

ISSN 2305-218X

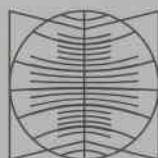
ОНКОЛОГИЯ

Журнал
имени П.А. Герцена



6'2013

Научно-практический журнал



МедиаСфера

Материал и методы

В настоящей работе все образцы кальций-фосфатных керамических материалов были получены из Федерального государственного учреждения наук института металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук.

Эксперименты *in vitro* проведены на основе ГА, КГА, Si-ГА, ТКФ и ГА/ТКФ-порошков, синтезированных методом осаждения из растворов и гетерофазным способом.

По оценке острой цитотоксичности данных материалов и динамики нарастания на них клеток эксперименты *in vitro* выполнены на модели клеточной линии иммортализованных нормальных фибробластов человека (ФЧ).

Жизнеспособность ФЧ в динамике экспериментов оценивали с помощью МТТ-метода (Т. Mossman, 1986 г.), который основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромистый (МТТ, «Sigma», США) в голубые кристаллы формазана, нерастворимые в воде.

При оценке острой цитотоксичности образцов кальций-фосфатной керамики, полученной методом гетерофазного взаимодействия, было показано, что через 24 ч культивирования ФЧ с данными образцами кальций-фосфатной керамики к их поверхности прикреплялось и оставалось жизнеспособными до 40,0% от инициального пула высеянных клеток и были расценены как токсичные.

При оценке острой цитотоксичности образцов биокерамики, синтезированной методом осаждения из водных растворов было показано, что все образцы данной лабораторной партии биокерамики не обладают острой цитотоксичностью в отношении культуры ФЧ. Так, через 24 ч их культивирования на этих материалах величина пула жизнеспособных клеток находилась в пределах 70–89% от контроля.

Для дальнейших исследований *in vivo* биосовместимости и способности замещать костные дефекты у экспериментальных животных были отобраны: ГА, β-ТКФ, бифазный материал ГА-β-ТКФ (80/20), КГА, Si-ГА — материалы с наиболее выраженными матриксными свойствами.

Для исследования биосовместимости образцов кальций-фосфатных керамических материалов в экспериментах *in vivo* использовали модель подкожной имплантации мышам-самкам линии BDF₁.

Установлено, что все отобранные биокерамические материалы не вызывали в месте имплантации реакции воспаления, макро- и микропризнаков отторжения, что свидетельствует об их биосовместимости.

Уже через 1 нед после операции конгломерат из гранул ГА оказался окруженным тонкой соединительнотканной капсулой, связанной с подлежащими соединительнотканными слоями. Через 14 дней после имплантации видна активная неоваскуляризация имплантата с формированием обширной капиллярной сети снаружи и внутри образца ГА. Через 3–4 нед на поверхности имплантата визуализировались кровеносные сосуды, которые прилегли к гранулам и ветвились на капилляры.

При микроскопическом исследовании препаратов, полученных от животных с подкожной имплантацией образца ГА-β-ТКФ, уже через 2 нед после операции каждая гранула была окружена правильно организованной зрелой соединительной тканью, отмечена неоваскуляриза-

ция в зоне имплантата. Через 1 мес после имплантации наблюдается нарастание соединительнотканной капсулы вокруг конгломерата гранул ГА-β-ТКФ и появление пустот и «пояска» между гранулами и окружающей соединительной тканью, что косвенно свидетельствует об их биорезорбции.

По скорости резорбции при подкожной имплантации исследованные материалы можно выстроить в следующий ряд: Si-ГА < ГА < ГА-β-ТКФ (80/20) < β-ТКФ < КГА.

Для оценки остеозамещающих потенций кальций-фосфатных керамических материалов крысам-самцам линии Вистар формировали плоскостной «окончатый» костный дефект (краевая резекция большеберцовой кости) длиной 6–8 мм, шириной 1,5–2,0 мм и глубиной 2,5–3,0 мм до нижнего кортикального слоя. В область дефекта закладывали стерильные биокерамические материалы, далее операционную рану послойно ушивали.

Для морфологического исследования животных выводили из эксперимента в сроки 3, 6, 9, 14 нед. Костный фрагмент, включающий зону дефекта, фиксировали и декальцинировали по описанной выше методике и изготавливали гистологические срезы. В 1-й (контрольной) группе животных на протяжении 6 нед после операции рентгенологически положительной динамики не обнаружено, к 9-й неделе наблюдали начало спонтанного закрытия дефекта кости. К 14-й неделе подтверждена полная консолидация костной ткани и начало формирования кортикального слоя на всем протяжении дефекта (рис. 1, а).

