

ВОЛОВА Лариса Теодоровна

**АЛЛОГЕННЫЕ ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННЫЕ КОСТНЫЕ
МАТРИКСЫ И РЕГУЛЯЦИЯ ОСТЕОГЕНЕЗА**

Специальность - 14.00.15 - патологическая анатомия.

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

МОСКВА-1997г.

НАУЧНЫЕ КОНСУЛЬТАНТЫ:

доктор медицинских наук, профессор Шляпников В.Н.;
лауреат Государственной Премии РФ, доктор медицинских наук,
профессор Котельников Г.П.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

д.м.н., профессор, Л.В. Кактурский
д.м.н., профессор, А.С. Григорян
д.м.н., профессор, НЛ. Демичев

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

Московский медицинский стоматологический институт им. КА. Семашко

Защита состоится "15 " декабря 3997г. в ___ час. на заседании диссертационного совета (Д 074. 05.05) при Московской Медицинской Академии им. И.М. Сеченова по адресу: 119881, г. Москва, Большая Пироговская, д. 2/6.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор В.А. Варшавский

АЛЛОГЕННЫЕ ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННЫЕ КОСТНЫЕ МАТРИКСЫ И РЕГУЛЯЦИЯ ОСТЕОГЕНЕЗА

Специальность -14.00.15 -

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Актуальность темы диссертации. Характерной чертой нашего времени является развитие восстановительной хирургии в различных областях медицины (Н.А.Плотников, 1993, А.Ф.Краснов, Г.П.Котельников, 1994, Э.Р.Мулдашев, 1994, Шумаков В.И.,1995). В травматологии, ортопедии, стоматологии, онкологии и гнойной хирургии изыскание способов борьбы с костной патологией предполагает не только средства её устранения, но и достижения первоначальной формы, структуры и функции разрушенных травмами и болезнями костей (А.А.Корж, 1972; А.С.Имамалиев, 1975; Г.И.Лаврищева, 1992; М.В.Волков, 1992; Р.А. Revell, 1893). Обеспечение полной регенерации костной ткани в области дефектных участков кости - одна из острейших проблем современной медицины. Решить ее можно, создав оптимальные условия для регенераторных процессов в зонах изъяна кости. Один из путей - использование костнопластических материалов (Н.П.Демичев, 1997; А.С.Григорян, 1993; Л.И.Костандян, 1995; Г.Г.Мингазов 1996; С.Д.Литвинов, 1996; J. Tidwell et al, 1992). Среди них способностью биодеградировать, инициировать регенераторные процессы в организме реципиента и замещаться его собственной органотипичной костной тканью, выделяется аллогенный деминерализованный костный матрикс (В.И.Савельев, 1990, Д.Д.Сумароков, 1989, П.Г.Сысолятин, 1993, M.R. Urist,1988).

Несмотря на определенные успехи, актуальная проблема рационального применения костно-пластических материалов ещё далека от окончательного решения. На основе изучения тенденций развития теории и практики применения ДКТ сформулированы цели и задачи исследования.

Цели исследования. Изучить в эксперименте влияние различных алло-генных деминерализованных костных материалов на остеогенез и определить их роль в регуляции регенераторных процессов. Создать новые виды матрикса, экспериментальные модели, операции и разработать теоретические основы эффективного применения результатов исследований в клинике.

Для этого необходимо решить следующие задачи:

1. Разработать экспериментальные модели изучения остеогенеза в губчатой и компактной формациях костной ткани у животных.
2. Рассмотреть теоретические аспекты получения деминерализованных трансплантатов из брешковостей и отработать технологический процесс их приготовления для клинического использования.

3. Сопоставить результаты регенерации в спонгиозе и компактном веществе костной ткани после пересадки животным различных видов аллогенных деминерализованных трансплантатов и сравнить их с аутопластикой и замещением дефекта только кровяным сгустком.
4. Изучить в эксперименте характер регенераторного процесса в плоских и трубчатых костях после трансплантации консервированного различными способами аштогенного брефоостеоматрикса.
5. Определить реакцию периферических органов иммуногенеза на аллогенные деминерализованные брефокости общеморфологическими, автордиографическими и морфометрическими методами у животных.
6. Исследовать антимик ровные свойства брефотрансплантатов, консервированных в слабых растворах формалина.
7. На основании полученных в эксперименте данных разработать и внедрить в клинику принцип индивидуального дифференцированного подбора аллогенных деминерализованных трансплантатов каждому конкретному больному.
8. Разработать новые реконструктивные операции с использованием деминерализованных трансплантатов в хирургической стоматологии, ортопедии и травматологии и офтальмологии и внедрить их в клиническую практику.
9. Создать компьютерную программу (базу данных), предназначенную для сбора, хранения и анализа клинических и экспериментальных результатов.

Научная новизна исследований и полученных результатов.

- 1) Впервые рассмотрены теоретические аспекты повышения эффективности применения аллогенного деминерализованного костного матрикса в реконструктивных операциях на костях.
- 2) Сформулирован принцип дифференцированного подбора деминерализованных трансплантатов для замещения изъянов костной ткани, основанный на учете особенностей анатомо-гистологического строения кости реципиента, ее биопотенций и пластических свойств трансплантата.
- 3) Предложена экспериментальная модель оценки биопластических свойств трансплантатов у животных, предусматривающая обязательное изучение посттрансплантационной регенерации в губчатом и компактном веществах костной ткани.
- 4) Создана новая разновидность деминерализованных костных трансплантатов - брефоостеоматрикс, обладающий хорошими биопластическими свойствами, низкой антигенностью и остеоиндуктивностью.
- 5) Исследованы особенности процессов деминерализации и консервации брефокостей и предложены в практику основы технологических процессов их получения и хранения.
- 6) Установлено, что для заполнения дефектов в губчатом компоненте кости лучшим является брефоостеоматрикс. Кроме того, он оказывает стимулирующее действие на дифференцировку клеток камбия надкостницы, способствуя быстрому созреванию костной мозоли.
- 7) Определен неодинаковый характер регенерации губчатой и компактной формаций костной ткани после пересадки аллогенного брефоостеоматрикса: в спонгиозе он обеспечивает репаративный остеогенез, завершающийся в кратчайший срок, в компактной - регенераторный процесс протекает по патологическому типу.
- 8) Впервые, на основе экспериментальных результатов, разработаны 4 новых способа операций с применением деминерализованных трансплантатов, защищенные авторскими свидетельствами (№ 1572536, № 1804795, № 1076647, № 200110).
- 9) В целях успешного регулирования процессами остеогенеза разработаны структура и программа для ПЭВМ по обработке клинических и экспериментальных данных.

Достоверность основных научных положений обеспечивается выбором строго обоснованных в медицине предпосылок, применением хорошо апробированных методов экспериментальных и клинических исследований; проведением обширных экспериментов и сопоставлением результатов с теоретическими положениями и данными клинических испытаний.

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

Показана принципиальная необходимость замещения послеоперационных дефектов кости пластическим материалом, так как в противном случае не обеспечивается генетически возможная полная регенерация костной ткани, нарушается морфогенез и образуются деформации. Использование новых и уже известных видов трансплантатов в сочетании с предложенными методиками регулирования послеоперационными процессами, позволило на 10-12%

сократить время лечения больных по сравнению с традиционными методами, а при переломе шейки бедренной кости повысить процент успешного выздоровления у пожилых людей на 44%. Автором совместно с практическими врачами разработан ряд новых видов реконструктивных операций в стоматологии, ортопедии и травматологии, обеспечивающие полную регенерацию поврежденных костных структур, органосохранность и восстановление функций поврежденного органа. Процесс приготовления деминерализованного матрикса из костей человеческих плодов делает его безопасным и безвредным, придает антимикробные и гемостатические свойства и позволяет сохранять его ценные биопластические качества длительное время.

Внедрение результатов. В практической работе отделения консервации тканей НИЦ СаГМУ, обеспечивающей биопластическим материалом лечебные учреждения Поволжского региона и другие города страны (лицензия № В 167373), используются технологии, разработанные автором. При проведении операций у больных с применением трансплантатов, используется принцип дифференцированного подбора, основанный на полученных в диссертации научных данных. Новые способы лечения переломов шейки бедра, гнойно-деструктивных и кистозных процессов в костях, пародонтита, кист челюстей, периодонтита, косметической коррекции при анофтальме, внедрены в практику взрослых и детских травматологических, гнойных, стоматологических отделений и поликлиник в Самаре, Тольятти, Бузулуке и других городах страны и подтверждены актами о внедрении.

Ряд положений диссертации включён в лекционный материал по патологической анатомии, гистологии, травматологии и ортопедии, хирургической стоматологии, ФУВ стоматологии и других кафедр СаГМУ, экспериментальные модели используются в других научно-исследовательских работах.

Основные положения, выносимые на защиту.

- 1) Посттрансплантационная регенерация костной ткани губчатой и компактной формации протекает неодинаково после трансплантации различных видов деминерализованных трансплантатов.
- 2) Брефоостеоматрикс - особая разновидность деминерализованной костной ткани, обладающей низкой антигенностью, выраженными остеоиндуктивными и хорошими биопластическими свойствами, близкими к аутооттрансплантатам.
- 3) При заполнении костного дефекта кровяным сгустком имеет место нарушение морфогенеза и деформация костей.
- 4) Оптимальным материалом для заполнения дефекта губчатого вещества костной ткани является матрикс из аллогенных костей плодов. Для компактного вещества - наилучшим остается деминерализованный костный трансплантат из диафизов трубчатых костей взрослых индивидуумов.
- 5) Брефоостеоматрикс является биостимулятором клеток камбия надкостницы и может использоваться в виде дополнительного материала при операциях на костях компактной структуры с целью быстрого создания прочной костной мозоли.
- 6) Принцип дифференцированного подбора деминерализованных трансплантатов в клинике обеспечивает полную регенерацию костной ткани и сохранение анатомической целостности органа.
- 7) Новые операции с применением аллогенных деминерализованных костных материалов - эффективное средство восстановительной хирургии, улучшающее качество лечения больных с костной патологией.

