

КИРИЛЕНКО

Андрей Геннадьевич

**НОВЫЕ АЛЛОГЕННЫЕ ГУБЧАТЫЕ ПОРИСТЫЕ МАТЕРИАЛЫ
И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

14.00.22 - травматология и ортопедия

14.00.23 - гистология, цитология, эмбриология.

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Самара – 1999г.

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ :

доктор медицинских наук, профессор Котельников Г.П.;
доктор медицинских наук Волова Л.Т.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор медицинских наук, профессор Савин А.М.
доктор медицинских наук, профессор Стадников А.А.

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Саратовский Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии.

Защита состоится 22 декабря 1999г. в 13 часов на заседании диссертационного Совета Д 084.27.01 при Самарском государственном медицинском университете (443021, г. Самара, ул. Московское шоссе, 2а)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Самарского государственного медицинского университета (г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171)

Ученый секретарь диссертационного Совета
Доктор медицинских наук, профессор Иванова В.Д.

Общая характеристика работы

Актуальность темы диссертации

Современная хирургия несёт элементы реконструктивности. Травмы, врождённые деформации, гнойно-деструктивные, опухолевые и кистозные процессы, как правило, требуют хирургического вмешательства. Комплексные методы лечения предполагают, наряду с устранением патологических изменений в костях, быстрое восстановление первоначальной анатомической формы, гистологической структуры и опорно-двигательной функции.

Для замещения разрушенных участков в костях используют разнообразные пластические материалы органического (В.И. Савельев, 1985; И.Г. Брус с соавт., 1989; В.П. Нечипоренко с соавт., 1992; Н.А. Плотников, 1993; Г.Г. Мингазов, 1996; Г.П. Котельников, Л.Т. Волова, 1997) и неорганического происхождения (Н.А. Плесская с соавт., 1988; Okazaki M., 1991; Kay J., 1992; Hotz G., 1998.), а также сочетание коллагеновых структур с гидроксиапатитом (В.А. Поляков с соавт., 1989; Т.К. Хамраев с соавт., 1994; А.Ф. Краснов, С.Д. Литвинов, 1996; Hollinger J. et al., 1996; Romanos et al., 1998.).

Особое место среди биогенных материалов занимает аллогенная губчатая костная ткань, заготавливаемая впрок, в достаточном количестве, без дополнительных травм реципиенту. При трансплантации аллогенная спонгиоза выполняет роль матрицы. Благодаря природной пористости, она быстро реваскуляризируется, рассасывается, одновременно замещаясь собственной органотипичной костной тканью (Ю.А. Петрович с соавт., 1992; Sayler M.F. et al. 1980; Donald J. et al., 1990; Moazamu-Goudarzi Y. et al., 1994).

Изготовление аллогенных пористых трансплантатов связано с удалением из спонгиозы элементов костного мозга, от тщательности удаления которых зависит качество материала, так как чужеродный костный мозг является выраженным антигеном. Известные технологии обработки аллогенной спонгиозы чрезвычайно трудоемки, долгосрочны, требуют большого количества химических реактивов.

Весьма эффективным способом консервации костных материалов является лиофилизация. Этот метод не только уменьшает антигенность биотканей, но и позволяет длительное время (5 лет и более) хранить их при комнатной температуре. Однако трансплантация аллогенной спонгиозы нежелательна в заведомо инфицированные дефекты (А.И. Грудянов с соавт., 1998). Поэтому создание трансплантатов с низкой антигенностью и, в определенных условиях, с выраженной антимикробной направленностью является весьма важным.

Внедрение в процесс заготовки аллогенных костных тканей современных физических факторов позволит сократить сроки изготовления трансплантатов и оптимизировать технологию производства, которая становится экологически чистой. Одним из таких факторов является низкочастотный ультразвук. Его свойства - такие, как кавитация, микротоки, акустические течения, капиллярные волны - разрушают клеточные структуры, коллоидные агрегаты и белковые комплексы. (А.А. Чиркин, 1978; В.С. Улащик, 1983). Капиллярные волны, действуя как «капиллярный насос», способствуют эвакуации из биологических структур патологического содержимого и отработанных промывных жидкостей. Низкочастотный ультразвук усиливает сорбционные свойства тканевых структур, способствует депонированию лекарственных препаратов (В.И. Лоцилов, 1980; И.В. Мозговой, 1982; В.П. Кирилова, 1986; В.П. Бережной, 1986; В.Д. Архипов, 1990).

Цель исследования:

повысить качество губчатого костно-пластического материала за счет использования новых экологически чистых технологий и обосновать эффективность его клинического применения в травматологии и ортопедии.

