

*На правах рукописи*

КОПЫЛОВ ВАДИМ АНАТОЛЬЕВИЧ

**ЛЕЧЕНИЕ ОТКРЫТЫХ ПЕРЕЛОМОВ КОНЕЧНОСТЕЙ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТАБОЛИТОВ *VACILLUS SUBTILIS* 804,  
СОДЕРЖАЩИХ ФАКТОР РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ**

14.01.15 – травматология и ортопедия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Оренбург – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный консультант:** доктор медицинских наук, профессор  
**Сафронов Андрей Александрович**

**Официальные оппоненты:**

**Резник Леонид Борисович** - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой травматологии и ортопедии.

**Линник Станислав Антонович** - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры травматологии, ортопедии и ВПХ.

**Волокитина Елена Александровна** - доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры травматологии и ортопедии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки.

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится « » \_\_\_\_\_ 2017 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д208.006.06 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 450000, г.Уфа, ул.Ленина, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России.  
[www.bashgmu.ru](http://www.bashgmu.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

М.М.Валеев

### **Актуальность темы исследования**

Травматизм является одной из ведущих причин общей заболеваемости взрослого населения (Баранов О.П., 2012). В Российской Федерации переломы костей верхней конечности составляют около 11%, а нижней конечности – около 7% от всех травм (Тихилов Р.М. и др., 2009).

Проблема лечения больных с открытыми переломами конечностей определяется всё возрастающим их количеством, сложностью и длительностью лечения, большой частотой гнойно-некротических осложнений, ложных суставов и посттравматических дефектов тканей, а также высокими показателями инвалидизации (Мироманов А. М. и др., 2009; Мартель И.И., 2011).

Характер и локализация открытых переломов длинных костей конечностей зависят от обстоятельств и механизма травмы. Так, при высокоэнергетичной травме (дорожные происшествия, падения с высоты) преобладают оскольчатые диафизарные и метафизарные переломы. Такой механизм приводит к большей выраженности локального повреждения и последующим трофическим расстройствам в области открытого перелома (Климовицкий В.Г. и др., 2013).

Лечение открытых переломов сопровождается высокой частотой развития местных инфекционных осложнений (от 26,1% до 54,7%), тяжелых контрактур суставов (до 45,4%), а также выхода на первичную инвалидность, достигающая 74,5% (Attinger С.Е. et al., 2006; Levin L.S., 2007).

Одной из причин неблагоприятных исходов открытых переломов является нарушение механизмов репаративного гистогенеза. Спектр причин этого достаточно широк. Это и возросшее количество высокоэнергетичных травм. С другой стороны, в настоящее время редко встречаются пациенты без сопутствующих заболеваний либо субклинических форм последних. То есть, при получении травмы и последующей госпитализации в медицинскую организацию, у таких больных изначально имеются предпосылки для расстройств нормальных механизмов регенерации тканей.

К настоящему времени разрабатывается ряд способов воздействия на разные звенья репаративной регенерации. Существуют работы по изучению возможностей использования физических факторов. Например, применение импульсного инфракрасного лазерного излучения. Установлено, что под действием лазера усиливается пролиферация эндотелиоцитов и перицитов, образуются сосудистые почки роста, эндотелиальные выросты и эндовазальные разрастания, локализующиеся в просвете сосудов и в интрамуральных каналах (Ирьянов Ю.М. и др., 2011). Получены положительные результаты при воздействии электромагнитного излучения крайне высоких частот. Выявлено более раннее формирование костного регенерата и быстрое сращение отломков (Ирьянов Ю.М. и др., 2012). Существуют исследования, посвященные влиянию введения остеоиндуктивных веществ в область перелома. Например, применение коллапанов - комплексов гидроксиапатита с коллагеном и лекарственными средствами (антибиотиками) (Котомцев В.В., Казанцев Н.А., 2012). В эксперименте получены хорошие результаты влияния пунктата костного мозга на активность клеток, участвующих в остеогенезе (Torres J. et al., 2015). При

дальнейших исследованиях были выделены аутологичные мезенхимальные стволовые клетки костномозгового происхождения. Они играют ключевую роль в дифференцировке остеобластов и выработке различных факторов роста, которые участвуют в процессе репаративной регенерации кости (Zhou Q.I. et al., 2015). В экспериментах *in vitro* показано стимулирующее влияние этих клеток на остеогенную пролиферацию (Wu W. et al., 2015). Однако, вышеперечисленные методы либо находятся в стадии изучения, либо их применение в клинической практике ограничено из-за технической сложности и необходимости индивидуального получения препаратов.

Для регенерации тканей при переломах играют роль различные факторы роста (тромбоцитарный, эпидермальный, фибробластический, инсулиноподобный) (Fan L. et al., 2014). Факторы роста фибробластов (ФРФ) – семейство полипептидов, участвующих в процессах репаративного гистогенеза. У человека установлено 23 пептида, которые относятся к семейству ФРФ, с молекулярной массой от 17 до 34 кДа (Sánchez-González M.C. et al., 2011). ФРФ является одним из наиболее важных проангиогенных медиаторов, участвующих в заживлении ран (Такауама М. et al., 2010). За последние десятилетия выявлено, что экзогенный ФРФ может косвенно стимулировать заживление ран, повышая продукцию других факторов роста, таких, как эпидермальный или трансформирующий факторы роста, или усиливая действие факторов роста, поставляемых в рану тромбоцитами или макрофагами (Dai K. et al., 2015). ФРФ также повышает синтез остеопоэтина, который в свою очередь стимулирует синтез моноцитами ангиогенных цитокинов, таких как фактор некроза опухолей альфа и интерлейкин-8. За счёт этого усиливается ангиогенез (Chen X.Q. et al., 2014; Ну Y. et al., 2015). ФРФ обладают цитопротективным эффектом, приводя к быстрому ограничению цитолиза (Шурыгин М.Г. и др., 2008).

К сожалению, данные о клиническом применении факторов роста фибробластов в современной мировой литературе немногочисленны.

В результате многолетних исследований в Оренбургской государственной медицинской академии был обнаружен природный штамм бактерий *Bacillus subtilis* 804, продуцирующий бактериальный фактор роста фибробластов (патент № 2427644, Никитенко В.И., 2011). В биотехнологическом эксперименте с культурой фибробластов полученный фактор роста на 30 – 45%, по сравнению с контролем, увеличивал число вырастающих клеток. Этот фактор роста термостабилен, в отличие от известных рекомбинантных ФРФ. Был создан экспериментальный препарат на основе метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащий фактор роста фибробластов. Технология получения препарата проста, легко воспроизводима, не требует больших материальных вложений.

Таким образом, существенный научный и практический интерес представляет изучение влияния метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих новый фактор роста фибробластов, на процессы регенерации костей и заживления ран с целью улучшения результатов лечения открытых переломов.

### **Цель исследования**

Улучшить результаты лечения открытых переломов конечностей с помощью метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов.

### **Задачи исследования**

1. Выявить основные проблемы, которые возникли при лечении открытых переломов длинных трубчатых костей у больных, госпитализированных в ГБУЗ ГКБ №4 г. Оренбурга в 2003-2013 г.г.

2. Установить влияние метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, на регенерацию кости при лечении открытого перелома бедра в эксперименте.

3. Оценить эффективность использования метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, при лечении ран с дефектом кожи в эксперименте.