Апробация работы.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на заседаниях Самарского областного научного медицинского общества стоматологов (1989, 1992), Самарского отделения научно-практического общества травматологов и ортопедов РФ (1990, 1995), научно-практических конференциях и юбилейных сессиях СаГМУ, итоговых конференциях НИЦ (1985-1996), Самарских областных научно-практических конференциях рационализаторов и изобретателей (1986-1988), III съезде стоматологов Закавказья (Тбилиси, 1988), Межвузовской областной научной конференции "Методические проблемы современного научного знания" (Куйбышев, 1989), Областной конференции "Стресс и патология опорно-двигательного аппарата" (Харьков, 1989), на конференции ЦНИИС (Москва, 1989), Всесоюзной конференции трансплантологов (Тихвин, 1989), II съезде травматологов Молдовы (Кишинев, 1990), Всесоюзной конференции по пластике грудины (Москва, 1991); VI-ом съезде травматологов-ортопедов СНГ (Ярославль, 1993), Международной конференции по биомеханике (Любляна, Словения, 1996), VI-ом съезде травматологов-ортопедов России (Нижний-Новгород, 1997).

По материалам диссертации опубликовано 39 научных работ, из них 23 в центральной печати, получены 1 патент, 2 авторских свидетельства на изобретение и 1 на полезную модель (патент). Имеются 1 методические рекомендации, 12 удостоверений на рационализаторские предложения.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, указателя использованной литературы. Текст изложен на 357 страницах машинописи, иллюстрирован таблицами (12) и рисунками (97).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Здесь дана совокупность применявшихся методов исследования экспериментального материала, клинических наблюдений, лабораторного анализа.

Опыты на кроликах осуществлялись с целью изучения регенерации костной ткани в зоне созданного краевого дефекта при замещении его различными видами пластических материалов. Эксперименты поставлены на 61 кролике массой 2,0 - 2,5 кг. в возрасте 1-1,5 года (табл.1).

Таблица № 1. Характеристика экспериментов на кроликах.

№ серии опыта и суть эксперимента	КОЛИЧЕСТВО			
	Животных в опыте	Операции в области		
		угол нижней челюсти	диафиз лучевой кости	мышцы бедра
1. Кровяным сгустком	16	32	16	-
2.Аштогенным брeфоостеоматриксом	18	32	18	20
3.Ауто-трансплантатом	16	30	-	20
ИТОГО	54	94	34	40
Контрольная серия	7			

Методика операций в эксперименте на кроликах.

Обезболивание - 0,5% раствор гексинала. Разрез кожи - 4-5 см, параллельно нижнему краю челюсти. Лицевые артерии и вены смещались в сторону. Отслаивалась жевательная и внутренняя крыловидная мышцы. Создавался дефект костной ткани в области угла нижней челюсти. Мягкие ткани послойно ушивались кетгутом и лесой. На правой лапе обнажалась лучевая кость и выпиливался фрагмент диафиза кости. В области передней группы мышц бедра проводился разрез кожи (1,5 см). Мышца раздвигалась и помещался трансплантат. На кожу накладывали швы, обрабатывали йодом.

Методика изготовления аллогетой деминерализованной брeфокости.

Новорожденных крольчат забивали передозировкой эфира. Кости конечностей очищали от мягких тканей, промывали водой, помещали в 0,6% раствор HCl на 6-12 часов. Консервировали в 0,5% растворе формалина. Хранение при 2-4° С.

Опыты на собаках осуществлялись с целью проверки закономерностей, установленных в экспериментах на кроликах и изучения посттрансплантационной регенерации при использовании ДКТ из зрелой и незрелой костной ткани, консервированных различными методами. Эксперименты проведены на 35

собаках обоего пола массой 4-12 кг (табл. 2). Одновременно проводили 2-6 операций: на нижней челюсти, грудине и большеберцовой кости. Обязательное условие - проведение однотипных экспериментов на одном животном: 1) пластика матриксом из зрелой компактной костной ткани; 2) из ретикулофиброзной костной ткани плодов одной и той же особи. Создание дефекта без заполнения пластическим материалом проводилось на животных, которым уже замещали ДКТ удаленные участки кости в других анатомических образованиях.

Таблица 2. Характеристика экспериментов на собаках.

№ серии и суть эксперимента	КОЛИЧЕСТВО ОПЕРАЦИЙ НА КОСТЯХ			
	нижней челюсти	большеберцовых и бедренных	грудине	Всего
IV.Кровяным сгустком.	10	-	-	10
V. Формализированной аллогенной деминерализованной костной тканью.	12		8	20
VI. Формализированной аллогенной поверхностно-деминерализованной и костной тканью.			8	8
VII. Формализированным аллогенным деминерализованным брсфоматриксом.	12	20	8	40
VIII. Лиофилизированным аллогенным деминерализованным брсфоматриксом.		20		20
ИТОГО:	34	40	24	98
Контрольная серия	5 животных			

Методика операций на собаках.

Обезболивание (гексенал). Разрез 3-4 см по передней поверхности голени. В проксимальной метаэпифизарной части большеберцовой кости высверливали цилиндрический дефект 0,7 x 0,5 см.

На уровне второго сегмента грудины распиливали надкостницу, отслаивали от костной ткани, формировали желобообразный дефект 2х0,2см с сохранением задней стенки и надкостницы. Пилой Джигли выпиливали фрагмент кости по нижнему краю челюсти. Удаляли 8-й правый и 8-й левый зубы.

Методика получения деминерализованных костных трансплантатов.

Брефоостеоматрикс изготавливали из костей новорожденных щенят. ДКТ приготавливали из диафизов длинных трубчатых костей взрослых собак. Удалялись мягкие ткани с надкостницей и содержимое костно-мозгового канала. Деминерализация - в 0,6Н и 1,2Н растворах НС1 в холодильнике от 6 до 72 часов. После декальцинации материал промывали водой и консервировали в 0,5% р-ре формалина. Часть брефоматрикса лиофилизировали и стерилизовали у-лучами.

Опыты на крысах осуществлялись для изучения реакции периферических органов иммуногенеза. 10 крысам контрольной и опытной серии при пересадке брефоостеоматрикса проводили автордиографическое исследование.

Таблица 3. Характеристика экспериментов на крысах.

№ серии и суть эксперимента	Количество животных в опыте по изучению
эктопическая пересадка трансплантата в мышцу	реакции периферических органов иммуногенеза
IX Аллогенного деминерализованного брефоматрикса (АБОМ)	10
X Деминерализованной аллогенной зрелой костной ткани	10
XI Недеминерализованной брефо кости	10
XII Недеминерализованной аллогенной зрелой костной ткани	10
Норма	5
ИТОГО	45

Методика операций на крысах.

Операцию проводили под эфирным наркозом. Разрез кожи - 1,0 см, мышца раздвигалась зажимом, в межмышечное пространство помещался трансплантат. На кожу накладывали шов.

Исследования на всех видах животных велись на органном, тканевом и клеточном уровнях.

Применялись рентгенографические, общеморфологические, гистологические методы исследования костной ткани, селезенки, региональных лимфатических узлов. Материал фиксировали в 12% р-ре нейтрального формалина. Деминерализацию осуществляли в р-ре трилона Б. После проводки в

спиртах возрастающей крепости ткани заливали в парафин. Микропрепараты окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизон. Применены морфометрические и автордиографические исследования лимфо-идных органов. Автордиография выполнена с ^3H -тимидином.

Микробиологический анализ осуществлён для выявления антимикробного действия формализованного брeфоматрикса. Испытаны образцы брeфоостеоматрикса на стерильность, токсичность и пирогенность.

Все цифровые данные обработаны методами вариационной статистики .

В клинических исследованиях объектами являлись люди с патологией костной ткани. Анализировались истории болезни, операционные журналы и журналы забора тканей, выдачи трансплантатов, рентгенограммы. Совместно с врачами-хирургами разрабатывалась тактика операций и подбора трансплантационного материала каждому больному на основании данных предварительного обследования. Наблюдения велись в раннем и позднем послеоперационных периодах. Исследовались больные с патологией челюстно-лицевой области, опорно-двигательной системы, в офтальмологии - с анофтальмом. Результаты наблюдений объединены в банке данных (БД) для ПЭВМ. В состав БД входят: данные о больных; донорах, предусмотрены средства для поиска, выборки и распечатки информации. Проанализировано клинических наблюдений у 683 больных гнойно-хирургического, травматологического, ортопедического, стоматологического и офтальмологического профилей, в возрасте от 6 до 89 лет.

Глава 3. ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННЫЙ ОСТЕОГЕНЕЗ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА КРОЛИКАХ.

Поставлена задача изучить характер и возможности регуляции остеогенеза в губчатом и компактном компонентах костей при пересадке деминерализованных трансплантатов из незрелой аллогенной костной ткани плодов.

Объектом для изучения регенерации костной ткани компактной формации у кроликов послужила правая лучевая кость с заполнением и без заполнения удаленных фрагментов пластическим материалом.

Изучение регенерации компактной костной ткани под кровяным сгустком свидетельствует об активации пролиферативного процесса в надкостнице, приводящего к утолщению периоста. Со второй недели эксперимента формируются наплывы по краям дефекта, на 21 сутки обнаруживаются бугристые утолщения. Они слабо контурируются на рентгенограмме. Кость деформирована. Гистологически мозоль представлена хрящевой и небольшим количеством ре-тикулофиброзной костной ткани. Костные балки окрашиваются по ван Гизон интенсивно в розово-красный цвет, что указывает на достаточную коллагени-зацию структуры. В некоторых баночках по краям отмечается образование пластинчатых слоев. Ядра остеоцитов окрашиваются интенсивно.