Задачи исследования

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Обосновать возможность использования низкочастотного ультразвука в технологическом процессе производства губчатых костных аллотрансплантатов для улучшения биопластических свойств костных трансплантатов.
2. С помощью морфологических и биохимических методов исследований определить содержание липидов в губчатой костной ткани до и после обработки её низкочастотным ультразвуком наряду с общепринятыми методами заготовки аллогенной спонгиозы.
3. Исследовать микробиологическими методами костный материал, обработанный низкочастотным ультразвуком на стерильность; *in vitro* и *in vivo* на антимикробный эффект после насыщения спонгиозы антибиотиками в условиях ультразвука.
4. Изучить реакцию периферических органов иммуногенеза у крыс на эктопическую трансплантацию аллогенной спонгиозы, полученной с использованием низкочастотного ультразвука морфологическими и морфометрическими методами исследования.
5. В эксперименте на кроликах изучить посттрансплантационный остеогенез при пересадке аллогенной консервированной губчатой костной ткани в дефект спонгиозы нижней челюсти.
6. Внедрить костнопластические материалы, полученные по новой технологии в клиники и провести анализ их применения при реконструктивных операциях у травматолого-ортопедических больных .
7. В процессе предоперационной подготовки лиофилизированного биопластического материала отработать режимы регидратации с помощью ультразвукового воздействия.
8. Определить показания к хирургическому применению аллогенной спонгиозы, полученной с использованием ультразвука, у взрослых и детей с патологией костной ткани.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые в технологическом процессе получения губчатых костно-пластических материалов использован низкочастотный ультразвук:

- для удаления элементов костного мозга из губчатой костной ткани (приор. справка на изобретение № 99108699 от 05.05.99г.).
- для стерилизации костных трансплантатов (приор. справка на изобретение № 99105275 от 24.03.99г.).
- для получения костно-пластического материала с выраженной антибактериальной направленностью (приор справка на изобретение № 99103136 от 24 02.99г.).

- для ускоренной и качественной регидратации лиофилизированной губчатой костной ткани в процессе ее предоперационной подготовки.

В эксперименте на животных установлено, что костно-пластический материал, полученный с использованием низкочастотного ультразвука, после его трансплантации в костный дефект реципиента обладает высокими биопластическими свойствами, низкой антигенностью, антимикробным эффектом и обеспечивает репаративный остеогенез.

Применение аллогенной спонгиозы в клинике травматологии и ортопедии показало высокую эффективность пластического материала для заполнения послеоперационных дефектов у больных всех возрастных групп с фиброзно-кистозной дисплазией, кистами, доброкачественными новообразованиями и дефектами костей.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ РАБОТЫ

Практическая ценность работы и эффективность исследований, выполненных в диссертации заключается в следующем.

Получен качественно новый аллогенный материал с высокими биопластическими свойствами, обладающий низкой антигенностью, способствующий репарации утраченных костных структур у больных с патологией скелета.

Новые технологии позволяют получить костный материал с выраженной антимикробной направленностью, что расширяет спектр его применения при гнойно-деструктивных процессах и латентной инфекции в костях.

Разработан новый способ стерилизации аллогенной спонгиозы.

Оптимизирован процесс заготовки аллогенных тканей: в 10 раз сокращены сроки обработки материала; в 2 раза снижен расход химических реактивов.

Использование низкочастотного ультразвука позволяет обеспечить быстрый и качественный способ регидратации лиофилизированного костно-пластического материала.

РЕАЛИЗАЦИЯ РАБОТЫ

Разработанные способы удаления костного мозга из губчатой костной ткани (приор. справка № 99108699 от 05.05.99г.); стерилизации костных трансплантатов (приор. справка № 99105275 от 24.03.99г.); насыщения костных трансплантатов медикаментами (приор. справка № 99103136 от 24.02.99г.) внедрены при изготовлении губчатых костных трансплантатов в отделении консервации центральной научно-исследовательской лаборатории Самарского государственного медицинского университета.

Аллогенный губчатый костно-пластический материал используется при лечении гнойно-деструктивных, кистозных и опухолевых процессов в костях на кафедре травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии Самарского государственного медицинского университета; в детском травматологическом отделении городской больницы № 1 им. Н.И. Пирогова; в НИИТО г. Саратова; в областной стоматологической поликлинике г. Самары, офтальмологической клинической больнице им. Т.И. Ерошевского г. Самары.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Низкочастотный ультразвук может быть использован для удаления элементов костного мозга из губчатой костной ткани с целью снижения антигенности материала.

2. Возможность применения низкочастотного ультразвука для стерилизации костных трансплантатов.
3. Целесообразность использования фонофореза для насыщения губчатой костной ткани лекарственными веществами (антибиотиками).
4. Возможность использования низкочастотного ультразвука для регидратации лиофилизированной спонгиозы.
5. Результаты клинического применения аллогенных губчатых костных трансплантатов, изготовленных по новой технологии с использованием низкочастотного ультразвука.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Материалы диссертации доложены и обсуждены на заседаниях центральной научно-исследовательской лаборатории Самарского государственного медицинского университета (1998, 1999г.); 34 научно-практической конференции врачей Ульяновской области (1999г.); на расширенном заседании кафедры травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии Самарского государственного медицинского университета (1999).