4. Определить эффективную дозировку метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, для лечения раневых дефектов в эксперименте.

5. Выполнить доклинические исследования безопасности метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, в эксперименте на животных.

### **Научная новизна**

- выявлены закономерности стимулирующего воздействия метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, на заживление открытых переломов в эксперименте;

- установлено, что применение метаболитов *Bacillus subtilis* 804 при лечении открытых переломов оптимизирует течение воспалительного процесса, сокращая фазу ранних посттравматических изменений, а также приводит к значительной активации неоангиогенеза в области костной мозоли;

- выявлено, что при введении метаболитов *Bacillus subtilis* 804 в область перелома происходит резкое увеличение численности остеогенных клеток в зоне костной мозоли;

- доказано, что консолидация перелома диафиза бедренной кости при использовании метаболитов *Bacillus subtilis* 804 происходит быстрее, чем в контрольной группе. На 61 сутки после перелома гистологическая картина костной мозоли в контрольной группе сходна с таковой, наблюдавшейся в опытной группе на 44 сутки, что составляет 38% по отношению к группе контроля;

- впервые разработана методика лечения открытых переломов в эксперименте с использованием метаболитов *Bacillus subtilis* 804 для улучшения регенерации кости;

- установлено, что местное применение метаболитов *Bacillus subtilis* 804 улучшает результаты кожной пластики при лечении ран с дефектом кожи, определена эффективная дозировка метаболитов *Bacillus subtilis* 804 для использования при кожной пластике;

- впервые выявлено, что метаболиты *Bacillus subtilis* 804, содержащие фактор роста фибробластов, при парентеральном введении в максимальной дозе не вызывают летального и выраженного токсического эффекта, доказана доклиническая безопасность метаболитов *Bacillus subtilis* 804;

- получен патент РФ №2431203 «Способ аутодермопластики в эксперименте»;

- получен патент РФ №2606257 «Средство для стимуляции репаративного остеогенеза».

### **Теоретическая и практическая значимость результатов исследования**

Результаты анализа клинических данных выявили основные проблемы, которые возникали при лечении пострадавших с открытыми переломами в г.Оренбурге, и доказали необходимость разработки методов воздействия на репаративный гистогенез при лечении открытых переломов конечностей.

Разработано экспериментальное обоснование применения метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, для лечения открытых переломов. Разработан способ стимуляции репаративного остеогенеза. Доказано, что использование этого вещества при кожной пластике существенно улучшает результаты лечения ран с дефектом кожи. Разработан новый способ аутодермопластики. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о высокой эффективности метаболитов *Bacillus subtilis* 804 при лечении открытых переломов. При изучении доклинической безопасности установлено, что метаболиты *Bacillus subtilis* 804 не обладают острой и хронической токсичностью и не оказывают анафилактического и аллергизирующего действия на животных. Выполненная работа является необходимым этапом разработки оригинального отечественного лекарственного препарата, содержащего фактор роста фибробластов.

Полученные результаты делают возможным и целесообразным проведение клинических испытаний метаболитов *Bacillus subtilis* 804 с целью создания оригинального отечественного лекарственного препарата для лечения открытых переломов конечностей и внедрения в клиническую практику.

Основные результаты исследования внедрены в учебный процесс ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, в практическую деятельность Научно-производственной лаборатории клеточных технологий Оренбургского государственного университета. Министерством здравоохранения Оренбургской области опубликовано и рекомендовано к внедрению в клиническую практику информационно-методическое письмо «Современные аспекты лечения открытых переломов длинных трубчатых костей конечностей».

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Применение метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, при лечении открытых переломов в эксперименте оказывает стимулирующее влияние на репаративный остеогенез, ускоряет и улучшает консолидацию переломов.

2. Местное однократное применение метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, улучшает результаты кожной пластики

при лечении ран с дефектом мягких тканей. Метаболиты *Bacillus subtilis* 804 стимулируют реваскуляризацию, клеточную пролиферацию фибробластов и эпителиоцитов кожи и восстанавливают органотипическое строение кожного покрова.

3. Метаболиты *Bacillus subtilis* 804, содержащие фактор роста фибробластов, не обладают острой и хронической токсичностью и не оказывают анафилактического и алергизирующего действия в экспериментах на животных.

#### **Методология и методы исследования.**

В исследовании использован традиционный системный научный подход. Дизайн исследования предусматривал три части работы. В первой части использованы ретроспективные методы анализа результатов лечения пациентов, с дальнейшей статистической обработкой и систематизацией, для решения задачи по выявлению основных проблем, возникших при лечении открытых переломов длинных трубчатых костей.

Затем была выдвинута гипотеза о возможности локального стимулирующего воздействия на репаративный гистогенез костной ткани и кожи при лечении открытых переломов костей конечностей с помощью метаболитов *Bacillus subtilis* 804. Были использованы экспериментальные модели открытого перелома с последующим остеосинтезом, модель раны с дефектом мягких тканей. На третьем этапе изучалась доклиническая безопасность метаболитов *Bacillus subtilis* 804. На данных этапах использованы клинические, биохимические, обзорные гистологические, гистохимические, иммуноцитохимические, морфометрические, статистические методы исследования.

#### **Апробация результатов исследования**

Основные положения работы доложены и обсуждены на X международной научно-практической конференции "Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности" (Санкт-Петербург, 2010), Международной научно-практической конференции травматологов-ортопедов «Достижения и перспективы развития травматологии и ортопедии» (Астана, 2011), Национальном конгрессе «Пластическая хирургия» (Москва, 2011), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 2012), Всероссийской научной конференции «Актуальные проблемы морфологии, адаптогенеза и репаративных гистогенезов» (Оренбург, 2013), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и достижения в медицине» (Самара, 2015), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Морфологические науки и клиническая медицина» (Чебоксары, 2015).

#### **Публикации по теме исследования**

Основные положения диссертации опубликованы в 20 научных работах, в том числе: 15 статьях в рецензируемых научных журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий» ВАК РФ, 2 статьях в зарубежных научных изданиях, 3 публикациях в материалах международных конференций. Получен патент РФ на изобретение №2431203 «Способ аутодермопластики в эксперименте», патент РФ на изобретение

№2606257 «Средство для стимуляции репаративного остеогенеза». Министерством здравоохранения Оренбургской области опубликовано и рекомендовано к внедрению в клиническую практику информационно-методическое письмо «Современные аспекты лечения открытых переломов длинных трубчатых костей конечностей».

#### **Степень достоверности и личный вклад автора.**

Достоверность результатов научного исследования определяется изучением достаточного объема клинического и экспериментального материала. В работе использованы современные методы исследования, полностью соответствующие цели и поставленным задачам. Научные положения, выводы и рекомендации, аргументированы и вытекают из проведенных автором исследований. Статистическая обработка полученных качественных и количественных данных проведена на современном методологическом уровне.

Выполнение данной работы начиналось при непосредственном участии и научной консультации профессора В.И.Никитенко, идеи и разработки которого сделали возможным выполнение научного исследования.

Обработка результатов исследования, представленных в главах 4, 5, 6, осуществлена при содействии д.м.н профессора Валентины Сергеевны Поляковой. Комиссия ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России произвела проверку соответствия первичной документации материалам диссертации соискателя В.А.Копылова. Комиссия сделала вывод о личном участии автора в проведении всех исследований, представленных в диссертации, а также соответствии результатов, зафиксированных в первичной документации, данным, отраженными в диссертации. Полнота и глубина собранного материала в достаточной мере обосновывает выводы и рекомендации, вытекающие из полученных автором диссертации результатов. Диссертация является результатом самостоятельной работы автора.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 249 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора научной литературы, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Текст иллюстрирован рисунками и таблицами. Список литературы содержит 294 источника, в том числе 182 иностранных. Текст иллюстрирован 181 рисунками и 46 таблицами.