Изучение результатов эксперимента на 30-е, 90-е сутки и после 6 и 9 месяцев показало, что при заполнении краевого дефекта в компактном веществе костной ткани только кровяным сгустком имеет место нарушение формообразования. Дефект восполнен новообразованной тканью лишь на 1/3 - 1/2, по его краям возникают остеофиты. Регенераторный процесс идет по патологическому пути и в конечном итоге приводит к серьезным деформациям кости.

Для изучения регенераторного процесса при трансплантации деминерализованного костного брeфоматрикса в компактную костную ткань помещали деминерализованный брeфоостеоматрикс, заготовленный из трубчатых костей крольчат. Трансплантат рентгенонегативен. Через неделю дефект несколько уменьшается за счет наплыва надкостницы. В полости находится трансплантат, слабо связанный рыхлыми соединительнотканными перемычками с окружающей костной тканью. При гистологическом исследовании трансплантат представлен неоднородной базофильной бесклеточной пористой массой, имбибированной клетками крови. На границе трансплантата и кости обнаруживались крупные многоядерные клетки - макрофаги и остеокласты, рассасывающие органическое вещество матрикса. В пограничной надкостнице отмечался процесс активизации пролиферации клеток камбионального слоя.

К 14 суткам эксперимента со стороны костного ложа, вдаваясь в поле соединительной ткани регенерата, формируются первые костные балочки, по краям которых обнаруживаются в один слой интенсивно окрашенные гематок-сином остеобласты. Через 3 недели утолщения периоста становятся больше. На рентгенограммах появляется тень наплывов. Периостальная мозоль имеет четкие контуры, выступает над поверхностью диафиза с обеих сторон дефекта. При гистологическом исследовании в тонком слое регенерата в области дна дефекта участки соединительной ткани чередуются с островками хрящевой

ткани.

К 21 суткам трансплантат полностью рассасывается и наблюдается активный процесс костеобразования.

Через месяц при осмотре на лучевой кости обнаруживаются беловато-сероватые плотно-эластические выпуклые образования, окаймляющие чашеобразное углубление. Дно его - мелкозернистого строения, шероховатое, красно-розового цвета, имеет вид "сахарной косточки". На рентгенограмме тень регенерата по краям более четкая. На гистотопограммах - неоднородность тканей регенерата. Большая часть хряща заместила грубоволокнистой костной тканью. Имеет место и перихондральное и энхондральное окостенение. Часть новых костных трабекул неоднородно окрашивается. Они имеют в центре участки пластинчатой кости с небольшим количеством остеоцитов. В области дна и по краям просматриваются *некрупные остеофиты, имеющие строение зрелой пластинчатой кости*. Через 3, 6 и 9 месяцев деформация кости сохраняется, отмечается наличие костных шипов.

Таким образом, при заполнении краевого дефекта компактной костной ткани деминерализованным брэфоматриком восстановления объема удалённого участка кости и её формы не происходит. В то же время брэфоостеоматрикс активизирует остеогенные клетки камбиального слоя надкостницы, способствует быстрой их дифференцировке, формированию и созреванию периостальной костной мозоли.

В основу изучения остеогенеза в костной ткани *губчатого строения* положены опыты по созданию костных полостей нижней челюсти у кроликов.

В опытах без пластики создавали краевой дефект 1.5x0.3 см в углу нижней челюсти с обеих сторон, который заполнялся кровяным сгустком. Со стороны боковых поверхностей полости и дна отмечается разрастание грануляционной ткани. Преостеобласты, выстилающие пограничные костномозговые полости, переходят в активное состояние и увеличиваются в размерах. Через 3 недели имеет место активный остеобластический процесс. Ретикулофиброзные трабекулы соединяются, образуя широкий слой на боковых поверхностях и области дна дефекта. В центральной части сохраняются участки хрящевой и волокнистой соединительной тканей. Через месяц на рентгенограммах отмечают изменения конфигурации угла нижней челюсти. Дно костной раны неровное, по краям дефекта - утолщения. Регенерат представлен грубоволокнистой соединительной и хрящевой тканями. В сроки 3 и 6 месяцев изменений нет. На рентгенограмме - частичное восстановление объёма костной ткани.

Установлено, что при заполнении дефектов в области угла нижней челюсти кровяным сгустком восстановления её анатомической формы не происходит. Характерно нарушение морфогенеза. Определяется деформация с уменьшением объема костной ткани на 1/3 в границах дефекта.

Для изучения регенераторного процесса в губчатой костной ткани после трансплантации деминерализованного брэфоостеоматрикса в углу нижней челюсти с обеих сторон создавали дефект 1.5 x 0.3 см и заполняли его деминерализованными костями новорожденных крольчат, консервированными в 0,5% растворе формалина.

К 3-й неделе на рентгенограммах тень регенерата становится более интенсивной и неравномерной. Макроскопическое исследование показывает, что костный дефект заполнен новообразованной тканью плотно-эластичной консистенции. Микроскопически - выраженный процесс костеобразования. Вокруг новых костных баночек наряду с остеобластами появляются остеокласты.

При наружном осмотре подчелюстной области через месяц изменений нет. На рентгенограмме имеет место неоднородная тень регенерата, по плотности почти идентичная интактной кости. Дефект полностью заполнен новообразованной костной тканью, периостальные наслоения отсутствуют. Гистологически регенерат представлен новообразованной грубоволокнистой костной тканью, в лакунах идет укладка ретикулярной ткани костного мозга. В конце 3 месяца рентгенологически костная патология отсутствует. В границах дефекта наблюдается полное восстановление структуры костной ткани нижней челюсти. От полугода до года изменений в подчелюстной области не выявлено.

Таким образом, при трансплантации деминерализованного костного брэфоматрикса в область угла нижней челюсти кролика рассасывание аллотрансплантата происходит в течение первых двух недель эксперимента и завершается к концу третьей недели. *Через 3 месяца наблюдается полное восстановление структуры костной ткани нижней челюсти.*

Для анализа эффективности аллогенного брэфоостеоматрикса проведено сравнение с аутопластикой дефекта аналогичной локализации ***той же кости***. В течение года после пластики производили наблюдения по замещению участка кости губчатой структуры фрагментом аутотрансплантата в

Через 2 недели макроскопическое исследование показывает, что трансплантат плотно спаян с окружающей костной тканью. Гистологически он имеет вид безклеточной оксифильно окрашенной однородной массы. Отмечается фрагментация и рассасывание остеокластами, прорастание фиб-робластов и гистиоцитов в ткань трансплантата. Между трансплантатом и костной тканью формируется прослойка рыхлой соединительной ткани с большим количеством клеточных элементов и тонкостенных сосудов. Происходит пролиферация клеток базального слоя периоста, прорастание их в трансплантат.

Через 3 месяца дефект не пальпируется. Рентгенологически определяется неоднородная тень регенерата. Гистологически он имеет гетероморфное строение. Со стороны материнской кости формируется грубопучковая костная ткань. Идет активный процесс костеобразования с выраженной остеобластической реакцией. Намечается перестройка новообразованной незрелой кости, появляются единичные остеокласты.

Через 6 месяцев на рентгенограмме определяется тень новообразованной костной ткани, по плотности приближающейся к окружающей кости. На гистологических препаратах регенерат целиком представлен созревающей костной тканью.

Через 9 месяцев эксперимента полностью восстанавливается нижний край челюсти. Дополнительных костных разрастаний не наблюдается. Отличить вновь сформированную костную ткань от окружающей костной ткани реципиента практически невозможно. Она имеет вид зрелой пластинчатой костной ткани с хорошо выраженными остеонами и гаверсовыми каналами.

Таким образом, при трансплантации бретоостеоматрикса в компактное вещество нижней челюсти собаки его рассасывание происходит быстрее, чем запуск и активизация регенерации в оперированной кости. После пластики дефекта деминерализованной аллогенной компактной костной тканью через 9 месяцев происходит в полном объеме восстановление утраченной структуры.

Исследование посттрансплантационной регенерации костной ткани губчатой структуры проведено во втором сегменте грудины, куда пересаживали ашюгенные деминерализованные трансплантаты из компактных костей взрослых животных, трансплантаты из неполностью деминерализованной аналогичной костной ткани и деминерализованные кости щенков.

В поднадкостничный желобообразный дефект плотно утрамбовывали трансплантаты. При макроскопическом исследовании через 2 недели форма передней стенки второго сегмента не изменена. На гистологических препаратах обнаруживается пористая бесклеточная гомогенная масса трансплантата, свободное пространство в котором заполнено лимфогистиоцитарными элементами. Между трансплантатом и костной тканью реципиента имеется слой незрелой соединительной ткани с большим количеством тонкостенных лакуно-образных сосудов. По краям, а также в зонах лакунарного рассасывания трансплантата обнаруживаются крупные многоядерные клетки - остеокласты. В области базального слоя надкостницы идет активный процесс пролиферации клеток. В волокнистом слое выявляются сосуды. Преостеобласты, выстилающие стенки ячеек пограничной кости, переходят в активное состояние, увеличиваются в размерах, становятся более темными с крупными ядрами. Формируются первые новые костные трабекулы. Спустя 1 месяц 2-й сегмент приобрел обычную форму. При микроскопическом исследовании парафиновых срезов на месте трансплантата обнаруживается незрелая соединительная ткань, представленная хаотично расположенными коллагеновыми волокнами с большим количеством гистиоцитов и фибропластов. Количество сосудов сокращается, вокруг сохранившихся формируются очаги новой костной ткани. Определяются интенсивно окрашенные участки волокнистых структур, имеющих трабекулярное строение. В области дна и боковых стенок костного дефекта обнаруживаются узурры с остеокластами в них. Наряду с очагом резорбции костной ткани идет активный процесс ее образования. Формируются костные балочки с большим количеством остеобластов по их периферии. Остеобласты имеют цилиндрическую форму, с крупными темными ядрами. Хрящевой ткани не обнаруживается. На гистологических препаратах регенерат представлен на всем протяжении незрелой костной тканью, имеющей петлистую картину. Трансплантат полностью рассосался. Широко идет процесс перестройки незрелой кости. По краям новых костных трабекул выявляются остеокласты. Пространство между трабекулами заполнено сетчатой ретикулярной тканью с расположенными в ней сосудами. На рентгенограмме - тень регенерата.