По материалам диссертации опубликованы 4 научные работы, получены 3 приоритетные справки на изобретения.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения, практических рекомендаций и указателя используемой литературы. Текст изложен на 179 страницах машинописи, иллюстрирован таблицами (15) и рисунками (55). В указателе литературы содержится 278 отечественных и 117 иностранных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Собственные данные представлены в двух разделах: экспериментальном и клиническом. В первом из них освещены и проанализированы исследования губчатой костной ткани, полученных из эпифизов длинных трубчатых костей трупов-доноров. Эксперименты на животных направлены на изучение биопластических свойств аллогенных пористых материалов.

В клиническом разделе изложены и оценены результаты хирургического лечения больных, у которых использовались аллогенные лиофилизированные губчатые костные ткани, изготовленные по нашей технологии.

Эксперименты на животных

Эксперименты проводились на кроликах и крысах. Все животные содержались в одинаковых условиях, в закрытых теплых помещениях. Пищевой режим обычный.

Опыты на крысах осуществляли с целью изучения реакции периферических органов иммуногенеза на пересадку лиофилизированных губчатых костных трансплантатов. Эксперименты выполнены на 20 белых лабораторных крысах массой 200-220г, которым произведена пересадка губчатой костной ткани. Наблюдение за животными проводили в течение 7 суток.

Животные были разделены на 3 серии в зависимости от вида пересаженного материала. В 1-й и 2-й серии использовали аллоспонгиозу, в 3-й серии

применяли ксеноспонгиозу, контролем служили не оперированные животные(Табл.1).

Таблица 1. Характеристика экспериментов на крысах

Количество операций в области				
Правой задней лапы	Левой задней лапы	Итого		
Аллогенная губчатая костная ткань, полученная с применением низкочастотного ультразвука (крысиная)	5	5	5	10
Аллогенная губчатая костная ткань, полученная без применения низкочастотного ультразвука (крысиная)	5	5	5	10
Ксеногенная губчатая костная ткань, полученная с применением низкочастотного ультразвука (человеческая)	5	5	5	10
Контрольная группа	5			
ИТОГО	20	15	15	30

Методика операций на крысах. Операцию проводили под эфирным наркозом. При достижении рауш-наркоза в области бедра обеих задних лап удалялся волосяной покров, кожу обрабатывали дважды 3% раствором йода. Проводили разрез кожи длиной 1,0 см, мышцы тупо раздвигали зажимом, внутримышечно помещали трансплантат. На кожу накладывали один шов и обрабатывали йодом.

Опыты на кроликах осуществляли с целью изучения посттрансплантационной регенерации губчатой костной ткани после пересадки различных видов костно-пластических материалов в искусственно созданный дефект. Эксперименты выполнены на 12 кроликах породы Шиншилла массой 2,0 – 2,5 кг в возрасте 1 – 1,5 года. Опытную группу составили 9 животных, контрольную – 3 здоровых, не оперированных кролика. Каждому кролику проводили 2 операции одновременно на обеих сторонах нижней челюсти. Всего выполнено 18 оперативных вмешательств (Табл. 2).

Методика операции на кроликах. Обезболивание осуществляли введением в вену уха 0,5% раствора гексинала до достижения наркоза. В областях операции удаляли волосяной покров. Операционное поле обрабатывали 3% раствором йода. Разрез кожи проводили длиной 2 -2,5 см параллельно нижнему краю челюсти. Ткани послойно рассекали. Лицевые артерии и вены смещали в сторону. Тупо отслаивали жевательную и внутреннюю крыловидную мышцу. Обнажали край и угол нижней челюсти. Создавали краевой дефект размером 0,3-0,5 см. в области угла нижней челюсти. Дефекты костей заполняли аллогенными лиофилизированными губчатыми трансплантатами. Рану обрабатывали раствором антисептика. Мягкие ткани послойно ушивали шёлком. Затем кожу обрабатывали йодом.

Таблица 2. Характеристика экспериментов на кроликах

--	--

Количество операций в области					
Угол нижней челюсти справа	Угол слева	нижней челюсти	Итого		
2 нед	3	3	3	6	
1 мес	3	3	3	6	
3 мес	3	3	3	6	
Контрольная группа		3			
Итого:		12	9	9	18

Методика изготовления аллогенной лиофилизированной губчатой костной ткани заключалась в следующем. После того, как животные были забиты, забирали костные фрагменты конечностей, очищали от мягких тканей. Затем костный материал обрабатывали с использованием низкочастотного ультразвука и химических веществ. Лиофилизацию тканей проводили в режиме сушки для губчатой костной ткани. Материал герметично упаковывали, после чего подвергали гамма стерилизации.

Вывод животных из эксперимента во всех сериях осуществлялся внутривенным введением 4-8 мл. 4% раствора тиопентала натрия через 2 недели, 1 и 3 месяца после операции. Всего у 12 кроликов проведено на нижней челюсти – 18 оперативных вмешательств.