### **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, освещены его научная новизна и практическая значимость, изложены основные положения, выносимые на защиту, представлены сведения о реализации и апробации работы, а также об объеме и структуре диссертации.

**В первой главе** (обзоре литературы) отражено современное состояние проблемы лечения открытых переломов и воздействия на репаративную регенерацию кости и мягких тканей при лечении открытых переломов.

#### **Материалы и методы выполненного диссертационного исследования.**

*Клинический материал исследования* состоял из данных о 291 пациенте, находившихся на лечении в городской клинической больнице №4 г. Оренбурга за

период с 2003 по 2013 годы. В выборку включались пострадавшие с открытыми переломами длинных трубчатых костей конечностей.

*Характеристика используемого вещества.* Ранее проведенными исследованиями профессора В.И. Никитенко (патент на изобретение № 2427644) было установлено, что метаболиты жизнедеятельности бактерий штамма *Bacillus subtilis* 804 содержат неизвестный фактор роста фибробластов. Наличие нового фактора роста фибробластов в метаболитах штамма подтверждено исследованиями и актом Научно-производственного центра медицинской биотехнологии (г. Москва) в 1989 году. Обнаруженный фактор роста фибробластов – это комплекс термостабильных (до 128 °С) четырех белков молекулярной массой от 11 до 14 кДа. В разведении 1:10 – 1:20 он оказывает почти такое же стимулирующее действие на рост культуры клеток эмбриональных фибробластов человека и опухолевых клеток С6 глиомы, как и 5% фетальная сыворотка (стандарт). Фактор роста чувствителен к протеолизу под действием трипсина, имеет изоэлектрическую точку в области 9,2 – 9,3.

Мы применяли метаболиты штамма *Bacillus subtilis* 804 в виде стандартизированного препарата под названием «Винфар», изготовленные в ООО «Бакорен». Препарат упаковывали по 10 мл в стерильные пластиковые флаконы с капельницей и пробкой с контролем вскрытия. Препарат представляет собой стерильную прозрачную жидкость, содержащую 5% метаболитов с новым фактором роста фибробластов и воду. Содержание белка в нем – не менее 0,1%, а количество фактора роста - не менее 10 нанограмм в мл. рН препарата равен 7,1±0,2.

*Структура экспериментов.* Для обеспечения однозначности результатов экспериментальная работа была разделена на две части. Первая - разработка новых способов стимулирующего воздействия на остеогенез при лечении открытого перелома бедра. Вторая была посвящена созданию новых способов лечения ран с дефектом кожи с помощью воздействия метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов.

Все манипуляции с животными выполнены в соответствии с требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985), Хельсинской декларации от 2000 г. «О гуманном отношении к животным» и приложении №8 «Правил гуманного отношения к лабораторным животным», правил лабораторной практики в РФ (приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003). Получено одобрение Локального этического комитета ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России.

*Для изучения возможности стимулирующего воздействия на остеогенез* мы выполнили эксперименты на белых крысах-самцах линии «Wistar» массой 185 – 215 г. Для наркоза 1% раствор тиопентала натрия вводился 112 крысам внутривенно в дозе 40 мг на 1 кг массы животного. Была выполнена остеотомия средней трети бедра с последующим интрамедуллярным остеосинтезом спицей (рисунок 1). 48 животным опытной группы дважды вводили в область перелома по 0,2 мл метаболитов *Bacillus subtilis* 804 (в виде препарата «Винфар») - непосредственно после наложения швов и через 24 часа.

Крысы контрольной группы получали раствор натрия хлорида 0,9% в том же количестве.

Ежедневно у животных этих двух групп оценивалось клиническое состояние ран, регистрировались потребление корма и воды, особенности поведения, масса тела животных. На 3, 7, 14, 21, 28, 44 и 61 сутки выполнялись контрольные рентгенограммы с помощью флюороскопической рентгеновской установки «С-дуга КМС-950 с принадлежностями», производитель КОМЕД Медикал Системс Ко. ЛТД, Республика Корея. Также в эти сроки по 8 крыс каждой группы были подвергнуты эвтаназии путём декапитации под эфирным наркозом. Забирались ткани области перелома для морфологических исследований.

Для изучения влияния метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, на репаративный гистогенез при лечении ран с дефектом мягких тканей нами было использовано 80 белых крыс-самцов линии «Wistar» массой 185 – 215 г. Им наносились глубокие скальпированные раны области спины с дефектом мягких тканей (рисунок 2). Средние размеры ран  $2,25 \pm 0,05 \text{ см}^2$ .

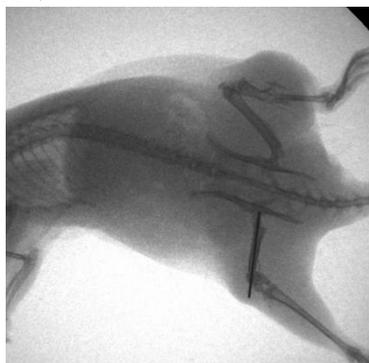


Рисунок 1 - Остеосинтез бедра крысы спицей. Интраоперационная рентгенограмма



Рисунок 2 - Крыса. Модель раны с дефектом мягких тканей

На 9 сутки струп удаляли, на 10 сутки под тиопенталовым наркозом выполнялась аутодермопластика расщеплённым кожным трансплантатом. 60 крысам при проведении кожной пластики непосредственно перед укладкой трансплантата рану орошали 0,1 мл препарата. Из них 20 животных получали нативный препарат (опытная группа №1), 20 – разведённый в 10 раз (опытная группа №2), и 20 – разведённый в 100 раз (опытная группа №3). 20 животным контрольной группы рану орошали 1 мл физиологического раствора. Донорские раны орошались теми же веществами, что и операционные раны.

Ежедневно выполнялись наблюдения за состоянием ран, степенью приживления трансплантата, а также регистрировалось потребление корма и воды, особенности поведения, масса тела животных. На 7, 10 и 20 сутки по 5 животных из каждой группы были подвергнуты эвтаназии путём декапитации под эфирным наркозом. За остальными животными обеих групп наблюдение продолжалось до 30 суток, затем они были выведены из опыта. Забирались ткани области ран для морфологических и иммуногистохимических исследований.

При определении доклинической безопасности мы использовали методы, описанные в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», под общей ред. члена-корреспондента РАМН, проф. Р.У.Хабриева (2005).

Для определения острой токсичности мы использовали 72 взрослых крыс линии «Wistar» массой 180-200 г и 72 взрослых мышей линии BALB/C массой 18-20 г. Схема исследования отражена в таблице 1.