В группе экспериментальных животных, где дефект был заполнен гранулами ГА, по рентгенограммам частичное восстановление кортикального слоя наблюдали через 9 нед после операции, а через 14 нед — полное восстановление кортикального слоя на всем протяжении дефекта и восстановление костной структуры (см. рис. 1, б).

На гистологических препаратах в сроки 3 нед в данной группе животных наблюдали разрежение структуры гранул ГА и заполнение зоны дефекта незрелой костной тканью. Между гранулами выявлялись очаги гемопоэза. Через 6 нед очаги оссификации были обнаружены по периферии гранул ГА. К 9-й неделе наблюдения появление очагов оссификации выявлено и внутри гранул. Сходные результаты были получены и для других кальций-фосфатных керамических материалов. Различия касались их скорости биорезорбции и, соответственно, скорости остеогенеза в зоне имплантации. Наибольшая скорость остеорепарации была установлена для КГА и β-ТКФ (рис. 2, на цв. вклейке).

По скорости резорбции (как в подкожном тесте, так и при заполнении костного дефекта) эти материалы можно расположить в следующий ряд: Si-ГА < ГА < ГА-β-ТКФ (80/40) < β-ТКФ < КГА.

Таким образом, все испытанные *in vivo* пористые гранулированные кальций-фосфатные биокерамические материалы оказались биосовместимыми и биоактивными в замещении костного дефекта трубчатых костей лабораторных животных. Наблюдаемая биорезорбция этих материалов и их остеоинтеграция свидетельствует о том, что они перспективны для испытания в качестве имплантатов для замещения костных дефектов при реконструктивно-пластическом замещении костных дефектов у больных.

На этапе выполнения клинического исследования проведено лечение 23 пациентов со злокачественными опухолями органов головы и шеи, с применением метода

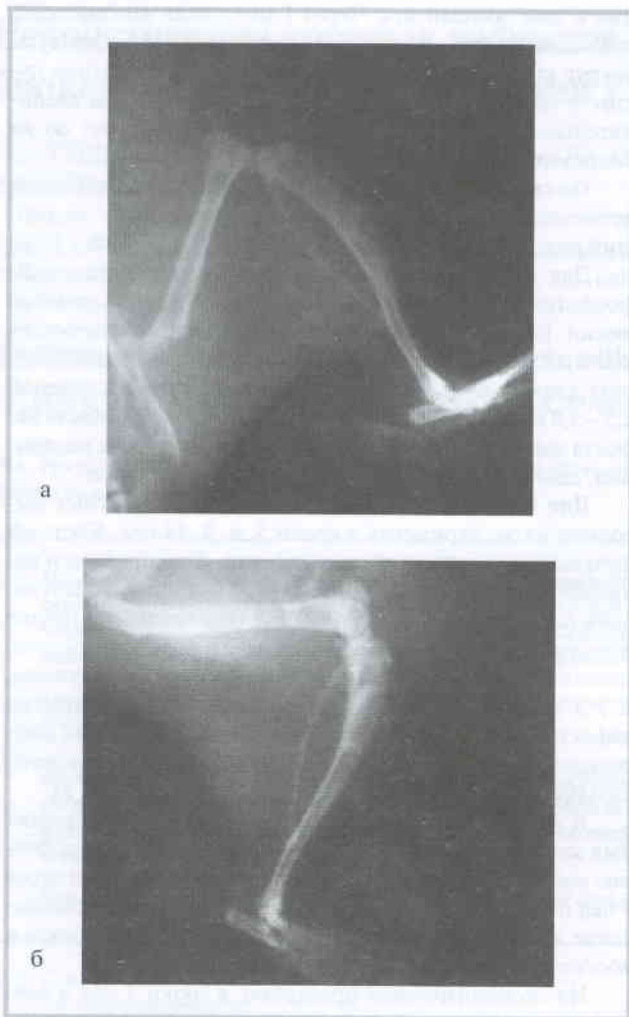


Рис. 1. Динамика спонтанного восстановления костного дефекта у крысы (контроль, группа 1) через 9 нед (а); динамика восстановления костного дефекта при его заполнении гранулами ГА через 9 нед (б).