К 3-м месяцам при светооптическом исследовании микропрепаратов регенерат представлен новой костной тканью различной степени зрелости. Имеются поля грубоволокнистой костной ткани с участками перестройки в зрелую пластинчатую кость. Пластинчатая костная ткань формирует стенки лакун губчатой кости. В костных вместилищах, образованных созревающей костной тканью, обнаруживается новая миелоидная ткань. Надкостница над регенератом приобретает первоначальное строение. Определяется один слой вытянутых плоских клеток камбия периоста, над которым виден волокнистый слой.

Через полгода процесс перестройки кости после использования алло-генных деминерализованных бретокоостей завершается. Она имеет вид зрелой

костной ткани губчатой структуры.

В другой серии экспериментов проведена *пластика дефекта грудины трансплантатами из зрелой костной ткани компактной структуры.*

Через 2 недели при микроскопическом исследовании обнаруживается безклеточная оксифильная масса трансплантата с небольшими редко расположенными пустотами, заселенными клетками крови. Между трансплантатом и костным ложем реципиента имеется соединительнотканная спайка. По краям трансплантата в ней обнаруживаются макрофаги. Преостеобласты, выстилающие стенки лакун губчатой кости, переходят в активное состояние.

К концу 1 месяца большая часть трансплантата лизирована. Сформирован регенерат, представленный полями незрелой соединительной ткани, среди которых обнаруживаются островки хондроидных клеток в виде гипертрофированных хон-дроцитов. В соединительной ткани выявляются нерассосавшиеся фрагменты трансплантата, выявляются крупные, тонкостенные сосуды, вокруг которых формируются очаги будущего остеогенеза. Со стороны надкостницы в базальном слое отмечается пролиферация камбиальных клеток, их дифференцировка. Формируются новые костные балки. Большие ячейки заполнены красным костным мозгом, хотя кортикальная пластинка не сформирована.

К 3 месяцам с момента трансплантации деминерализованной ткани взрослых животных дефект полностью замещен новообразованной тканью, а спустя 9 месяцев - органотипичной губчатой костной тканью.

Изучение влияния степени деминерализации на остеогенез проведено на экспериментах с замещением дефекта грудины поверхностно деминерализованными алядгенными костных трансплантатов компактной структуры. Получали его известным методом, описанным выше, но с меньшим пребыванием в кислоте по сравнению с предыдущей серией (до 1 суток).

Через 2 недели при микроскопическом исследовании обнаруживался трансплантат в виде фрагмента компактного костного вещества с сохраненными пикнотичными остеоцитами в центральной части и с пустыми лакунами в периферической. Структура межклеточного вещества нечеткая, нарушены тинкториальные свойства ткани. Между трансплантатом и костным ложем определяется организующаяся гематома.

В конце 1 мес. появляется прослойка грануляционной ткани с большим количеством новообразованных сосудов между трансплантатом и материнской костью. На границе появляются крупно-ядерные макрофаги. Со стороны надкостницы отмечается деление и размножение клеток камбиального слоя. К началу 4-го месяца увеличивается количество новой незрелой соединительной ткани и уменьшается объем трансплантационной массы. В периосте идут процессы пролиферации и дифференцировки клеточных элементов. Появляются костные балочки.

Через полгода регенерат имеет гетероморфное строение. Большая часть его представлена незрелой костной тканью с проросшими в неё сосудами, вокруг которых формируются очаги остеогенеза. Рядом имеются поля новообразованной хрящевой ткани. Обнаруживаются достаточно крупные фрагменты нерассосавшегося трансплантата.

Через 9 месяцев формируется незрелая костная ткань.

Исследования по созданию поднадкостничного дефекта в губчатом веществе грудины, показали, что заполнение аллогенными деминерализованными костными трансплантатами ведет к полному восполнению объема удаленной части кости и сохранению её анатомической формы, но время завершения регенераторного процесса зависит как от степени зрелости трансплантируемой костной ткани, так и от степени деминерализации.

Целью следующего раздела исследования явилось изучение посттрансплантационной регенерации губчатой костной ткани длинных трубчатых костей задних конечностей собак после заполнения дефектов брeфоматриксом, консервируемым различными способами.

В первой части экспериментов 10 собакам в сформированные цилиндрические дефекты размерами от 0,5 до 0,7 см проксимальных метафизов обеих большеберцовых костей пересаживали консервированный в 0,5 % р-ре формалина аллогенный брeфоматрикс в виде костной щебенки. Во второй части 10 собакам - порошок деминерализованной костной ткани конечностей новорожденных щенят, консервированный лиофилизацией и стерилизованный гамма-облучением. Изучение регенерации губчатой костной ткани при трансплантации деминерализованной брeфокости, консервированной в формалине, показало, что через 2 недели при макроскопическом исследовании определялся округлый дефект в области проксимального метафиза, полностью заполненный аморфной массой трансплантата, пропитанного кровью. При гистологическом изучении отмечено, что содержимое дефекта представлено

бесклеточной пористой массой, свободные пространства в которой заполнены клетками крови. Между трансплантатом и неповрежденной костью имеется соединительнотканная спайка. По краю трансплантата и в зонах лакунарного и пазушного его рассасывания имеется большое количество макрофагов. Со стороны губчатой костной ткани стенок костного ложа формируются остеобластические почки. Отмечено формирование костных балочек с остеобластами по краям.

Через 30 суток дефект полностью заполнен новообразованной тканью, имеющей эластичную консистенцию и розовый цвет.

К концу шестого месяца эксперимента при осмотре задних конечностей собак видимых изменений нет.

Через 9 месяцев рентгенологическая и морфологическая картина аналогична предыдущему сроку. Обратного развития, рассасывания восстановленного участка костной ткани не происходит.

В данном разделе также рассмотрены вопросы, касающиеся *процессов регенерации губчатой костной ткани метаэпифизов большеберцовой кости собак при трансплантации деминерализованной аллогенной брeфокости консервированной методом лиофилизации.*

Через месяц при рентгенографии большеберцовых костей - округлый дефект с нечеткими контурами, без выраженной картины остеопороза вокруг. При макроскопическом исследовании - область дефекта заполнена эластичной тканью бледно-розового цвета, микроскопически представлена гетероморфным регенератом. Обнаруживается большое количество клеточных элементов соединительной и хрящевой тканей. Аморфные частицы трансплантата окружены макрофагами и клетками крови. Определяется большое количество проросших сосудов с очагами остеогенеза вокруг них. Со стороны костного ложа находим формирование костных балочек с рядами остеобластов по краям.

Через три месяца на контрольных рентгенограммах большеберцовых костей дефекты обнаруживаются с трудом. Признаков остеопороза и пери-остальных изменений не замечено. При микроскопическом исследовании регенерат представлен грубоволокнистой костной тканью с большим количеством проросших сосудов, вокруг которых идет активный процесс костеобразования. Новообразованные костные балочки окружены остеобластами и остеокластами. В межтрабекулярных пространствах идет закладка ретикулярной ткани.

Через 6 и 9 месяцев при контрольной рентгенографии видно, что имеет место полное восстановление структуры кости. На гистологических препаратах регенерат представлен зрелой губчатой костной тканью с лакунами, заполненными красным костным мозгом. Воссозданная костная ткань идентична окружающей губчатой структуре метаэпифизарной области большеберцовой кости.

Таким образом, заполнение краевого дефекта губчатого компонента брeфоостеоматриксом, консервированным 0,5% раствором формалина или методом лиофилизации обеспечивает в течение полугодия полное его заполнение органотипичной костной тканью.

С целью подтверждения того, что установленные выше закономерности остеогенеза являются достаточно общими, *были рассмотрены также вопросы развития посттрансплантационного морфогенеза альвеолярной части челюсти после удаления зуба.*

В нижней челюсти у собак ячеистое строение имеют стенки лунки зуба и альвеолярный отросток. Гистологически он представлен незрелой костной тканью, то есть во взрослом организме сохраняется и функционирует костная ткань с незавершенным остеогенезом. Губчатый компонент зрелой пластинчатой костной ткани сосредоточен в срединной центральной части тела os mandibula.

Задачей эксперимента являлось измерение толщины кости альвеолярной части нижней челюсти в области удаленного зуба. Опыты проведены на 10 собаках. Под наркозом им удаляли 2 нижних 4-х премоляра (8-е правые и левые зубы). В одной части экспериментов экстракционную рану справа заполняли формализированным брeфоостеоматриксом. В другой у 10 собак удаляли аналогичные зубы на нижней челюсти слева, но дефект не замещали пластическим материалом. В динамике в течение полугодия отливали модели из гипса (слепки) и проводили метрические исследования для установления величины атрофии костной ткани в области альвеолярного отростка нижней челюсти после удаления зуба. Морфологические и морфометрические исследования проводили через 15 суток, 1,3 и 6 месяцев.

При заполнении лунки кровяным сгустком через 15 суток происходит эпителизация раны.

Через 90 суток края гребня альвеолярного отростка нижней челюсти атрофированы, имеется воронкообразное углубление на месте удаленного зуба.

Через полгода виден атрофированный и деформированный гребень альвеолярного части нижней челюсти. Объем лунки зуба не полностью восполнен костной тканью. Кортикальные пластинки языковой и вестибулярной сторон альвеолярного гребня сближаются. Метрические исследования по гипсовым моделям показали, что у собак отмечается выраженная атрофия альвеолярного отростка в области удаленных зубов величиной $5,55 \pm 0,32$ мм ($p > 0,001$).