Таблица 1 - Схема исследования острой токсичности

Группы	Кол-во живот-ных	Вводимое вещество	Путь введения
Крысы №1 - опыт	12	Препарат – 0,5 мл	Внутримышечно
Крысы №2 - опыт	12	Препарат – 1,5 мл	Внутримышечно
Крысы №3 - опыт	12	Препарат – 5,0 мл	Внутримышечно
Крысы №4 - контроль	12	Физ. раствор – 0,5 мл	Внутримышечно
Крысы №5 - контроль	12	Физ. раствор – 1,5 мл	Внутримышечно
Крысы №6 - контроль	12	Физ. раствор – 5,0 мл	Внутримышечно
Мыши №1- опыт	12	Препарат – 0,1 мл	Внутрибрюшинно
Мыши №2- опыт	12	Препарат – 0,5 мл	Внутрибрюшинно
Мыши №3- опыт	12	Препарат – 1,0 мл	Внутрибрюшинно
Мыши №4- контроль	12	Препарат – 0,1 мл	Внутрибрюшинно
Мыши №5- контроль	12	Препарат – 0,5 мл	Внутрибрюшинно
Мыши №6- контроль	12	Препарат – 1,0 мл	Внутрибрюшинно

Общий срок наблюдения за животными после введения препарата составил 15 дней. После введения препарата на протяжении первого дня каждый час регистрировались общее состояние, поведение, координация, наличие судорог, реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, волосяной и кожный покров, потребление корма и воды. В последующие 14 дней состояние животных отмечалось один раз в сутки. Потребление корма определялось визуально каждый день и количественно на 1, 7 и 14 сутки путем взвешивания решетки с кормом в начале и спустя 24 часа. Масса тела подопытных животных регистрировалась перед первым введением, на 7 и на 14 сутки. Клинический анализ крови выполнялся на вторые, седьмые и четырнадцатые сутки опыта.

На 15-е сутки животных выводили из опыта. Выполнялись патоморфологические исследования. Среднелетальную дозу - LD50 - определяли по методу Спирмэна-Кербера (Cornfield, Mantel, 1956).

Для изучения хронической токсичности были поставлены эксперименты с использованием 50 крыс линии «Wistar» массой 180-200 г. и 50 мышей линии BALB/C массой 18-20 г. Схема исследования отражена в таблице 2.

Вещества вводились однократно, до утреннего кормления. Все процедуры осуществлялись с соблюдением правил асептики и антисептики.

На протяжении опыта наблюдали за поведением животных, их подвижностью, состоянием шерсти, кожного покрова, аппетитом, динамикой веса. Анализ функционального состояния органов и систем проводили до введения препарата (фон), затем на 28-й, 56-й, 84-й и 112-й дни после начала

введения и спустя месяц (140-й день опыта) после отмены препарата. Кровь для прижизненных биохимических и гематологических исследований брали из хвостовой вены.

Таблица 2 - Схема исследования хронической токсичности

Группы	Кол-во животных	Вводимое вещество, кол-во и кратность введения	Путь введения
Крысы - опыт	30	Препарат – 2,5 мл, 1 раз в неделю в течение 16 недель	Внутримышечно
Крысы - контроль	10	Физ. раствор – 2,5 мл, 1 раз в неделю в течение 16 недель	Внутримышечно
Интактные крысы	10	Воздействию не подвергались	
Мыши - опыт	30	Препарат – 0,5 мл, 1 раз в неделю в течение 16 недель	Подкожно
Мыши - контроль	10	Физ. раствор – 0,5 мл, 1 раз в неделю в течение 16 недель	Подкожно
Интактные мыши	10	Воздействию не подвергались	

В крови подсчитывалось содержание форменных элементов: эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов; определялась лейкоцитарная формула и концентрацию гемоглобина. Уровень глюкозы в крови был исследован ортотолуидиновым методом. Из биохимических показателей крови анализировались концентрация билирубина, креатинина, аминотрансфераз, щелочной фосфатазы, мочевины и холестерина. Для оценки функции выделительной системы определяли плотность и pH мочи.

Через 16 недель (112 дней) половина животных из каждой серии была выведена из опыта путём декапитации под эфирным наркозом. Выполнялось патоморфологическое исследование внутренних органов (печень, селезенка, желудок, почки, легкие, головной мозг, сердце). Через месяц после отмены препарата оставшаяся часть животных была выведена из опыта для морфологического изучения.

Для изучения анафилактического действия препарата были выполнены эксперименты с использованием 15 морских свинок. Морские свинки были разделены на три группы по 5 животных – две опытные и одна контрольная. Первой опытной группе вводилось 0,1 мл препарата, второй – 1,0 мл препарата. Всего было сделано три инъекции. Первая инъекция была выполнена подкожно, две последующие – через день внутримышечно в область бедра. Контрольной группе были выполнены инъекции изотонического раствора натрия хлорида – по 1,0 мл. На 17 день была выполнена внутримышечная разрешающая инъекция (животным первой группы – в объёме 0,3 мл, второй группы – 3,0 мл). Контрольной группе животных вводилось 3,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Учет интенсивности анафилактического шока был выполнен по Weigle (1960).

Для выявления алергизирующего действия были выполнены эксперименты на 10 морских свинок. На выстриженный участок кожи туловища наносили по 3 капли препарата на протяжении двух недель по 5 раз в неделю. Ежедневно учитывалась реакция кожи для выявления развития неаллергического контактного

дерматита. Затем провели 20 повторных накожных аппликаций на другой участок кожи размером 2x2 см по 5 раз в неделю, по 3 капли. Реакция кожи учитывалась на 10 и 20 дни.

**Методики гематологических, биохимических и морфологических исследований.** Гематологические показатели при выполнении клинических анализов крови выполняли с помощью автоматического гематологического анализатора «Medonic M20S» (производитель Boule Medical A.B., Швеция). Для определения биохимических показателей крови был использован биохимический анализатор «Stat Fax 1904 Plus» (производитель Awareness Technology Inc., США). Определению плотности и pH мочи выполнялось с помощью полуавтоматического анализатора мочи «Радуга А-Фм 10» (производитель ООО «Дальневосточная медицинская компания», Россия).

Образцы мягких тканей области ран и кожных трансплататов фиксировали в 10% растворе формалина, забуференного по Лилли, затем обезвоживали в этаноле возрастающей крепости и заливали в целлоидин-парафин по общепринятой методике. Гистосрезы толщиной 5-6 мкм после депарафинирования исследовали при помощи световой микроскопии с применением гистологического (окраска гематоксилином Майера и эозином), гистохимического (окраска по Маллори, толуидиновым синим), иммуногистохимического (выявление экспрессии белка Ki-67, коллагена I - III типа) методов исследования и морфометрии. С помощью программы оптического анализа Image J 1.46h по цифровым микрофотографиям проводили морфометрическую оценку эпидермиса и дермы (подсчёт объёмной плотности сосудов микроциркуляторного русла, коллагеновых волокон, аморфного вещества, клеток). При оценке экспрессии Ki-67 рассчитывали индекс пролиферации (ИП) по формуле:  $ИП = (n+/N) \times 100\%$ , где n+ – число меченых ядер, N – общее число ядер в базальном и шиповатом слоях в поле зрения микроскопа (на микрофотографии). В ходе иммуногистохимического исследования использовали моноклональные антитела anti-Ki-67, anti-Collagene I Type и anti-Collagene III Type и систему визуализации SS HRP Label (Peroxidase-Conjugated Streptavidin) фирмы «BioGenex», США. При проведении статистической обработки результатов вычисляли средние значения абсолютных и относительных величин (M), ошибки средних величин (m) и t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверно значимыми, при уровне вероятности  $p \leq 0,05$ .