Методы исследования

Исследования в экспериментальном разделе вели на органном, тканевом и клеточном уровнях. Из общеморфологических методов использовали визуальный осмотр тканей и органов, гистологические исследования костной ткани и органов иммуногенеза (региональных лимфатических узлов) с окраской микропрепаратов гематоксилином и эозином, характеризующие изменения в тканях. Для гистологического изучения выпиливали сегменты костей на месте операции и фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Затем проводили деминерализацию материала в трилоне Б в течение 1 месяца. После чего образцы материала подвергали обезвоживанию, обезжириванию. Кусочки промывали в проточной воде, проводили в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин и приготавливали срезы толщиной 7 мкм на санном микротоме. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Биолам.

Костные ткани окрашивали метиленовым синим в растворе буры. Кусочки спонгиозы фиксировали в 3,5% глутаровом альдегиде на какодилатном буфере РН -7,35. Затем после промывки буфером Миллонига РН- 7,35, проводили дофиксацию 1% раствором четырех окиси осмия на буфере Миллонига. После промывки буфером Миллонига материал обезвоживали и заключали в Эпон. Затем изготавливали полутонкие срезы и окрашивали метиленовым синим в растворе буры.

Лимфоидные органы и мягкие ткани фиксировали 10% нейтральным раствором формалина в течение 7 – 9 дней, после чего проводили в спиртах возрастающей крепости, заливали парафином. На санном микротоме изготавливали срезы толщиной 5 – 7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

Морфометрические методы исследования

В микропрепаратах паховых лимфатических узлов с помощью окуляр-микрометра МОВ – 1х 15 определяли размеры фолликулов и их реактивных центров в двух взаимно перпендикулярных направлениях. В каждом случае измеряли только структуры с чёткими контурами.

В препаратах регионарных лимфатических узлов квадратно-сетчатой вставкой Автандилова подсчитывали процентное содержание коркового вещества, мозгового вещества и паракортикальной зоны. Определяли удельный вес лимфоидных фолликулов с большими реактивными центрами и без них. Вычисляли коэффициент соотношения коркового вещества к мозговому веществу.

На гистологических срезах трансплантатов из губчатой костной ткани с помощью сетки Автандилова подсчитывали процентное содержание липидов.

Методика ультразвукового воздействия на трансплантаты

В работе использовали медицинские ультразвуковые установки УРСК-7Н-18 и «Pro-sonic», широко применяемые в хирургической практике для проведения оперативных вмешательств, а также для биологической очистки тканей (Деккер А.Ф., 1983, Кириллова В.П., 1986). При использовании установки УРСК-7Н-18 использовали диапазон частот 24,5-28,5 кГц. в непрерывном режиме средней интенсивности. Амплитуда колебания рабочей части волноводов не превышала 30-35 мкм. Для работы с исследуемым материалом также использовали ультразвуковую установку «Pro-sonic», рабочая частота которой составляет 40 кГц.

Микробиологические методы исследования трансплантатов

С целью выявления стерилизующего действия низкочастотного ультразвука на губчатую костную ткань, трансплантаты после ультразвуковой обработки помещали в 1% сахарный мясопептонный бульон, в среду Китта-Тароцци, на пластинчатый кровяной сахарный агар.

Для изучения антибактериального действия трансплантатов, насыщенных антибиотиками в условиях фонофореза, использовали косвенный метод. На плотные питательные среды с кровяным сахарным агаром, предварительно засеянные тест-микроорганизмами *Staphylococcus Aureus* ATCC-6538, укладывали кусочки костной ткани. Посевы инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 2 суток. По зонам задержки роста микрофлоры вокруг трансплантатов судили об антибактериальной активности препаратов.

Биохимические исследования

Для определения содержания липидов в губчатых костных трансплантатах был использован метод «горячего экстрагирования органическими растворителями». В качестве экстрагирующей жидкости использовали эфир. Для работы использовали вариант прибора на основе аппарата Сокслета. Вычисляли процентное содержание липидов в материале после процесса экстрагирования.

Для определения содержания воды в губчатых костных трансплантатах был использован метод «высушивания материала при подогреве и обычном атмосферном давлении». В исследованиях использовали электрический сушильный шкаф с рабочей температурой 100 – 105 °С. Процентное содержание воды в спонгиозе определяли после высушивания материала.

Клинические наблюдения

Изучены результаты хирургического лечения 57 больных с применением лиофилизированной губчатой костной ткани, полученной с применением низкочастотного ультразвука в клинике травматологии, ортопедии и экстремальной хирургии Самарского государственного медицинского университета и детском травматологическом отделении городской больницы № 1 им. Н.И. Пирогова г. Самары. Клинические наблюдения проведены у больных с заболеваниями опорно-двигательной системы нижних и верхних конечностей. Больные оперированы по поводу кист, кистозно-фиброзных дисплазий, доброкачественных новообразований и дефектов костей.