В серии, где экстракционную рану заполняли аллогенным брeфоостеоматриксом, консервированным в слабом растворе формалина, отторжения не наблюдалось. Через две недели при зондировании альвеолы отмечается подвижность трансплантата. При микроскопическом исследовании он представлен мелкопористой гомогенной массой. Обнаруживается много некротических макрофагов. Между брeфоматриксом и костью реципиента со стороны боковых поверхностей и дна лунки разрастается грануляционная ткань. Она представлена тонкими хаотично расположенными коллагеновыми волокнами, фибробластами, гистиоцитами и большим количеством тонкостенных сосудов. По границе происходит дифференцировка камбиальных остеогенных клеток костномозговых пространств в остеобласты. Начинается процесс костеобразования. Рентгенологическое исследование показывает практически полное заполнение лунки новой костной тканью, по плотности приближающейся к окружающей и отсутствие атрофии альвеолярного отростка в области удаленного 4 премоляра.

Через 6 месяцев при изучении микропрепаратов остатков пластического материала не обнаруживается. На его месте формируется зрелая губчатая костная ткань, заключенная между кортикальными пластинками компактной костной ткани. В центре сохраняются отдельные мелкие участки ретикулофиброзной кости. Изучение гипсовых моделей показывает равномерную и слабовыраженную атрофию альвеолярного отростка $3,1 \pm 0,13$ мм ($p > 0,001$).

Данные экспериментов на собаках подтверждают закономерность репаративных процессов, выявленных при исследованиях на кроликах, и вскрывают некоторые новые факты. Можно сделать выводы, что:

- а) после заполнения лунки деминерализованным брeфоматриксом на его месте формируется зрелая пластинчатая костная ткань губчатой структуры с миелоидным костным мозгом;
- б) при использовании аллогенных деминерализованных костнопластических материалов тип репаративного остеогенеза обусловлен степенью зрелости трансплантированной кости;
- в) оптимальным материалом для замещения дефекта компактной кости является деминерализованная зрелая пластинчатая компактная кость, которую получают из диафиза трубчатых костей взрослых индивидуумов;
- г) сроки формирования органотипичной губчатой костной ткани находятся в прямой зависимости от вида деминерализованного костного трансплантата, при этом брeфоостеоматрикс является оптимальным материалом для замещения дефекта кости губчатой структуры; д) при использовании зрелого костного матрикса формирование новой ткани тормозится из-за более медленной резорбции, что особенно заметно при использовании поверхностно деминерализованных трансплантатов, в центральной части которых сохраняется минеральный компонент.

Глава 5. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС ПОЛУЧЕНИЯ ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННЫХ КОСТНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ.

Аллогенные трансплантаты используются в лечении больных, если выполняются следующие условия:

- 1) они являются безопасными от передачи реципиенту какого-либо заболевания от донора;
- 2) не приносят вреда организму при трансплантации;
- 3) сохраняют биологические свойства длительное время.

В отделении консервации тканей НИЦ СаГМУ проводится изготовление ДКТ по утвержденной МЗ РФ технологии. Их получают из диафизов длинных трубчатых костей взрослых людей. С 1984 г. проводилась также отработка процесса получения матрикса из костей плодов человека. В стационаре выполняют серологические исследования на ВИЧ, гепатиты В и С, сифилис.

Технология получения брeфоостеоматрикса предполагает:

- а) проведение забора костной ткани от человеческих плодов;
- б) выбор оптимальной крепости НС1 для деминерализации;
- в) определение сроков деминерализации и температурного режима;
- г) обеспечение безопасности от передачи высоко-вирулентных вирусных инфекций;
- д) установление способов и режимов консервации и стерилизации.

С целью определения способа и режима деминерализации брeфокостей проведены химические исследования.

Для сравнения использованы губчатое и компактное вещества длинных трубчатых костей взрослых людей. Кости очищают от мягких тканей механическим путем, промывают водой, помещают в растворы, разрушающие клетки крови и обезжиривающие ткани. Эти растворы действуют и как дезинфицирующие среды при определенной величине концентрации и сроков экспозиции. Затем брeфокости опускают в 1,2Н или в 2,4Н раствор НС1, а фрагменты из диафизов длинных трубчатых костей взрослого человека в 1,2-3,6Н раствор НС1. О завершении деминерализации кости можно судить по физическому состоянию трансплантата: он становится чрезвычайно гибким, эластичным, легко прокалывается иглой, режется ножом. Более точно этот момент оценивается по количественной оценке экстрагированного кислотой минерального остатка. Используется метод титрования ионов кальция и фосфора и определение концентрации кальция с помощью пла-менного анализатора жидкости ПАЖ-2 методом пламенной фотометрии. Длительность деминерализации напрямую зависит от возраста донора, вида и типа костной ткани, степени минерализации и величины объекта, крепости НС1, соотношения объема деминерализующего вещества и веса костного образца, частоты смены растворов. Исследованы соотношения объемов кислоты и кости 1:3, 1:10, 1:50. Лучшим вариантом оказался последний, при котором процесс декальцинации идет быстрее в два раза. Смену раствора соляной кислоты проводили с разной частотой: ежедневно, раз в четыре дня, неравномерно. Скорость деминерализации была быстрее при ежедневной замене раствора. При замене раз в четыре дня сроки деминерализации увеличиваются в 3 раза и заканчиваются после 20 суток.

Полная декальцинация брeфокости соляной кислотой 1,2 - 2,4Н завершается в течение первых двух суток, и позволяет максимально сохранить биопластические свойства матрикса. Большая часть солей Са выходит в раствор к концу 1-х суток, на 2-е сутки определяются лишь незначительные остатки, а на третьи - полное их отсутствие. Декальцинацию проводят при $t=+4$ град.С в бытовом холодильнике. Фрагменты костей помещают в раствор и плотно закрывают флаконы. Выход ионов кальция в раствор НС1 для брeфокости имеет колебательный характер. Деминерализованная кость способна адсорбировать ионы кальция из деминерализата. После деминерализации трансплантат промывается в дистиллированной воде и, в зависимости от способа консервации, пот мещается либо в морозильную камеру, либо в слабый раствор формалина. Консервация в 0,5% растворе формалина с антибиотиком или без него осуществляется при $t=+4$ град. С. Это позволяет сохранить биологически активные компоненты в течение 6 месяцев и полностью обеззаразить его. Материал становится стерильным на 7 сутки с момента помещения его в раствор формалина в герметичной упаковке.

Метод лиофилизации позволяет увеличить сроки сохранности биопрепаратов до 5 лет и более. Важной особенностью является возможность хранения пластического материала при комнатной температуре. Брeфоостеоматрикс выпускается в виде костных фрагментов размером 0,5-0,7 см и в порошке. Материал не содержит химических консервантов. Хранение и транспортировка становится возможным благодаря низкому содержанию свободной воды (от 1 до 5%). Сублимация осуществляется замораживанием до $t= - 56$ град.С, а затем высушиванием в вакууме при $t=+ 38-40$ град. С не более 2 суток. Сухой материал раскладывают в химически чистые флаконы емкостью 10-50 мл, закрывают резиновой пробкой, герметично завальцовывают металлической пробкой и подвергают гамма-стерилизации.

Образцы брeфоостеоматриксeв испытаны на стерильность, токсичность и пирогенность.

Исследования проведены на базе НИИ эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи РАМ, кафедре микробиологии СаГМУ, Самарской городской дезостанции.

Испытание на пирогенность проведено на здоровых кроликах обоего пола (альбиносах) весом 3,3 - 3,5 кг. Разница температуры до и после введения экстрагируемого раствора не превысила допустимого предела (1,4 град.). Материал выдержал испытание на пирогенность.

При испытании на токсичность исследования проводилось на здоровых белых мышах массой 19-21г. После введения экстракта испытуемого препарата наблюдение вели в течение 48 часов, все животные остались живы. Препарат выдержал испытание на токсичность.

Трансплантируемый материал должен быть стерильным. Согласно требованиям Госфармакопии СССР 1990 года для контроля стерильности используется метод прямого посева испытуемого препарата на питательные среды. Для контроля стерильности применены твердая тиогликолевая среда, среда Сабуро, (ранее среда Титта-Тороцци). Продолжительность инкубации посевов 14 суток при $t = 30-35$ град.С в тиогликолевой среде, и при $t = 20-25$ град.С в среде Сабуро. Все 100 образцов деминерализованной брeфокости, консервируемой в течение 7 суток в 0,5% р-ре формалина при $t = +4$ град.С, оказались стерильными.

При оценке стерильности лиофилизированных образцов деминерализованной брeфокости, флаконы с которыми обрабатывались гамма-лучами, кроме вышеописанного контроля использовались тесты-индикаторы. Под действием ионизирующего излучения их цвет с желтого меняется на красный. Кроме того, бесцветные стеклянные флаконы после облучения гамма-лучами темнеют. Проведено 30 испытаний лиофилизированных образцов брeфоостеоматрикса. Весь материал оказался стерильным.