Фрагменты отломков костей с костной мозолью фиксировали в 10% нейтральном формалине (на фосфатном буфере) с последующей декальцинацией смесью: Трилон Б + 40% NaOH + H<sub>2</sub>O(дист.), обезвоживанием в спиртах возрастающей крепости, заливкой кусочков парафином - целлоидином и изготовлением гистосрезов толщиной 5,0-6,0 мкм. Исследования проводили с использованием гистологических, иммуногистохимических методов и морфометрии. Гистологическое исследование включало окраску гематоксилином Майера и эозином. При проведении иммуногистохимических методов исследования для выявления экспрессии CD34 (маркер эндотелиоцитов), CD68 (маркер макрофагов, хондро- и остеокластов) и collagen I использовались соответственно антитела anti-CD34 и anti-CD68 («SPRING Bioscience», США),

anti-Collagene I Type («GeneTex», США). Используемая система детекции - Reveal Polyvalent HRP – DAB Detection System («SPRING Bioscience», США). Подсчет клеток производился в абсолютных значениях (абсолютная численная плотность - АЧП) при общем увеличении  $\times 300$  на площади соответствующего среза (поля зрения – п.з.) равной  $0,077 \text{ мм}^2$  минимум в 5 полях зрения для каждого показателя. Подсчет площади коллагеновых волокон производился в относительных значениях (относительная объёмная плотность - ООП), как отношение площади коллагена I типа к общей площади тканевых элементов в пределах исследуемого гистосреза на 1 микрофотографии (равной 1 полю зрения) при увеличении  $\times 300$  минимум в 5 полях зрения (микрофотографий) для каждого показателя.

Статистическая обработка производилась на персональном компьютере с помощью лицензированного пакета прикладных программ приложения Microsoft Office в операционной системе Microsoft Windows 7. При проведении статистической обработки результатов вычисляли средние значения абсолютных и относительных величин ( $M$ ), стандартное отклонение ( $m$ ). Для оценки достоверности различий между количественными показателями групп использовали однофакторный дисперсионный анализ. Различия считали достоверно значимыми, при уровне вероятности  $p \leq 0,05$ .

**В третьей главе диссертации** представлен анализ результатов лечения пациентов с открытыми переломами длинных трубчатых костей, госпитализированных в ГБУЗ ГKB №4 г. Оренбурга в 2003-2013 г.г.

Критерии включения в исследование:

- Госпитализация в ГБУЗ ГKB №4 г.Оренбурга;
- Наличие открытого перелома костей следующих сегментов: плечо, предплечье, голень, бедро.

Критерии невключения:

- Возраст менее 18 лет;
- Беременность;
- Наличие переломов других локализаций;
- Переломы более двух сегментов;
- Сочетанная и комбинированная травма.

Анализ обстоятельств получения травм выявил следующее (диаграмма 2.1.2). Большинство пострадало в дорожно-транспортных происшествиях – 84 человека (28,9%). Огнестрельные ранения были причинами открытых переломов у 6 (2,1%) пациентов, падения с высоты – у 37 человек (12,7%). Прочие травмы получили 164 (56,4%) пациента. Это падения с высоты собственного роста (обычно в гололёд), спортивные травмы, прямые травмы (падения и удары тяжёлыми предметами).

Большинство пациентов – 215 (73,9%) было доставлено в течение первого часа после травмы. В период от 1 до 3 часов поступило 23 человека (7,9%), от 3 до 6 часов – 8 пациентов (2,7%). В срок от 6 до 12 часов после травмы было доставлено 5 человек (1,7%), от 12 до 24 часов – 7 человек (2,4%). 33 пациента

(11.3%) поступило позже 24 часов, они были направлены из других лечебных учреждений.

В нашей работе мы использовали классификацию R.V. Gustilo и J.T. Anderson. Она широко используется как отечественными, так и зарубежными авторами, что дает большие возможности для сравнения наших результатов. Согласно классификации R. Gustilo и J. Anderson пациенты распределились следующим образом (рисунок 3). Более половины составляли переломы I и II типа, 86 (29,6%) и 103 (35,4%) пациентов соответственно. У 73 пострадавших (25,1%) были переломы IIIА, у 22 человек (7,6%) – IIIВ, и 7 пациентов (2,4%) госпитализировано с переломами IIIС типа.

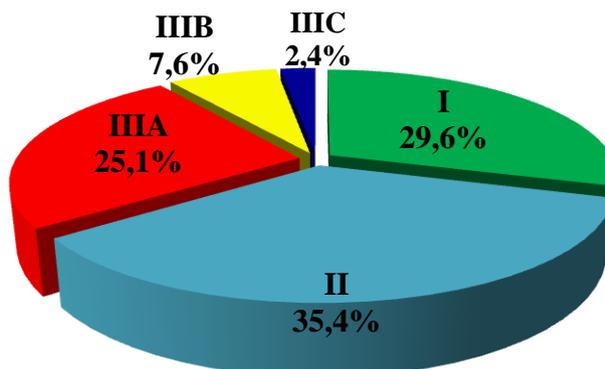


Рисунок 3 - Распределение пациентов по типу перелома (классификация R. Gustilo и J. Anderson)

(ПХО) раны при поступлении. Операции остеосинтеза были проведены у 257 пострадавшего. У 34 пациентов были переломы без смещения, либо с незначительным смещением. Им проводилась консервативная терапия, включающая репозицию и иммобилизацию с помощью гипсовых повязок, либо скелетного вытяжения. Общая характеристика операций остеосинтеза дана в таблице 3.

Таблица 3 - Характеристика операций остеосинтеза

Метод остеосинтеза	Аппарат внешней фиксации (АВФ)	Внутренняя фиксация (экстрamedулярный остеосинтез)	Внутренняя фиксация (интрамедулярный остеосинтез)	АВФ с последующей заменой на внутренний фиксатор
Количество пациентов	95 (37%)	106 (41,2%)	48 (18,7%)	8 (3,1%)

На рисунке 4 отражена зависимость выбора метода остеосинтеза от тяжести открытого перелома (по классификации R.Gustilo и J. Anderson). Оказалось, что при переломах I и II типа большая часть пациентов была прооперирована с использованием внутренней фиксации.

Однако при тяжелых переломах IIIА и IIIВ типа резко возрастает доля использования АВФ – 47,7% и 61,9% соответственно. Таким образом, выявлена устойчивая зависимость к повышению частоты остеосинтеза аппаратом внешней фиксации при тяжелых переломах.

Общие данные о частоте и характере осложнений, которые развились в стационаре у оперированных пациентов с открытыми переломами конечностей, приведены в таблице 4.