Наблюдения вели в раннем и позднем послеоперационных периодах. Отдалённые сроки составили 3-4 года. Анализировали клинические наблюдения за больными в возрасте от 7 до 67 лет, среди которых мужчины составили - 25, женщины - 32.

Были изучены истории болезни, операционные журналы, журналы забора тканей и выдачи трансплантатов, использовали физический метод исследования (рентгенография), позволяющий судить о посттрансплантационном регенераторном процессе в костной ткани.

Аллогенные губчатые костные ткани, полученные с применением низкочастотного ультразвука в отделении консервации тканей ЦНИЛ Самарского государственного медицинского университета, клиницисты используют в практическом здравоохранении с 1995 года у больных с патологией опорно-двигательного аппарата.

Все цифровые данные обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента при постоянно заданном уровне значимости ($P=0,95$).

Результаты исследования и их обсуждения

Использование низкочастотного ультразвука в процессе получения губчатых пористых костнопластических материалов.

Исследовали аллогенную губчатую костную ткань, полученную с использованием низкочастотного ультразвука надпороговых величин. Проведен анализ 270 образцов аллогенной спонгиозы с помощью морфологических, морфометрических и биохимических методов исследования.

На гистологических препаратах нативной губчатой костной ткани в межтрабекулярном пространстве определялось большое количество липидов, окрашенных суданом IV в ярко-оранжевый цвет. На полутонких срезах, окрашенных метиленовым синим в растворе буры, липиды выявляются в виде крупных черных капель, сливающихся между собой. Под воздействием низкочастотного ультразвука через 15 – 20 секунд происходит эмульгация липидов. После удаления элементов костного мозга проточной водой и органическими растворителями, следы липидов остаются только в лакунах на месте погибших остецитов. Межтрабекулярное пространство полностью освобождено от элементов костного мозга и жира. Морфометрический контроль показывает 1% содержание липидов в спонгиозе, полученной с помощью низкочастотного ультразвука, в материале, обработанном по обычной технологии, содержание липидов составляет 8%. Биохимические исследования подтверждают данные морфометрии. При обычной технологии получения аллогенных губчатых трансплантатов содержание липидов в них составляет 6,5%, включение в технологический процесс низкочастотного ультразвука снижает содержание липидов до 1%. Новая технология позволила сократить расход химических реактивов из расчета на 100 см³ спонгиозы: по спиртам и эфиру с 250 мл. до 100 мл., по перекиси водорода с 2л. до 1л. Время технологического процесса получения аллогенной спонгиозы сокращено с 48 часов до 3-4 часов. По критерию Стьюдента при вероятности ($P=0,95$), различия достоверны.

Использование низкочастотного ультразвука в технологии производства губчатых костных трансплантатов обеспечивает полноценную очистку спонгиозы от липидов и элементов костного мозга; сокращает сроки заготовки губчатой костной ткани в 10 раз; снижает расход химических реактивов в 2-2,5 раза, что немаловажно в целях снижения себестоимости материала, а также с экологической точки зрения.

Губчатый костный материал исследован на стерильность после обработки низкочастотным ультразвуком в течение 1, 3 и 10 минут. Проводили посев образцов трансплантатов в жидкие и твердые питательные среды. В качестве питательных сред использовали: 1% сахарный мясопептонный бульон; среду Китта-Тароцци; пластинчатый кровяной сахарный агар; кровяной сахарный агар. Посевы инкубировали в термостате при температуре 37°C. Роста микроорганизмов ни в одном случае не отмечено. Приведённые результаты позволяют сделать заключение, что в исследованных кусочках костных трансплантатов ни аэробных, ни анаэробных микроорганизмов не выявлено. Таким образом, уже одномоментное ультразвуковое воздействие на губчатую костную ткань обеспечивает стерильность материала.

Была изучена реакция окружающих тканей и периферических органов иммуногенеза (региональных лимфатических узлов) на эктопическую трансплантацию аллогенной губчатой костной ткани, полученной по новой технологии. Ткани забирали через 7 суток после трансплантации спонгиозы.

При пересадке аллогенного костного материала, полученного с использованием низкочастотного ультразвука, на гистологических препаратах трансплантат выглядит бесклеточными фрагментами костных балок. Пространство между ними заполнено новообразованной соединительной тканью, которая составляет 68% от площади костного трансплантата. Она представлена большим количеством клеточных элементов: фибробластами, гистиоцитами. Имеются лишь единичные лимфоциты. Воспалительной реакции на пересаженный материал практически нет. Вокруг трансплантата наблюдается тонкий слой соединительно-тканной капсулы. Идет активный процесс лакунарного рассасывания трансплантата многоядерными гигантскими макрофагами.