При консервации ДКТ в растворе формалина образуются прочные связи с радикалами белков матрикса. *Поэтому после отмывки от формалина трансплантат продолжает оказывать антимикробное действие.* Для проверки проделывались следующие процедуры: трансплантат отмывали трижды по 30 минут в стерильном физиологическом растворе. В остальных пробах отмывтый трансплантат оставался в физиологическом, растворе с ежедневной его заменой на новый стерильный раствор 0,9% NaCl. Экспозиция составила 3, 7, 14 и 21 сутки. Для проверки антибактериального действия использовался *косвенный метод*. В асептических условиях образцы одинаковые по форме и размерам переносились на чашки Петри с агар-агаром или плотной тиогликолевой средой, которые были засеяны микроорганизмами и инкубировались. Использовался тест-микроорганизм: Staphylococcus Aureus ATCC- 6S38. Инкубировали посевы в тиогликолевой среде при $t = 30-35$ град.С в течение 48 часов. Затем снимали показатели торможения роста микрофлоры вокруг образцов. Цифровые данные обрабатывались методом вариационной статистики. Данные свидетельствуют о длительном, в течение трех недель, антимикробном действии формализованного брeфоостеоматрикса. В течение всего срока пребывания в организме реципиента, до момента полного рассасывания, формали-зированный брeфоостеоматрикс выступает в роли антисептика пролонгированного действия. Такое свойство является особенно ценным при использовании у больных с гнойно-деструктивными заболеваниями, латентно текущей инфекции, остеомиелите. Неконсервированные в формалине деминерализованные стерильные брeфокостные трансплантаты не оказывают антимикробного действия.

В малых концентрациях формалин не опасен (В.Ф.Парфентьева 1965, 1990). Однако, ***чтобы полностью исключить негативное действие свободного формалина, проводится ультразвуковая отмывка*** помещенного в физраствор формализованного костного брeфотрансшгантата с помощью игольчатого волновода и низкочастотного генератора (рац. предложение № 279 от 06.05.1993 г.). Зона подавления роста микробов сохраняется, но она значительно меньше, чем при традиционном способе подготовки препарата к пересадке и соответствует трехнедельному сроку пребывания АБОМ в физрастворе.

Определение степени иммуногенности препаратов выполнено на крысах линии "Vistar". Изучали реакцию региональных лимфатических узлов и селезенки на трансплантацию ДКТ крысят. Структурные изменения лимфоидной ткани этих анатомических образований у чистолинейных животных в ответ на экзогенный антиген (трансплантат) являются абсолютно специфичными. Исследования проводили общеморфологическими, автордиографическими и морфометрическими методами на 7 и 14 сутки после операции. Все 45 животных были разделены на 4 группы по 10 в каждой. Контрольную группу составили 5 здоровых крыс. Каждой крысе с обеих сторон в переднюю группу мышц бедра вшивали один и тот же вид пластического материала (демнерализованные аллогенные трансплантаты из брeфокости, из трубчатых костей взрослых крыс, недеминерализованные аналогичные кости).

При изучении гистологических препаратов замечена характерная реакция лимфоидной ткани в виде появления фолликулов с большими реактивными центрами. Отношение площади реактивного центра фолликула к общей площади составляет больше 50%. Был проведен подсчет общего количества лимфоидных фолликулов, фолликулов с активными центрами размножения. При пересадке консервированной трубчатой кости был наивысший процент (75%) фолликулов с активными центрами размножения. В серии, где крысам трансплантировали в мышцу бедра формализованные кости новорожденных крысят, оценка составила 62%. Пересадка в мышцу деминерализованных трансплантатов резко снижает число фолликулов с активными центрами размножения (брeфоостеоматрикс - 4%, деминерализованная кость взрослого животного -12%). У неоперированных здоровых крыс соотношение составило 4%.

Сравнительная гистоавтордиографическая оценка активности пролиферативных процессов в бластных клетках лимфатических узлов и селезенки при использовании брeфоостеоматрикса и в контроле показала, что индекс меченных ^3H тимидином ядер в различных зонах существенно не отличался и не

имел статистически достоверной разницы. В краевой зоне в опыте индекс мечения составил $6,1 \pm 0,05 \%$, а в контроле $5,5 \pm 0,07 \%$. Соответственно в реактивных центрах в опыте $1Д \pm 0,02 \%$, в контроле $-1,7 \pm 0,03 \%$.

Характерная закономерность реакции лимфондной ткани органов периферического иммуногенеза на трансплантацию консервированной аллогенной костной ткани проявляется в увеличении числа фолликулов с активными центрами размножения, площадь которых превышает половину площади всего фолликула. По этим показателям можно косвенно судить об антигенности трансплантата.

Анализ результатов исследований, выполненных в данной главе, показал, что разработанный технологический процесс, основанный на дифференцированном подходе к производству аллотрансплантатов является весьма эффективным и безопасным.

Глава 6. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛЛОГЕННЫХ ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННЫХ КОСТНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ В КЛИНИКЕ.

Целью клинических исследований является разработка комплекса лечебных процедур лечения больных с повреждениями и заболеваниями костной системы, основанных на принципах дифференцируемого использования аллогенных деминерализованных костных трансплантатов и внедрения новых методов в хирургическую практику.

В основу разработанных нами операций положен принцип подбора костно-пластических материалов. Учитываются анато-мо-гистологические особенности строения поврежденного болезнями или травмами участка кости, его регенераторные потенции, степень зрелости костной ткани, из которой изготавливается трансплантат. Разработан комплекс лечебных мер, применяемых до операции, во время её осуществления, и в послеоперационном периоде. Эти меры направлены на максимальное устранение патологического состояния в кости как за счет хирургических приемов, так и за счет физиологических факторов и механических приспособлений. Комбинированные методы лечения способствуют устранению патологического изменения в кости, полному восстановлению её формы, структуры и функции.

С 1984 года в стационары и поликлиники выдано 3945 трансплантатов для проведения костно-пластических операций. Из них деминерализованный костный матрикс (ДКМ) составил 1856. Из диафизов трубчатых костей скоропостижно скончавшихся взрослых людей ДКМ изготовлено 1035 трансплантатов, из костей плодов человека - 821. В стоматологических, травматических, ортопедических, офтальмологических, оториноларингологических, косметологических, онкологических и гнойных отделениях лечебных учреждений Поволжского региона с применением трансплантатов, изготовленных под руководством автора, был оперирован 2481 больной. Хирургическому вмешательству подверглось 1346 женщин и 1135 мужчин. Всего наблюдалось 2067 взрослых людей и 414 детей. Возраст пациентов колебался от 6 до 84 лет. Комплексное лечение с применением аллогенных ДКТ проводилось у больных с остеобластокластомами, кистами и доброкачественными образованиями костей конечностей, кистозно-фиброзной дисплазией, переломами шейки бедра, остеомиелитом, парадонтитом, периодонтитом, одонтогенными кистами.

Автор непосредственно участвовала в разработке тактики и стратегии лечения, в подборе трансплантатов или набора разнообразных костнопластических препаратов, послеоперационного ведения больного, проводила консультации в раннем и позднем послеоперационных периодах. Для удобства хранения информации о больных, прооперированных с применением пластических материалов, сведения о донорах, способах получения и консервации трансплантатов создан банк данных для персональных ЭВМ.

При применении ДКТ в ортопедии и гнойной хирургии в процессе операций для каждого больного использовалось от 1 до 5 трансплантатов. Их количество зависело от размеров трансплантатов и объема удаленного участка кости. Использовалась консервированная костная ткань одного донора. В зависимости от характера патологического процесса и распространенности проведенного вмешательства, биохимических характеристик, структуры и регенераторных потенций оперированного участка кости нередко применялось несколько типов аллогенного костно-пластического материала. В случае опасности перелома кости после удаления большого её участка рационально сочетание жестких недеминерализованных трансплантатов в виде распорки или целого формализованного или лиофилизированного кортикального фрагмента, диофилизированной крошки или блоков спонгиозы с определенным видом деминерализованной костной ткани.

Проанализированы отдаленные результаты (от 2 до 10 лет) применения деминерализованных трансплантатов у 31 пациента в возрасте от 4 до 14 лет, лечившихся по поводу фиброзной остеодисплазии (8) и образованию костных кист (23). За 14 лет больным с патологией костной ткани конечностей, позвог

ночника, грудины, таза ДКТ применены в 486 случаях. В отделение консервации тканей НИЦ СаГМУ рекламаций на представленный в лечебные учреждения материал не поступало.

Прослежен исход хирургического вмешательства у 23 детей 4-14 лет с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей. После радикальных операций (поднадкостничной трепанации пораженной кости, секвестрэктомии, удаления гноя и грануляций, озвучивания полости через раствор остеотропных антибиотиков) дефект кости заполняли деминерализованными трансплантатами. В послеоперационном периоде проводилась антибактериальная, общеукрепляющая, иммуноотералия и физиолечение. Предотвращению рецидивов при остеомиелите способствует **использование низкочастотного ультразвука во время операции**. Через 6-8 месяцев на месте костной полости обнаруживалась бесструктурная провизорная костная ткань. Через год формировался костно-мозговой канал. Повторных операций не производилось.

Анализ клинических наблюдений показал, что проведение костной пластики больным с кистозными, гнойно-деструктивными, опухолевыми процессами позволяет сохранить анатомическую целостность поврежденной кости и восстановить её первоначальную структуру.

Клинические исследования проведены нами при **разработке и внедрению в клиническую практику нового способа хирургического лечения перелома шейки бедренной кости с применением аллогенного брeфоостеоматрикса**. В 1993 году, совместно с клиницистами-травматологами, предложен новый комбинированный способ лечения переломов шейки бедренной кости с использованием аллогенных деминерализованных трансплантатов из брeфокости для заполнения остающихся пустот между отломками. Брeфоматрикс выполняет роль матрицы для новообразующейся кости, заполняя плотно своей массой межотломковые пространства, и оказывает стимулирующее влияние на процессы регенерации. Может использоваться как формализированный, так и лиофилизированный брeфоостеоматрикс.

Новый комбинированный метод хирургического лечения перелома шейки бедренной кости с брeфоостеопластикой внедрен в работу ряда лечебных учреждений Самарской и других областей РФ. Метод применен у 59 больных.

Отдаленные результаты у оперированных нашим способом изучены у 52 человек. Оценка проводилась по трехбалльной системе. Положительные результаты (36,5% хороших и 46,2% удовлетворительных) в сумме составили 82,7%, отрицательные - 17,3%. Применение комбинированного метода лечения перелома шейки бедренной кости позволило увеличить число положительных результатов с 38 % до 82,7 %.