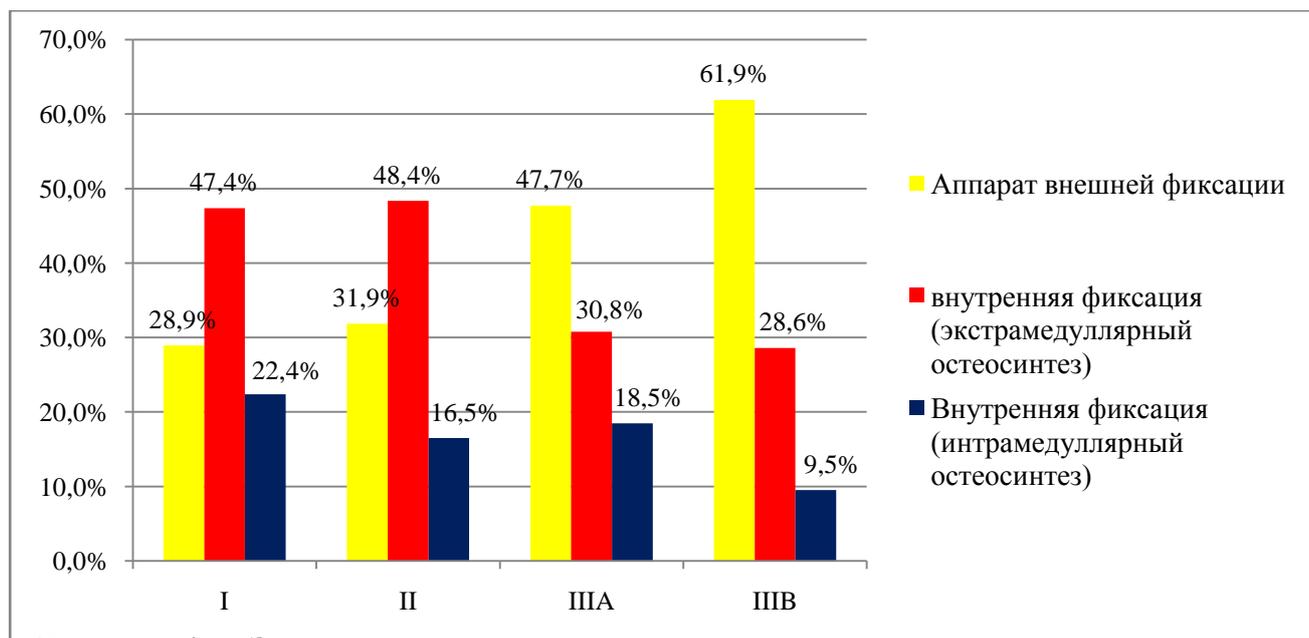


Рисунок 4 - Зависимость метода остеосинтеза от тяжести открытого перелома

Таблица 4 - Частота осложнений после остеосинтеза открытых переломов

Осложнение	Нет осложнений	Некроз краев раны	Некроз лоскута частичный	Некроз лоскута полный	Нагноение раны поверхностное	Нагноение раны глубокое
Число пациентов	225	8	15	4	20	19
Доля от общего числа пациентов	77,3%	2,7%	5,2%	1,4%	6,9%	6,5%

Как видно из таблицы, основными видами осложнений были частичный некроз лоскута (несвободный мягкотканый лоскут выкраивали из местных тканей и перемещали для закрытия дефекта) и нагноение раны, общее количество осложнений составило 66 случаев (22,7%).

Зависимость числа осложнений от тяжести перелома приведена в таблице 5.

Таблица 5 - Соотношение частоты осложнений и тяжести перелома (по R.Gustilo и J. Anderson)

Тип перелома	Количество осложнений	
	Частота осложнений	Число пациентов с осложнениями
I	19,8%	17
II	16,5%	17
IIIA	24,7%	18
IIIB	54,5%	12
IIIC	28,6%	2

Отмечается устойчивая тенденция к увеличению частоты осложнений при более тяжёлых переломах. На первый взгляд, в эту тенденцию не вписываются переломы ШС типа, но из 7 пациентов с такими переломами у трёх выполнены ампутации, ещё у двух развились осложнения. Поэтому общее число неблагоприятных исходов после переломов ШС типа – 5 из 7 (71,4%).

При анализе сроков выполнения операций остеосинтеза выявлено следующее распределение, отражённое в таблице 6.

Таблица 6 - Сроки проведения операций остеосинтеза

<i>Время после госпитализации</i>	Первые 6 часов	6 - 24 часа	24-48 часов	после 2 суток
<i>Количество пациентов</i>	102 (39,7%)	4 (1,6%)	6 (2,3%)	145 (56,4%)

Как видно из таблицы, основное количество операций выполнено либо в первые 6 часов после поступления, либо через несколько суток после купирования воспалительных явлений, при условии неосложнённого заживления раны. Интересен анализ зависимости частоты осложнений от сроков проведения операций остеосинтеза (таблица 7).

Таблица 7 - Количество осложнений после операций остеосинтеза, выполненных в первые 6 часов и после 2 суток после госпитализации

<i>Вид осложнения</i>	<i>Число осложнений</i>	
	<i>После операций, выполненных в первые 6 часов после поступления</i>	<i>После операций, выполненных после 48 часов после поступления</i>
Некроз краев раны	3 (2,9%)	5 (3,4%)
Некроз лоскута частичный	11 (10,8%)	2 (1,4%)
Некроз лоскута полный	1 (1%)	3 (2,1%)
Нагноение раны поверхностное	7 (6,9%)	11 (7,6%)
Нагноение раны глубокое	5 (4,9%)	11 (7,6%)
<b>Всего</b>	<b>32 (22,1%)</b>	<b>27 (26,5%)</b>

Выявлено, что частота осложнений после операций, выполненных при поступлении несколько ниже, чем после отсроченных вмешательств (22,1% и 26,5% соответственно).

Более половины (56,8%) операций остеосинтеза открытых переломов с помощью АВФ выполнено при поступлении. В тоже время большая часть операций по внутреннему (погружному) остеосинтезу была проведена позднее 2 суток после госпитализации. Это 65,1% операций экстрamedулярного остеосинтеза и 79,2% интрамедулярной фиксации.

Общие данные об анатомо-функциональных отдаленных результатах лечения открытых переломов у пациентов, которым выполнялись операции

остеосинтеза, представлены в таблице 8. Сроки наблюдения – от 1 до 2 лет после травмы.

Таблица 8 - Анатомо-функциональные результаты лечения открытых переломов после операций остеосинтеза

<i>Анатомо-функциональные результаты</i>	<i>Число пациентов, абс.</i>	<i>Доля от общего числа пациентов, %</i>
Сращение перелома с восстановлением функции	212	82,5%
Сращение перелома с деформацией конечности и нарушением функции	4	1,6%
Нарушения консолидации (несращения, ложные суставы)	27	10,5%
Хронический остеомиелит	14	5,4%

Общая частота неудовлетворительных исходов в отдалённом периоде – 17,5%. Из них наибольшую долю составили нарушения консолидации – 10,5%. Причем несращения встречались при любом виде остеосинтеза.

Интересен анализ отдаленных исходов у пациентов, которые имели переломы двух сегментов. Таких пострадавших было 15 человек, открытый перелом одного сегмента из двух повреждённых был у 14 пациентов, у одного были открытые переломы обоих сегментов I типа (переломы обеих голеней). У 6 человек (40%) произошли несращения переломов одного из сегментов.

Высокоэнергетичные травмы, переломы двух и более сегментов являются факторами риска для нарушений консолидации. Приведём клинический пример.

Пациентка А., 24 года, получила травму в январе 2014 г. – была сбита автомобилем. Получила переломы обеих бёдер в средней трети диафиза. Перелом правого бедра был открытый – ША типа по классификации R. Gustilo и J. Anderson (рисунок 5). Выполнялся остеосинтез обеих бёдер штифтами (рисунок 6).



Рисунок 5 - Пациентка А.  
Рентгенограммы правого бедра  
при поступлении



Рисунок 6 - Пациентка А.  
Остеосинтез правого бедра на 5  
сутки после травмы

В ноябре 2014г. на контрольных рентгенограммах выявлены нарушения консолидации (рисунок 7). У пациентки сохранялись боли в проекции переломов при ходьбе. Она передвигалась с помощью костылей. Выполнена реконструктивная операция на правом бедре – удаление металлоконструкций, остеосинтез пластиной и винтами с костной аутопластикой. Через 6 недель пациентке разрешили наступать на правую ногу. Перелом консолидировался (рисунок 8).