Во второй серии экспериментов в качестве пересадочного материала использовали аллогенную спонгиозу, обработанную по обычной методике. При изучении гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, наблюдаются фрагменты не рассосавшейся костной ткани, представленные костными балками. Отмечаются единичные фибробласты. Присутствуют палочко-ядерные и сегменто-ядерные нейтрофилы. Костная ткань сохранена. Морфометрически соединительная ткань составляет 52 % от костного трансплантата. Вокруг пересаженного материала широкая соединительно-тканная капсула. Наблюдается выраженная диффузная лимфоцитарная реакция, которая свидетельствует о значительном иммунологическом ответе и подтверждает высокую антигенность чужеродного аллогенного костного мозга.

В третьей серии экспериментов была использована ксеногенная губчатая ткань (человека), обработанная низкочастотным ультразвуком. На гистологических препаратах наблюдаются крупные бесклеточные гомогенные фрагменты не рассосавшейся ксеноспонгиозы, по величине значительно превышающие костные балки крысы. Поры в пересаженном материале прорастают соединительной тканью, много фибробластов и гистиоцитов. Вокруг заполненных костных балок имеется отек и очаговая лимфоцитарная инфильтрация. Наблюдается небольшое количество лейкоцитов и макрофагов. Трансплантат рассасывается и заполняется соединительной тканью, которая составляет 62 % от площади костного трансплантата. При использовании ксеноспонгиозы, обработанной низкочастотным ультразвуком, наблюдается лимфоцитарная инфильтрация в виде очагов и в целом она выше, чем при аллотрансплантации материала, обработанного в аналогичном ультразвуковом режиме, но значительно ниже, чем при пересадке аллоспонгиозы, в технологии производства которой ультразвуковой фактор не был включен. Все это свидетельствует о тканевой видоспецифичности ксеногенного костно-пластического материала. *Эксперименты на животных при эктопической внутримышечной пересадке аллогенной спонгиозы, полученной с использованием низкочастотного ультразвука, убедительно показывают отсутствие специфической иммунологической реакции в области операции и быстрое рассасывание трансплантата, полученного по новой технологии.*

При изучении паховых лимфатических узлов крысы основное внимание было уделено состоянию лимфоидных узелков с большими реактивными центрами. При этом площадь герминативных центров в лимфоидном узелке составляет 50% и более. Подсчёт отношения лимфоидных узелков с активными центрами размножения к общему количеству лимфоидных узелков показал наибольший процент после трансплантации аллогенной спонгиозы без ультразвуковой обработки. Количество лимфоидных узелков с активными центрами размножения уменьшается с 65% при пересадке аллоспонгиозы, полученной по обычной технологии, до 8% после проведения ультразвуковой обработки аллогенной губчатой костной ткани. *Таким образом, использование низкочастотного ультразвука в процессе получения губчатых костных трансплантатов снижает антигенность материала в 8 раз, в отличие от ткани, обработанной по обычной технологии.*

Посттрансплантационный остеогенез губчатой костной ткани, полученной с использованием низкочастотного ультразвука, изучен в эксперименте на кроликах. Проведены эксперименты на 12 животных. В качестве контроля служили 3 здоровых неоперированных кролика. Искусственно созданные дефекты нижней челюсти (справа и слева) кролика заполняли пластическим материалом. Проведено 18 операций. Через 2 недели после операции гистологическое исследование нижней челюсти кролика в зоне хирургического вмешательства указывает на полиморфную картину. На микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином обнаруживаются участки пластинчатой костной ткани, которая образует участки компактной и губчатой формации, ограничивающие дно и боковые части дефекта. Область дефекта заполнена новообразованной соединительной тканью, с участками не рассосавшегося трансплантата и большими полями новообразованной ретикулофиброзной костной ткани регенерата, которая формируется со стороны материнского ложа. Через 1 месяц завершается процесс рассасывания костных балок трансплантата с формированием регенерата, представленного новообразованной соединительной и грубоволокнистой костной тканью. К концу 3 месяца происходит перестройка кости. Образованный регенерат имеет вид типичной губчатой ткани с лакунами, заполненными костным мозгом. Вновь образованные костные структуры идентичны ткани спонгиозы нижней челюсти здорового кролика.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при пластике дефекта губчатой кости аллотрансплантатом из лиофилизированной спонгиозы, в технологии заготовки которой использован низкочастотный ультразвук, происходит быстрое рассасывание трансплантата с одновременным заполнением

всего объема удаленного участка новобразованной органотипичной костной тканью. Установлено, что аллогенная спонгиоза, полученная с применением ультразвука, является эффективным материалом для пластики кости губчатой структуры. Аллогенный губчатый трансплантат создает оптимальные условия для репаративного морфогенеза в губчатой костной ткани реципиента после замещения костного дефекта. Происходит полное восстановление объема удаленного участка кости и сохранение её первоначальной структуры, формы и функции.

Одной из задач наших исследований явилась отработка режимов насыщения губчатой костной ткани антибиотиками с целью придания биопластическому материалу заданных антимикробных свойств. Для насыщения костных тканей антибиотиками с помощью низкочастотного ультразвука мы брали рефлин и гентамицин, относящиеся к антибиотикам широкого спектра действия, обладающие остеотропным действием, сохраняющие активность длительное время. Эти лекарственные препараты используют при заболеваниях костей, остеомиелите, послеоперационных инфекциях и пр.