замещения костных дефектов гранулами кальций-фосфатной биокерамики.

Опухоли верхней челюсти диагностированы у 8,7% больных, полости рта — у 17,4% и мягких тканей лица у — 17,4% пациентов. Из них 56,5% были мужчины, в 43,5% — женщины. Возраст оперированных пациентов колебался от 19 до 72 лет. В 100% наблюдений оперированы больные трудоспособного возраста.

Морфологическая структура опухолей была различной. По поводу эпителиальных опухолей оперировано 52,2% пациентов. В большинстве наблюдений у 26,1% больных выявлен плоскоклеточный рак различной степени дифференцировки и локализации.

Проведено лечение 9 (39,1%) пациентов с доброкачественными опухолями с выраженным местно-деструкующим ростом и склонностью к рецидивированию: амелобластома (5), фиброзная дисплазия (3), ангиофиброма носоглотки (1).

Первичные опухоли были выявлены у 11 (47,8%) пациентов: с поражением тканей свода черепа (2), лицевого скелета и основания черепа (8), мягких тканей лица (1).

Рецидивные опухоли диагностированы у 7 (30,4%) пациентов: с поражением тканей свода черепа (2), лицевого скелета и основания черепа (4), мягких тканей лица (1).

Хирургическое лечение проведено у 5 больных, комбинированное — у 15, комплексное — у 2 и последовательное у 1 больного.

Полученные в ходе проведенных экспериментальных исследований цитотоксичности и биосовместимости различных видов материалов на основе кальций-фосфатной биокерамики данные позволили выделить материалы, приемлемые для апробации в клинической практике для замещения костных дефектов: ГА-β-ТКФ (80/20) (размер гранул 300—600 мкм, пористость — 49%, размер пор — 5—30 мкм) и КГА (размер гранул 300—600 мкм, пористость — 54%, размер пор — 1—5 мкм).

При операции по удалению опухолей волосистой части головы после резекционного этапа для закрытия дефекта мягких тканей использовали местный перемещенный кожно-фасциальный лоскут скальпа на питающей ножке. При наличии плоскостного дефекта костей свода черепа без обнажения твердой мозговой оболочки осуществляли кюретаж губчатого слоя резецированной кости с пломбировкой образовавшейся полости стерильными гранулами КГА, предварительно смоченными изотоническим раствором натрия хлорида. Зону пломбировки костного дефекта сверху укрывали перемещенным апоневротическим лоскутом скальпа с фиксацией узловыми швами к окружающим тканям, что позволяло не только обеспечить стабильное положение биокерамических гранул, но и дополнительно изолировать область остеопластики от возможного инфицирования. Кожные покровы донорской области восстанавливали посредством расщепленного аутодермального трансплантата.

Реконструкция структур основания черепа после резекции решетчатого лабиринта и основной кости осуществлена у 6 больных: у 3 использован ГА-β-ТКФ (80/20), у 3 применен КГА. Доступ к опухолям решетчатого лабиринта и основной пазухи осуществляли двумя способами: посредством бифронтального разреза по границе волосистой части лба и трансназально. Кожно-апоневротический лоскут лба отсепаровывали вниз. Дополнительно формировали надкостничный лоскут на сосудистой ножке. Выполняли резекцию передней стенки лобной пазухи и переносицы, обеспечивая доступ к клеткам решетчатого лабиринта и верхнему полюсу опухоли. Далее трансназально осуществляли доступ к основной пазухе и нижнему полюсу опухоли. После удаления опухоли оценивали состояние дна операционной раны. При обнажении твердой мозговой оболочки и/или наличии ее дефектов ее ушивали с тампонадой свободным жиром, герметизацией фибрин-тромбиновым клеем и тахокомбом. Пластику основания передней черепной ямки осуществляли ранее сформированным надкостничным лоскутом, который фиксировали по периферии узловыми швами. Между листками надкостничного лоскута размещали гранулы ГА-β-ТКФ (80/20) или КГА. Полость носа тампонировали. Рану скальпа послойно ушивали и дренировали.