Эффективность использования ДКТ была также подтверждена клиническими исследованиями в области хирургического лечения распространенных в стоматологии заболеваний. К ним относятся околозубные кисты челюстей, пародонтит и хронический периодонтит.

Совместно с практическими врачами разработан и широко внедрён новый способ хирургического лечения среднетяжелого и тяжелого пародонтита, Он **основан на использовании деминерализованного костного матрикса (ДКМ) для сохранения зубов, предотвращения осложнений на длительное время, применении новой тактики хирургического лечения и пред- и послеоперационного ведения больных**. В качестве трансплантационного материала здесь используют две разновидности ДКТ. Выбор объясняется их биологическими свойствами. Деминерализованный матрикс из диафиза трубчатых костей взрослых людей применяют в виде полоски. Он обладает способностью восстанавливать костную ткань компактной формации. Можно использовать трансплантат из целой обессоленной брeфоокости, так как она стимулирует пролиферацию и дифференцировку камбия надкостницы и способствует быстрому образованию зрелой органотипичной компактной костной ткани. Дефекты в области межзубных перегородок заполняют размельченным брeфо-остеоматриksom, который обеспечивает быстрое и полноценное восстановление повреждённой губчатой костной структуры. Важным элементом в операциях является использование низкочастотного ультразвука в сочетании с антисептиками для обработки раны и разобщения области операции и полости рта с помощью нанесения биоклея.

С 1984 по 1996 годы прооперировано нашим способом 186 больных ге-нерализованной формой пародонтита, 15 - локализованной формой в возрасте от 19 до 55 лет. Из них мужчин было 82 (42,9%), женщин - 104 (57,1%). Всего выполнено 231 операция. Дважды, на верхней и нижней челюстях, остеогингивопластика проведена у 34 больных. Послеоперационные осложнения наблюдались у 4 больных (2,1 %). Анализ результатов хирургического лечения пародонтита свидетельствует о высокой эффективности предложенного комплексного метода с применением формализированных деминерализованных костных трансплантатов.

Для лечения кист челюстей был предложен, а затем внедрен в клинику разработанный нами способ с пластикой брeфоостеоматриксом.

Сущность метода заключается в проведении комбинированной алло- и аутопластики послеоперационного дефекта. Здесь применяют 2 вида костно-пластических материалов: аллогенную деминерализованную кость плода и собственную ткань реципиента. С 1988 по 1996 годы в лечебных стоматологических учреждениях Самарской области нашим методом цистэктомии с проведением брeфоостеопластики прооперировано 97 больных с кистами челюстей. Проведение пластики в сочетании с низкочастотным ультразвуком **позволило расширить показания к хирургическому лечению кист челюстей в тех случаях, где имел место острый воспалительный процесс с нагноением кисты.** Использовался брeфоостеоматрикс, консервированный в 0,5% растворе формалина с антибиотиком широкого спектра действия, а с 1994 года в лечебных учреждениях г.Самары и г. Бузулука стали проводиться цистэктомии с пластикой костных полостей лиофилизированным брeфоостеоматриксом. Одной из особенностей этих операций является их зубосохранность. У взрослых людей, даже с обширными кистами резекцию корней зубов проводят щадяще, удаляя лишь апикальную часть. Обычная тактика у детей, как правило, предполагает удаление кисты вместе с зубным зачатком. Наши исследования показали, что использование лиофилизированного брeфоостео-матрикса для пластики послеоперационного дефекта позволяет сохранить жизнеспособным зубной зачаток.

Результаты хирургического лечения больных с зубочелюстными кистами показывают, что комплексное применение формализированных и лиофилизированных деминерализованных костных брeфотрансплантатов имеет и в этом случае высокую эффективность.

Другим распространенным заболеванием в стоматологии является хронический периодонтит, сопровождающийся разрушением тканей периодонта с деструкцией альвеолярного отростка челюсти вокруг верхушки корня зуба

Проанализировано 123 амбулаторные карты хирургического лечения хронического периодонтита с брeфоостеопластикой и 40 - без пластики. Возраст больных от 14 до 62 лет. Операция с применением АБОМ проводилась по поводу хронического гранулирующего периодонтита у 62 пациентов; гранулем - у 30, кистогранулем - у 20, при обострении хронического периодонтита - у 8. Удаление многокорневых зубов, неподдающихся консервативному лечению фиброзном хроническом периодонтите, произведено у 13 человек с последующей пластикой брeфоостеоматриксом (рац. предложение № 269 от 26.10.92 года). Использовался как формализированный, так и лиофилизированный брeфоостеоматрикс. Резекция верхушки корня зуба при хроническом периодонтите с брeфоостеопластикой произведена у 95 человек. Аналогичные операции без костной пластики выполнены у 20 больных. Хирургическое вмешательство при гранулирующем периодонтите осуществлено у 55 пациентов, из них с пластикой деминерализованной брeфокостью остаточной полости - у 52. Удаление гранулемы с резекцией корня зуба сделано у 25 человек. При этом у 18 проведена операция с брeфоостеопластикой. По поводу кистогранулем прооперировано 27 человек, 17 из них с заполнением послеоперационной полости брeфоостеоматриксом. У 8 пациентов хирургическое лечение выполнено при обострении хронического периодонтита. Заполнение дефекта после резекции верхушки корня зуба и гранулемэктомией проводилось брeфокостью. Использовали брeфоостеоматрикс, консервированный в формалине у 27 человек, методом лиофилизации - у 68. Послеоперационный период у больных протекал без осложнений. Таким образом, брeфоостеоматрикс оказался средством, эффективным для обеспечения полноценного остеогенеза в области послеоперационного дефекта при различных стоматологических заболеваниях

Серьезной проблемой в офтальмологии остается косметическое протезирование при анофтальме.

При участии автора предложена и разработана новая операция по созданию подвижной опорной культи после удаления глазного яблока. Для формирования опорной культи используются цельные фрагменты ДКТ из брeфокости. В г.Самаре с 1993 по 1996 годы прооперировано 53 человека. Использование брeфоматрикса позволило моделировать имплантат по форме конъюнктивальной полости и избежать его обнажения и отторжения. Он хорошо вживлялся в конъюнктивальной полости, не уменьшался в размерах, иммунных конфликтов не наблюдалось. В послеоперационном периоде формируется подвижная и объемная культя. Суммарная подвижность протеза по четырем меридианам составляла в среднем 80%. Обнажения плотных тканей культи при длительных сроках наблюдения не происходило. Осложнений не отмечено. При рентгенологическом исследовании в сроки 1,5-2 года отмечается наличие эктопического остеогенеза на месте трансплантата. Таким образом, применение деминерализованного брeфоостеоматрикса для формирования опорной культи является также эффективным средством и в косметической реабилитации больных после удаления глазного яблока.

Результаты столь разнообразных клинических исследований, приведенные в данной главе, показывают на широкие возможности дифференцированного применения аллогенных деминерализованных костных трансплантатов. Это свидетельствует о единстве природы взаимодействия предлагаемых нами пластических материалов и различных частей организма. Поэтому можно с уверенностью говорить о необходимости расширения использования ал-

лотрансплантатов на другие виды хирургических операций.

ВЫВОДЫ

1. Сформулированы основные теоретические положения для регулирования процессами остеогенеза путем дифференцированного применения пластических деминерализованных аллогенных костных материалов по отношению к анатомо-гистологическим особенностям реципиента. Основой является оптимизация выбора типа трансплантата и методики его применения.
2. Теоретические положения подтверждены обширными экспериментальными и клиническими исследованиями. Осуществлена систематизация анатомо-гистологических особенностей строения костных структур, характера патологических процессов в кости реципиента, и их связи со свойствами трансплантата. Разработана база данных для ПЭВМ.
3. Предложены и отработаны новые экспериментальные модели и методики экспериментов на животных по изучению остеогенеза и оценке биопластических свойств трансплантата.
4. Впервые предложена и исследована в качестве пластического материала для клинического использования новая разновидность деминерализованных аллогенных костных трансплантатов - бретоостеоматрикс. Установлено, что бретоостеоматрикс является оптимальным материалом для пластики дефектов в губчатом веществе костей.
5. Разработана методика дифференцированного использования деминерализованных трансплантатов из зрелой и незрелой костной ткани как средства регулирования репаративного остеогенеза, обеспечивающая при комплексном хирургическом лечении наиболее полное восстановление первоначальной формы и гистологической структуры поврежденного анатомического образования.
6. Исследовано влияние различных методов обработки и технологии консервации трансплантатов на процессы регенерации в костях. Установлено, что предлагаемые способы обработки и хранения позволяют длительное время сохранять необходимые биопластические свойства и обеспечивают нетоксичность и безопасность от передачи инфекций.
7. Предложен и успешно осуществлен совместно с практическими врачами ряд новых типов операций с применением аллотрансплантатов в области травматологии, ортопедии, гнойной хирургии, стоматологии, офтальмологии, что позволяет рекомендовать использование такого рода пластических материалов при других видах хирургических вмешательств.
8. Разработаны и опубликованы практические рекомендации по изготовлению и применению аллогенных деминерализованных трансплантатов в клинике.
9. Использование новых и уже известных трансплантатов в сочетании с предложенными методиками позволило на 10-12% сократить время лечения больных по сравнению с традиционными способами. Процент выздоровления - 44%. Обеспечивается существенный экономический эффект и решение важной народнохозяйственной проблемы.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Волова Л.Т. Способ приготовления и свойства деминерализованного костного матрикса из костей плодов.// сб. Вопросы клинической и экспериментальной медицины/ Куйб. мед. ин-т. - Куйбышев, 1986 . - С. 76-79 . - Рус. - Деп. в ВИНТИ 12.09.86, №6646 - В86.
2. Кириллова В.П., Волова Л.Т. Регенерация околоврешечных тканей зуба при лечении хронического периодонтита низкочастотным ультразвуком.// сб. Новые техн. реш. в клинической практике/ Куйб. мед. ин-т. Куйб., 1987. С. 73-77. Рус. Деп. в ВНИИМИ 20.02.87, №1187-138766.
3. Архипов В. Д., Волова Л.Т. Реакция слизистой оболочки полости рта на циакрин С. 3 с. - Рус. - Деп. в ВИНТИ 10.12.87, №14634 - В87.