Рисунок 7 - Пациентка А.  
Рентгенограммы правого бедра  
через 10 месяцев



Рисунок 8 - Пациентка А.  
Рентгенограммы правого бедра через  
4 месяца после реконструктивной  
операции

При анализе отдаленных исходов различных по тяжести открытых переломов выявлено следующее. Частота удовлетворительных результатов лечения снижается с увеличением тяжести перелома (таблица 9).

Таблица 9 - Отдаленные результаты лечения различных по тяжести открытых переломов конечностей

Тип перелома	Сращение перелома с восстановлением функции		Сращение перелома с деформацией конечности и нарушением функции		Нарушения консолидации (несращения, ложные суставы)		Хронический остеомиелит	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
I	72	83,7%	3	3,5%	6	7%	5	5,8%
II	97	94,2%	0		5	4,9%	1	1%
IIIА	49	67,1%	1	1,4%	17	23,3%	6	8,2%
IIIВ	15	68,2%	0		2	9,1%	5	22,7%
IIIС	3	42,9%	1	14,3%	У трех пациентов выполнены ампутации			

Так при переломах I и II типа сращение перелома с восстановлением функции произошло у 72 (83,7%) и 97 (94,2%) пациентов соответственно. После лечения переломов IIIА и IIIВ типа отдаленные удовлетворительные результаты

отмечены лишь у 49 (67,1%) и 15 (68,2%) пострадавших соответственно. При открытых переломах ШСу трех из семи пациентов выполнены ампутации, у одной возникла деформация конечности и лишь у трех больных наступило хорошее сращение перелома.

Таким образом, в результате проведенного анализа выявлено, что основными проблемами, требующими изучения и решения, в раннем периоде являются инфекционные, а в отдаленные сроки – нарушения консолидации переломов. Степень тяжести перелома прямо влияет на развитие инфекционных осложнений и на отдаленные результаты лечения. Частота нарушений консолидации после тяжелых открытых переломов остаётся высокой, вне зависимости от способа остеосинтеза.

Результаты анализа клинических данных доказали необходимость разработки методов воздействия на репаративный гистогенез.

**В четвертой главе диссертации** представлены результаты изучения влияния метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, на репаративный остеогенез в эксперименте. Из разреза 1,0 см по латеральной поверхности бедра всем животным была выполнена остеотомия бедренной кости в средней трети. После чего выполнялся интрамедуллярный остеосинтез бедра спицей. Далее 56 крысам опытной группы в рану введено 0,2 мл метаболитов *Bacillus subtilis* 804, 56 животным группы контроля в рану введено 0,2 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Раны ушиты наглухо. Через 24 часа после операции крысам опытной и контрольной групп в гематому области перелома инъекционно было введено по 0,2 мл метаболитов *Bacillus subtilis* 804 и 0,9% раствора NaCl соответственно.

У двух животных из контрольной группы возникли инфекционные осложнения области хирургического вмешательства (на вторые и третьи сутки). Они были выведены из опыта. В опытной группе инфекционных осложнений области хирургического вмешательства не отмечалось.

При сравнении средней толщины периостальной костной мозоли у животных контрольной и опытной групп отмечаются различия в динамике репаративного остеогенеза (таблица 10).

Таблица 10 - Средняя толщина периостальной мозоли в зоне перелома, мм

<i>Сроки</i>	<i>Контрольная группа</i>	<i>Опытная группа</i>
3 сутки	0,26±0,015	0,79±0,020
7 сутки	1,25±0,07	1,64±0,09
14 сутки	2,15±0,09	1,82±0,05
21 сутки	2,48±0,11	1,80±0,04
28 сутки	2,11±0,09	1,65±0,08
44 сутки	0,27±0,02	0,10±0,03
61 сутки	0,18±0,01	0,04±0,005

Более наглядно эти различия отражены на рисунке 9.

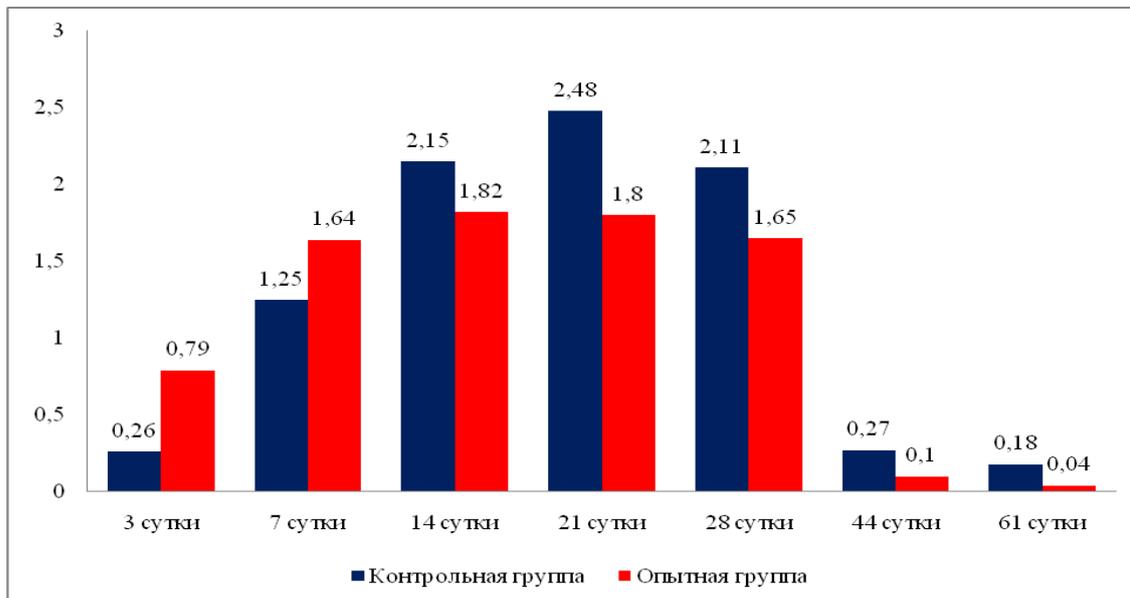


Рисунок 9 – Средняя толщина периостальной мозоли в зоне перелома, мм

На всех сроках исследования наблюдается достоверное различие ( $p \leq 0,05$ ) между показателями толщины периостальной костной мозоли животных опытной и контрольной групп. У крыс опытной группы отмечается более быстрый рост мозоли на 7-е сутки, но в целом её толщина значительно меньше, чем в контрольной группе. Это говорит о большей стабильности перелома у животных опытной группы. Так как метод остеосинтеза у всех животных был одинаковый – интрамедуллярный остеосинтез, то большая стабильность перелома достигалась за счёт лучшего формирования эндостальной костной мозоли. Это доказано при гистологическом исследовании, результаты которого приводятся далее.

На 3 сутки у животных *контрольной группы* послеоперационные раны без признаков воспаления. На рентгенограммах признаков миграции металлоконструкций нет (рисунок 10).

В интермедиарной зоне перелома выражена воспалительная реакция: отёк, лейкоцитарная инфильтрация, появление грануляционной ткани, отсутствие остеокластов. Пролиферирующие клетки надкостницы начинают дифференцироваться в хондробласты (АЧП хондробластов  $101,0 \pm 8,0$ /п.з.), формируя тонкий слой периостальной костной мозоли толщиной  $0,26 \pm 0,015$  мм (рисунок 11).