Отсроченная реконструкция осуществлена у 3 больных после ранее перенесенного специального противоопухолевого лечения, при отсутствии данных за местной рецидив. В данном случае была осуществлена реконструкция утраченных костных структур посредством сложного поликомпонентного индивидуального эндопро-

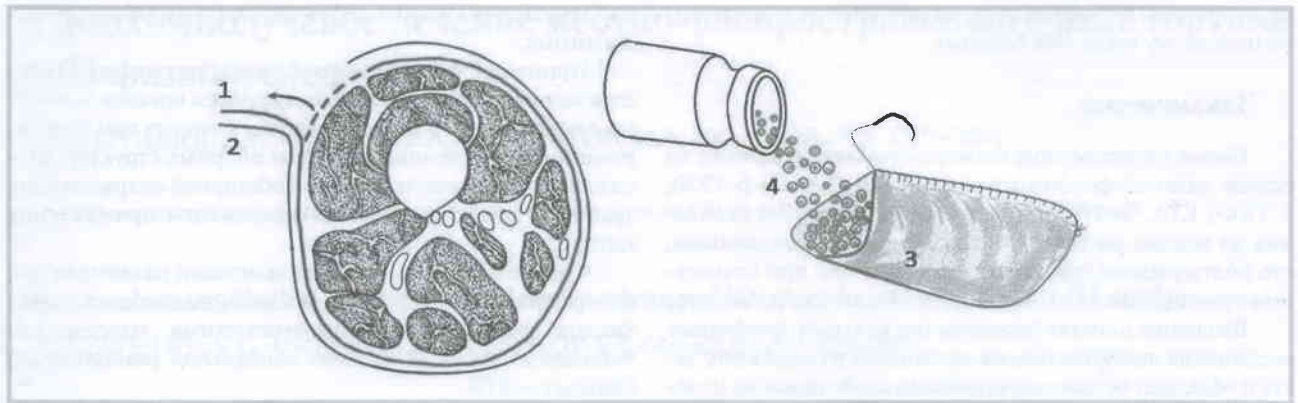


Рис. 3. Моделирование контейнера с биокерамическими гранулами.

1 — широчайшая фасция бедра; 2 — кожа; 3 — контейнер из свободного апоневротического лоскута; 4 — биокерамические гранулы.

теза, фиксирующая часть которого представлена титановой пластиной, погруженной в смесь гранул ГА-β-ТКФ (80/20) и ортопедического цемента на основе метилметакрилата. Согласно литографической модели черепа пациента с дефектом костных структур произведена фрезевая подгонка ранее смоделированного поликомпозиционного имплантата по форме к имеющемуся дефекту костей черепа. Имплантат располагали в операционной ране согласно анатомическим структурам и фиксировали к окружающим костным тканям титановыми пластинами в области затылочной кости и скулового отростка верхней челюсти.

При невозможности использования перемещенного апоневротического лоскута скальпа вследствие обширной его резекции был разработан оригинальный метод применения свободного апоневротического лоскута, выкроенного из широчайшей фасции бедра, из которого моделируется контейнер согласно форме дефекта реконструируемых тканей, посредством наложения шва по периферии контура, оставляя небольшое окно. Контейнер заполняется биокерамическими гранулами в объеме, необходимом для замещения костного дефекта, и ушивается наглухо (рис. 3). Сформированный имплантат переносится в область дефекта костных тканей основания черепа, фиксируется узловыми швами к окружающим тканям и дополнительно укрывается покровными тканями (рис. 4).

Результаты

Осложнения в зоне имплантации биокерамических гранул отмечены у одного больного, которому по поводу местно-распространенного процесса в мягких тканях височно-скуловой области с вовлечением полости рта, выполнена орофациальная резекция с замещением дефекта биокерамическими гранулами и пластикой местно перемещенными кожно-фасциальными лоскутами. В послеоперационном периоде отмечено возникновение слюнного свища, сформировавшегося между полостью рта и подлоскутным пространством, что привело к развитию выраженной местной воспалительной реакции тканей, инфицированию раны и отторжению биокерамического материала. Проводились массивная антибактериальная, противовоспалительная терапия, промывание свищевого хода и подлоскутного пространства растворами анти-

септиков, физические методы локального воздействия (лазерная терапия) на зону воспаления. В результате проведенных мероприятий явления воспаления были купированы и рана зажила вторичным натяжением.

Исходя из данных опроса, анкетирования пациентов и по объективным критериям, положительные результаты пластики (удовлетворительные и хорошие) были достигнуты в 20 (87%) из 23 наблюдений; из них хороший результат составил 65,21%. Неудовлетворительные результаты пластики отмечены у 3 (13,0%) пациентов с описанными выше осложнениями, которые потребовали дополнительных оперативных вмешательств.

