2.2 Очистка полимерных частиц высокоскоростным центрифугированием

Этот метод позволяет собрать частицы всех размеров от нанометрового диапазона до нескольких миллиметров в длину, что позволяет выделить общий объем частиц. Охладите гидролизованную ткань до 4 °C. Добавьте равный объем ледяного абсолютного спирта (3.2.1). В этот момент соли могут выпасть в осадок. Если это так, добавьте высокоочищенной воды до растворения солей. Инкубируйте раствор при температуре 4 °C в течение ночи, постоянно перемешивая. Центрифугируйте раствор при 20 000 g в течение 2 ч при температуре 4 °C. Отфильтруйте надосадочную жидкость в чистую пробирку (3.3.4) и разбавьте 400 мл высокоочищенной воды для фильтрации.

#### 4.2.2.3 Очистка полимерных частиц ультрацентрифугированием

Поместите 2 мл каждого раствора сахарозы (3.2.13) ( $\rho=1,35 \text{ г/см}^3$ ,  $1,17 \text{ г/см}^3$ ,  $1,08 \text{ г/см}^3$ ,  $1,04 \text{ г/см}^3$  и  $1,02 \text{ г/см}^3$ ) в пробирки для центрифуги (3.3.4), так чтобы пробирки были заполнены примерно на три четверти, и добавьте точно измеренное небольшое количество суспензии гидролизованной ткани на поверхность раствора сахарозы в каждую пробирку. Ультрацентрифугируйте на 100 000 g в течение 3 ч при температуре 5°C. Осторожно соберите верхний слой в стерильную пробирку и разбавьте дистиллированной водой при температуре 65°C, чтобы помочь разбавить остаточную сахарозу. Подвергните воздействию ультразвука в течение 10 мин, чтобы разбить агрегированные частицы и нагревайте в течение 1 ч при температуре 80 °C для растворения сахарозы.

Поместите измеренные объемы суспензии в двухслойную смесь изопропанол-вода (3.2.6) плотностью  $0,90 \text{ г/см}^3$  и  $0,96 \text{ г/см}^3$ , находящуюся в пробирках для ультрацентрифуги. Ультрацентрифугируйте их при 100 000 g в течение 1 ч при температуре 20°C. После извлечения пробирок из ротора ультрацентрифуги, на границе раздела двух слоев должен быть виден слой белых частиц. Удалите этот слой, содержащий полимерные частицы, и поместите в стерильную пробирку, используя стеклянную пипетку с острым концом (3.3.12), введенную через верхний, изопропаноловый, слой. Подвергните воздействию ультразвука в течение 10 мин, чтобы разбить любые агрегаты.

Могут использоваться другие времена и скорости ультрацентрифугирования при условии, что было продемонстрировано, что они дают такую же степень разделения и результаты проверки процедуры были документально оформлены.

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Первый шаг ультрацентрифугирования служит для отделения легких полимерных частиц

продуктов износа от тяжелых фракций. Второй шаг ультрацентрифугирования очищает полученные полимерные частицы, пропуская его через меньший градиент плотности.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Этот метод может отделять полимерные частицы крупнейших размеров и, следовательно, общий объем продуктов износа не может быть выделен.

### 4.3 Процедура выделения металлических частиц

Из-за растворимости металлов в сильных кислотах и щелочах нужно использовать ферментативный метод гидролиза. Приведенный ниже метод был описан Catelas et al.<sup>[5]</sup> и похож на методику, разработанную ранее теми же авторами для выделения частиц из смазочных материалов моделей суставов (см. Раздел 5); он включает лишь незначительные различия на начальных этапах, а также в концентрации фермента в расчете на использование тканей вместо смазочных материалов.

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Возможность использования той же самой процедуры для выделения и определения характеристик частиц из тканей и смазочных материалов моделей суставов позволяет провести прямое и точное сравнение выделенных частиц, что важно, например, для проверки модели сустава. Это является существенным преимуществом данной процедуры.

- a) Разрежьте ткань на мелкие кусочки с помощью скальпеля и лезвия для уменьшения времени гидролиза. Проведите перерастворение нескольких маленьких кусочков (около 2 мм × 2 мм × 2 мм) в пробирках 2 мл.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Вес ткани зависит от общего износа, отмеченного у пациента, а также кусочка ткани, используемого для выделения частиц (например, гранулема, капсула).

Рекомендуется живой вес от 100 мг до 150 мг, но он может быть скорректирован по мере необходимости.

- b) Промойте четыре раза в течение 2 мин. в натрий-фосфатном буфере (3.2.8), pH 7,4.
- c) Проведите перерастворение кусочков ткани в 1 мл SDS (3.2.11) (2,5 г/100 мл дистиллированной воды) и прокипятите в течение 10 мин. Во время кипячения, гомогенизируйте кусочки ткани в растворе, используя тефлоново-стеклянный гомогенизатор ткани (3.3.18) через каждые 2 мин.
- d) Охладите при комнатной температуре в течение 10 мин.
- e) Центрифугируйте пробирки при 16 000 g в течение 10 мин.
- f) Промойте один раз в 1 мл ацетона (3.2.2), разбавленного дистиллированной водой с объемной долей ацетона 80%. Центрифугируйте на 16 000 g в течение 10 мин.
- g) Промойте три раза в 1 мл на 250 мМ натрий-фосфатного буфера, содержащего 25 мМ ЭДТА, pH 7,4. Центрифугируйте при 16 000 g в течение 10 мин. для каждой промывки.
- h) Воздействуйте ультразвуком в 1 мл 250 мМ натрий-фосфатного буфера, содержащего 25 мМ ЭДТА, pH 7,4, в течение от 20 с до 25 с, с использованием ультразвукового клеточного деструктора, оснащенного микрозондом, или воздействуйте ультразвуком в водяной бане в течение 30 мин.

Использование ультразвукового клеточного деструктора является более эффективным, но следует использовать соответствующие аппараты с чистым и неповрежденным/некорродированным зондом, чтобы избежать возможного загрязнения от титанового зонда.

- i) Добавить 0,5 мл 250 мМ натрий-фосфатного буфера, содержащего 25 мМ ЭДТА, pH 7,4, и папаин (3.2.7) (4,8 единиц на 1,5 мл натрий фосфатного буфера). Инкубируйте в водяной бане с перемешиванием (3.3.22) в течение 24 ч при температуре 65 °C.
- j) Центрифугируйте пробирку на 16 000 g в течение 10 мин.
- k) Осторожно снимите жидкость, используя микропипетки, не касаясь гранул на дне пробирки.