4. Волова Л.Т., Кривошеков Е.П., Григорьев С.Г., Крупышев И.А., Трунин Д.А. Заготовка и консервирование биологических тканей и их использование в практическом здравоохранении // Метод, рекомендации для хирургов, травматологов-ортопедов, нейрохирургов, стоматологов, оториноларингологов, трансплантологов. - Куйбышев, 1987. -18 с.

5. Волова Л.Т., Богатое А.И., Архипов В.Д. Остеогингиовластика деми-нерализованным костным трансплантатом. Сб. научных трудов "Получение и клиническое применение деминерализованных костных трансплантатов" ЛНИИ травматологии и ортопедии им. Вредена Р.Р. Ленинград. 1987. стр. 74-77.

6. Эпшген Л.С., Волова Л.Т., Кривошеков Е.П. Применение аллотранс-плантатов деминерализованной костной ткани в пластической хирургии анофтальмического синдрома. Сб. "Акт. вопросы клинической медицины." Куйб. мед. ин-т .Куйб., 1988. С. 53-56 . Рус. Деп. в ВНИИМИ.

7. Волова Л.Т., Углова М.В., Трунин Д.А., Богатое А.И. Деминерализованный костный брeфоматрикс в пластической хирургии челюстно-лицевой области // Материалы 2-го Съезда стоматологов Закавказья. - Тбилиси, 1988. -С. 246-248.

8. Волова Л.Т. Биологические свойства деминерализованного костного матрикса из костей плодов и возможности его практического применения.// сб. Морфогенез, реактивность, регенерация органов и тканей в норме и эксперименте/ Куйб. мед. ин-т . - Куйбышев, 1988 . - С. 51-54 . - Рус. - Деп. в ВНИИТИ 03.11.88, №7881-В88.

9. Волова Л.Т. Биологические свойства деминерализованных костей плода и особенности регенерации костной ткани реципиента при их трансплантации. М-лы. обл. конференции ВОИР. Куйб.,1988.с. 22-24.

10. Волова Л.Т. Консервированные ткани плода в лечении хирургических больных.//Науч.-техн. прогресс и медицина.Куйб.,1988, с. 128-129.

11. Волова Л.Т. Биологические свойства деминерализованных костей плода и особенности регенерации костной ткани реципиента при их трансплантации. Сб."Использование микропроцессорной техники в здравоохранении". Тез. докл. Куйбышевской областной межотраслевой научно-практич. конференции мед. работников, Куйб.,1988, с.160-163.

12. Волова Л.Т. Клинико-экспериментальное обоснование применения различных видов костного матрикса в восстановительной хирургии // Куйбышевскому медицинскому институту имени Д.И.Ульянова - 70. Тезисы докл. юбилейной научной сессии. Куйбышев, 1989, с.43-44.

13. Волова Л.Т., Литвинов С.Д. Применение костного матрикса из костей взрослых и плодов человека при патологии опорно-двигательного аппарата. Материалы конференции "Стресс и патология опорно-двигательного аппарата". Харьков. 1989. с. 10.

14. Волова Л.Т., Трунин Д.А. Новый способ изготовления деминерализованного костного матрикса. Сборник - Новые техн. решения в стоматологии. Тезисы докладов Куйбышевской областной научно-практической конференции медицинских работников. - 1990. - с. 31-32.

15. Трунин Д.А., Волова Л.Т. Лечение одонтогенных кист челюстей с помощью деминерализованной брeфокости аллогенного происхождения. Сб. научных трудов "Трансплантация деминерализованной костной ткани при патологии опорно-двигательной системы." ЛНИИ травматологии и ортопедии им. Вредена Р.Р. Ленинград. 1990. стр. 101-102.

16. Волова Л.Т., Кудрявцев Д.А. Особенности восстановления дефекта лонных костей при различных способах аутопластики. Сб." Некоторые вопросы теоретической медицины". Куйбышев. Деп. в ВНИИТИ. 1990.

17. Волова Л.Т. Методологические аспекты изучения костнопластических материалов. Тез. докл. межвузовской научной конференции. Куйбышев 1990 г. стр. 120-121.

18. Волова Л.Т., Самошкин А.А. Сравнительная характеристика различных вариантов аллопластики грудины. Материалы Всесоюзной конференции по пластике грудины. М. 1990 г. с. 241.

19. Котельников Г.П., Волова Л.Т. Внесуставная пластика связок коленного сустава формализированными трансплантатами. Мат-лы 3-го съезда ортопедов-травматологов р. Молдова, Кишинев. 1991 г. 132-133.

20. Котельников Г.П., Нагога А.Г., Волова Л.Т. Брефоостеоматрикс в лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата // Материалы 6 съезда травматологов-ортопедов СНГ. - Ярославль, 1993. - С. 185.

21. Котельников Г.П., Нагога А.Г., Волова Л.Т. Комбинированный способ оперативного лечения переломов шейки бедренной кости с применением брефоостеоматрикса // указатель деп. рукописей по медицине и здравоохранению. (№ Д-23285) М. 1993.

22. Самсонов В.Е., Волова Л.Т. Использование деминерализованного костного брэфоматрикса при пластике различных послеоперационных дефектов челюстей. // Стоматология, том 73, 1993 г., стр. 35-37.

23. Самсонов В.Е., Волова Л.Т., Васильев М.В. Применение деминерализованного костного брэфоматрикса при лечении околокорневых кист и кистогранулем челюстей в амбулаторных условиях. // Казанский мед. журнал № 4. 1993 г., стр. 294-295.

24. Богатов А.И., Волова Л.Т., Самсонов В.Е. Органосохранные костнопластические операции в лечении хронического периодонтита. Материалы конференции стоматологов " Организация и профилактика в стоматологии". Екатеринбург. УГМИ. 1993. стр. 101-103.

25. Богатов А.И., Волова Л.Т., Гриненко Н.М. Остеогингивопластика в комплексном лечении пародонтита и профилактике одонтогенного верхнечелюстного синусита в условиях поликлиники. Стоматология. №2. 1994, с. 38-40.

26. Котельников Г.П., Нагога А.Г., Волова Л.Т. Опыт использования де-минерализованных костных трансплантатов при оперативном лечении переломов шейки бедренной кости у больных пожилого и старческого возраста // Материалы первого пленума ассоциации травматологов и ортопедов Российской Федерации. Самара, 1994. - С. 185-189.

27. Самсонов В.Е., Волова Л.Т. Использование низкочастотного ультразвука для подготовки костных брэфотрансплантатов перед пластикой челюсти. Материалы научно-практической конференции "Актуальные вопросы хирургии и травматологии". Тольятти. 1995 г. стр. 188-191.

28. Котельников Г.П., Безруков А.Е., Волова Л.Т., Нагога А.Г. Использование деминерализованных костных брэфотрансплантатов при оперативном лечении переломов шейки бедренной кости у больных пожилого и старческого возраста // Анналы травматологии и ортопедии. 1995. № 2. - С. 48-52.

29. Самсонов В.Е., Волова Л.Т. Брефоостеопластика альвеолярного отростка челюсти после удаления зубов. Тезисы докладов. "Актуальные вопросы современной стоматологии", Самара, 1995, с. 89-91.

30. Волова Л.Т., Киселёва Т.А., Кириченко Е.В., Рябова Г.М. Лиофилизированный брефоостеоматрикс в лечении околокорневых кист и хронических периодонтитов. Тез. докл. "Актуальные вопросы современной стоматологии", Самара, 1995, с. 45-46.

31. Волова Л.Т. - Банк данных костных трансплантатов // Тезисы. Международная конференция "Математика, компьютерное образование". Дубна, 29 января- 3 февраля 1996 г. - М., 1996, с. 30

32. Барская М.А., Волова Л.Т., Кузьмин А.И., Муниин А.Г. Хирургическое лечение хронического остеомиелита длинных трубчатых костей у детей с применением деминерализованных костных трансплантатов // Мат-лы юб. конф., посв. 100-летию со д. рожд. основоположника отечественной школы детских хирургов С.Д. Терновского, МД996, 13-14.

33. Volova L. Experimental substantiation of application demineralized bones of fetus in clinic. // Proceedings, 9 International Conference, Ljubliana, Slovenia, 1996, p.272-275.

34. Волова Л.Т., Милудин Е.С. Применение брефоостеоматрикса для создания опорной культи при энуклеации. Брошевные Чтения. Тез. докл.

35.Нагога А.Г., Котельников ГЛ., Волом Л.Т. Новое в реабилитации больных с переломами шейки бедра // Тезисы докладов VI съезда травматологов России, Нижний Новгород, 1997, с. 431.

Авторские свидетельства и патенты

1. Волова Л.Т., Архипов В.Д., Богатое А.И. Способ хирургического лечения пародонтита. Авт. свидетельство СССР № 15725-36.1990.

2. Волова Л.Т., ТрунинД.А., Левченко А.Р. Способ лечения кист челюстей. Авт. свидет. СССР. (Госпатент СССР).№ 1804795. 1993 г.

3. Котельников Г.П., Волова Л.Т., Нагога А.Г. "Способ остеосинтеза шейки бедренной кости и устройство для его осуществления ". Патент РФ № 1076647 от 10 апреля 1997г.

4. Милюдин КС., Волова Л.Т., Золотарёва А.И. "Погружной имтантат для формирования опорной культи после удаления глаза", удостоверение на полезную модель № 200110 от 27 февраля 1995 г.