В начале мы исследовали антибиотики на устойчивость к фонофорезу после 1, 3 и 10 минутной ультразвуковой обработки. Антибактериальную активность изучали косвенным методом, с помощью прямого посева дисков фильтровальной бумаги, смоченных в 1% растворах антибиотиков, на питательные среды с кровавым сахарным агаром, предварительно засеянные микроорганизмами. Был использован тест-микроорганизм *Staphylococcus Aureus* ATCC-6538. Диаметры зон задержки роста микрофлоры идентичны, как вокруг дисков смоченных в озвученном растворе антибиотика, так и в растворе необработанном ультразвуком.

Для насыщения аллогенной спонгиозы антибиотиками использовали 1, 3 и 10 минутный фонофорез. Нами было изучено 510 трансплантатов на антибактериальную активность. Для того, чтобы доказать, что лекарственный препарат вошел в структуры костной ткани, трансплантаты после фонофореза промывали в течение 15 минут в проточной воде. Аналогичным образом были промыты исследуемые образцы после обычного замачивания в 1% растворе антибиотика. Затем спонгиоза была изучена на антибактериальную активность косвенным методом, описанным выше. Вокруг не озвученного материала зоны задержки роста микрофлоры отсутствовали, вокруг трансплантатов, обработанных ультразвуком в течении первых двух суток зоны задержки роста микроорганизмов также отсутствовали, но появлялись с третьих суток. Цифровые данные торможения роста микроорганизмов вокруг трансплантатов свидетельствуют о длительном, в течение 60 суток и более, антимикробном действии препаратов. Другим важным моментом является волнообразное течение активности антибиотика, что связано с поэтапным выходом лекарственного вещества из костных структур губчатой ткани. Лиофилизированный губчатый костный материал, насыщенный антибиотиком в условиях фонофореза, был изучен *in vivo*. Насыщенные антибиотиком трансплантаты были подсажены крысам внутримышечно, спустя 1, 3 и 7 суток материал был извлечен и изучен на антибактериальную активность. В этом случае костные трансплантаты, насыщенные антибиотиком (гентамицином) в условиях фонофореза, сохраняют свою антимикробную активность в течение 1 недели. Таким образом: растворы антибиотиков рефлина и гентамицина устойчивы к низкочастотному ультразвуку; достаточно 1 минуты фонофореза для качественного и быстрого насыщения губчатой костной ткани лекарственными веществами (рефлин, гентамицин); благодаря ультразвуку антибиотики входят в структуры костных трансплантатов, и сохраняют свою антибактериальную активность не менее 1 недели после трансплантации губчатых костных трансплантатов.

Лиофилизированный костнопластический материал содержит 4-5% воды. В процессе предоперационной подготовки существует необходимость доведения процентного содержания влаги в лиофилизированной костной ткани до исходного уровня, который до момента сушки материала составлял 35%. Однако обычная регидратация занимает много времени. Было изучено 160 трансплантатов на влажность. Лиофилизированную спонгиозу, представленную в виде крошки, регидратировали двумя способами. При первом материал помещали в физиологический раствор. Исследования проведены в динамике в течение 40 минут. Максимальная скорость регидратации наблюдалась в первые минуты. Через 3 минуты содержание воды составило 19%. Увеличение времени не отразилось существенным образом на степени насыщения ткани водой. Через 40 минут содержание воды составило 24%. Второй способ насыщения влагой заключался в воздействии на лиофилизированный материал, помещенный в физиологический раствор, низкочастотным ультразвуком в течение 1, 3 и 10 минут. Уже после одной минуты озвучивания содержание воды в спонгиозе составило 25%, а спустя 10 минут – 31%. Таким образом, максимальное насыщение лиофилизированной губчатой костной ткани водой происходит в первые минуты после помещения материала в жидкость. Низкочастотный ультразвук сокращает время регидратации лиофилизированного губчатого материала с 40 минут до 1 минуты и улучшает качество насыщения ткани водой.

Клинические аспекты применения лиофилизированных губчатых костных трансплантатов. Проведен анализ применения лиофилизированной спонгиозы, полученной с использованием низкочастотного ультразвука, у больных с патологией опорно-двигательной системы. За период с 1995 года в

Энхондрома	3	2	-	1	-	-	4	10
Дефекты костей	3	1	-	-	-	-	-	4
ИТОГО	19	16	9	3	4	1	5	57