По данным опроса подавляющее большинство пациентов ведут активный образ жизни, 100% больных не требуют постороннего ухода за собой, 20 — не скрывают зону операции под повязкой при общении.

Анализ качества жизни оперированных больных показал, что после проведенного лечения в целом социально

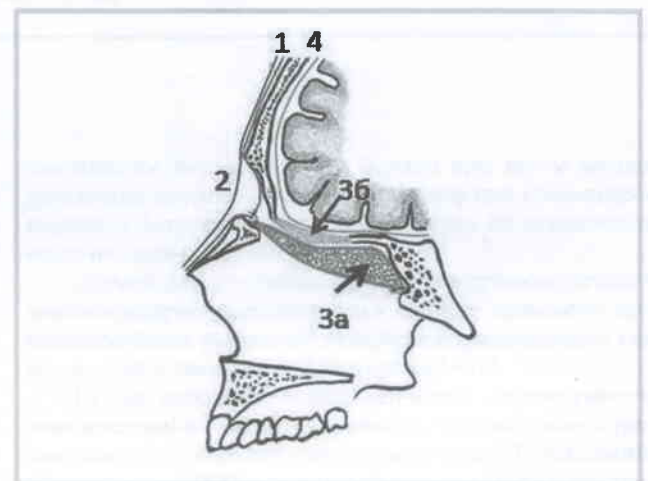


Рис. 4. Замещение костного дефекта основания черепа.

1 — апоневроз скальпа; 2 — кожно-фасциальный лоскут скальпа; 3а — дефект костей основания черепа, замещенный контейнером с биокерамическими гранулами; 3б — свободный жировой лоскут; 4 — твердая мозговая оболочка.

адаптированы 87% пациентов, возвратились к общественно полезному труду 70% больных.

Заключение

Новые отечественные биокерамические материалы на основе кальций-фосфатных соединений (ГА, ГА-β-ТКФ, β-ТКФ, КГА, Si-ГА), синтезированных методом осаждения из водных растворов, не являются цитотоксичными, что подтверждено при исследовании *in vitro*: при совместном культивировании иммортализованных фибробластов.

Входящие в состав биокерамики кальций-фосфатные соединения являются биосовместимыми в подкожном тесте и обладают остеокондуктивными свойствами на моде-

лях замещения костных дефектов у мелких лабораторных животных.

Применение кальций-фосфатной биокерамики является методом выбора для реконструкции органов челюстно-лицевой зоны у онкологических больных при формировании ограниченных дефектов опорных структур. Метод не наносит дополнительной обширной операционной травмы и обладает высоким показателем приживления материала — 91,3%.

Сравнение результатов реабилитации пациентов при разной тактике и методиках реконструкции костных дефектов различными биокерамическими материалами установило высокий процент социальной реабилитации больных — 87%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Keating J.F., McQueen M.M. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2001; 82: 3—8.
2. Chau A.M.T., Mobbs R.J. Bone graft substitutes in anterior cervical discectomy and fusion. *Eur. Spine J.* 2009; 18: 449—64.
3. Kaveh K., Ibrahim R., Bakar M.Z.A., Ibrahim T.A. Bone grafting and bone graft substitutes. *J. Anim. Vet. Adv.* 2010; 9: 1055—67.
4. Laurie S.W., Kaban L.B., Mulliken J.B., Murray J.E. Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast. Reconstr. Surg.* 1984; 73: 933—8.
5. Younger E.M., Chapman M.W. Morbidity at bone graft sites. *J. Orthop. Trauma.* 1989; 3: 192—5.
6. Le Guéhennec L., Layrolle P., Daculsi G. A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur. Cells Mater.* 2004; 8: 1—11.
7. Fuchs J.R., Nasseri B.A., Vacanti J.P. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann. Thorac. Surg.* 2001; 72: 557—91.
8. Suchanek W., Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J. Mater. Res.* 1998; 13: 94—117.
9. Vallet-Regi M., Arcos D. Nanostructured hybrid materials for bone tissue regeneration. *Curr. Nanosci.* 2006; 2: 179—89.
10. Doblaré M., Garcia J.M., Gómez M.J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Eng. Fract. Mech.* 2004; 71: 1809—40.
11. Vallet-Regi M. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Trans.* 2006; 5211—20.

Поступила 22.11.2012