Заполнение послеоперационных дефектов лиофилизированной губчатой костной крошкой, полученной с использованием низкочастотного ультразвука, как самостоятельно, так в сочетании с кортикальными трансплантатами или с брeфоматриксом, дает положительный результат при лечении фиброзно-кистозной дисплазии, кистах, доброкачественных новообразованиях, дефектах костей. После аллопластики отмечается быстрое замещение губчатых трансплантатов собственной костной тканью реципиента. Сразу после операции губчатые трансплантаты рентгеноконтрастны. Повторный рентгенологический контроль показывает постепенное замещение трансплантатов собственной костной тканью реципиента и восстановление структуры кости к 8-16 месяцу после операции. Рецидивов не было. Контрольные осмотры показали полное выздоровление пациентов. Функция конечностей сохранена. *Анализ клинических наблюдений применения аллогенной спонгиозы показал высокую эффективность данного пластического материала при проведении костной пластики больным с кистами, деструктивными и опухолевыми процессами.*

Выводы

Новая технология производства позволяет получать высокоэффективные аллогенные лиофилизированные костные препараты длительного хранения и насыщать их различными лекарственными веществами.

Применение низкочастотного ультразвука обеспечивает стерильность, полное удаление элементов костного мозга и липидов из спонгиозы, сокращает сроки заготовки кадаверных тканей, делает процесс производства экологически чистым и ускоряет регидратацию лиофилизированного костно-пластического материала.

Морфометрическая оценка структур органов периферического иммуногенеза лабораторных крыс показала низкую антигенность аллогенных и ксеногенных трансплантатов, изготовленных с применением низкочастотного ультразвука.

Антимикробная активность трансплантатов, насыщенных гентамицином и рефлином с помощью фонофореза сохраняется в течение 2 месяцев *in vitro* и 1 недели *in vivo*.

Применение аллоспонгиозы у больных травматолого-ортопедического профиля оптимизирует репаративный остеогенез, обеспечивает наиболее полное восстановление первоначальной формы и структуры поврежденных анатомических образований, предотвращает развитие гнойно-воспалительных осложнений. Материал безопасен и безвреден для реципиента.

В эксперименте на животных после пересадки пористого лиофилизированного аллотрансплантата происходит быстрое прорастание его собственной тканью реципиента, постепенное рассасывание с синхронным формированием регенерата из органотипичной пластинчатой ткани губчатой формации..

Аллогенные лиофилизированные губчатые препараты, изготовленные с использованием низкочастотного ультразвука, являются эффективным костно-пластическим материалом для заполнения послеоперационных дефектов у больных с фиброзно-кистозной дисплазией, доброкачественными новообразованиями и кистами костей. Их клиническое использование исключает дополнительные травмы больному.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Стерильность костнопластического материала во время процесса предоперационной подготовки аллогенной спонгиозы достигается использованием низкочастотного ультразвука в течение 1 минуты.

Регидратацию костно-пластического материала при подготовке лиофилизированной губчатой костной ткани к операции следует проводить с помощью одноминутного ультразвукового воздействия.

Материалы, обладающие бактериостатическим эффектом рекомендуется использовать при остеомиелите, для профилактики гнойно-воспалительных процессов при оперативных вмешательствах на костях, особенно при предшествующих травмах и операциях на костях в анамнезе.

Для придания губчатой костной ткани заданных антимикробных свойств необходимо использовать фонофорез 1% растворов остеотропных антибиотиков (рефлин, гентамицин) в течение одной минуты.

Список работ по теме диссертации

1. Использование низкочастотного ультразвука для насыщения трансплантатов лекарственными препаратами.// Самарский гос. мед. университет, Самара, 1999, 5с. -Рус. –Деп. В ВИНТИ 06.07.99, №2193-В99. (соавт. Волова Л.Т., Решетникова В.П.).

2. Использование стерилизующего эффекта низкочастотного ультразвука в процессе производства костных трансплантатов.// Самарский гос. мед. университет. –Самара, 1999, 4с. -Рус. –Деп. в ВИНТИ 06.07.99, №2194-В99. (соавт. Волова Л.Т., Решетникова В.П.).

3. Лиофилизированные аллоткани в реконструктивных операциях.// Тезисы докладов 34научно-практической конференции врачей Ульяновской области. «Вопросы теоретической и практической медицины», -У., 1999, -С.498-500. (соавт. Волова Л.Т., Уваровский Б.Б., Давыдов В.М.).

4. Современные средства и принципы реконструктивной хирургии.// Сборник тезисов докладов юбилейной научно-практической конференции «Самарскому государственному медицинскому университету – 80 лет», Самара, 1999, -С.58-59.(соавт. Волова Л.Т., Подковкин В.Г., Колсанов А.В.).

Изобретения

Способ удаления костного мозга из губчатых костных трансплантатов. Приоритетная справка № 99108699 то 05.05. 1999г. (соавт. Волова Л.Т.).

Способ стерилизации лиофилизированных костных трансплантатов. Приоритетная справка № 99105275 от 24. 03. 1999г. (соавт. Волова Л.Т., Уваровский Б.Б.).

Способ насыщения костных трансплантатов медикаментами. Приоритетная справка № 99103136 от 24. 02. 1999г. (соавт. Волова Л.Т., Уваровский Б.Б.).