Рисунок 10 - Рентгенограмма бедра крысы контрольной группы, 3 сутки

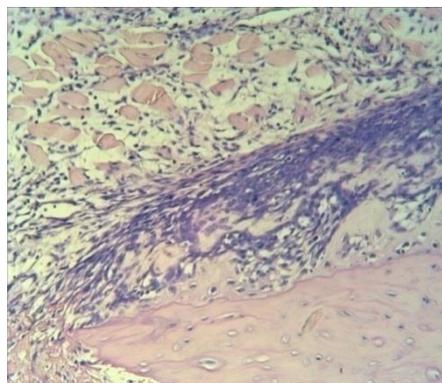


Рисунок 11 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости, 3 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение (ув.) 150

У животных *опытной группы* миграций спиц нет (рисунок 12). В области интермедиарной мозоли воспалительная реакция нивелирована, имеется обилие волокнистого матрикса, появившиеся остеокласты формируют лакуны резорбции в интермедиарной зоне костных отломков. На фоне развитой грануляционной ткани, заметна выраженная пролиферация клеток мезенхимального происхождения с началом дифференцировки в хондробласты и остеобласты. Сформирована толстая периостальная костная мозоль толщиной  $0,79 \pm 0,020$  мм (рисунок 13).

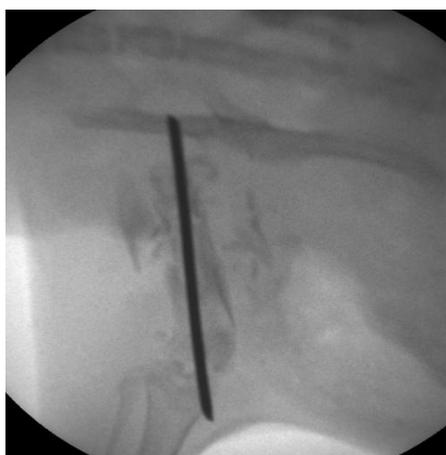


Рисунок 12 - Рентгенограмма бедра крысы опытной группы, 3 сутки

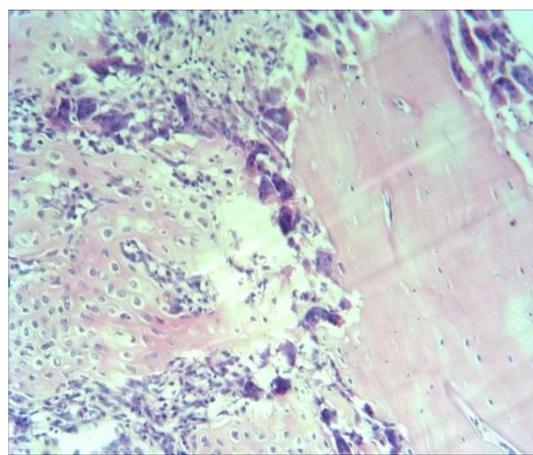


Рисунок 13 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости, 3 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 150

*Контрольная группа, 7 сутки.* В интермедиарной зоне перелома на фоне развитой грануляционной ткани заметна пролиферация клеток мезенхимального происхождения, абсолютная численная плотность (АЧП) которых равна  $195,0 \pm 13,0$  на поле зрения. В небольшом количестве появляется волокнистый матрикс, в котором относительная объёмная плотность (ООП) коллагена I типа составляет  $4,83 \pm 1,02\%$  (рисунок 14), также отмечаются группы остеогенных клеток (АЧП остеобластов  $33,0 \pm 5,0$ /п.з.).

*Опытная группа, 7 сутки.* Начинает формироваться интермедиарная костная мозоль, состоящая из хряща, клеточный состав которого представлен небольшим числом хондроцитов (АЧП =  $25,0 \pm 3,0$ /п.з.). Центральные отделы интермедиарной зоны содержат редуцирующуюся грануляционную ткань с обилием волокнистого матрикса (рисунок 15) и пролиферирующих остеобластов. ООП коллагена I типа составляет  $7,23 \pm 1,02\%$ , АЧП остеобластов составляет  $173,0 \pm 17,0$ /п.з.

На 14 сутки различия между двумя группами становятся ещё более заметными. *Контрольная группа, 14 сутки.* На рентгенограммах крыс контрольной группы по-прежнему признаков костной мозоли не видно (рисунок 16). В интермедиарной зоне перелома у животных контрольной группы на фоне

остатков редуцирующейся грануляционной ткани только появляется волокнистый матрикс (ООП коллагена I типа составляет  $9,24 \pm 2,14\%$ ) с группами пролиферирующих остеобластов, АЧП которых равно  $93,0 \pm 8,0/\text{п.з.}$  (рисунок 17). Остеокласты (АЧП =  $3,0 \pm 1,0/\text{п.з.}$ ) активно участвуют в резорбции костных отломков.

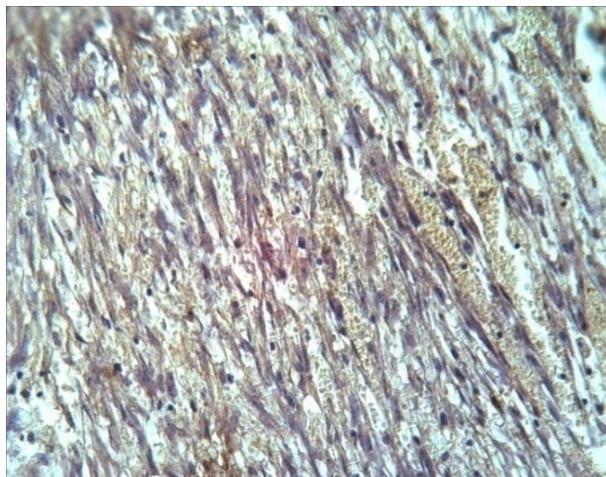


Рисунок 14 - Крыса. Контрольная группа, 7 сутки.  
Иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии коллагена I типа. Ув.300

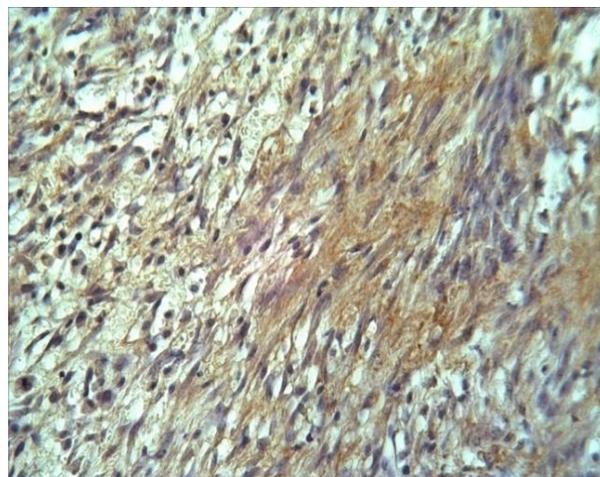


Рисунок 15 - Крыса. Опытная группа. 7 сутки.  
Иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии коллагена I типа. Ув.300

В опытной группе на 14 сутки можно наблюдать признаки формирующейся костной мозоли (рисунок 18). Интермедиарная костная мозоль представлена остатками деградирующего хряща и очагами формирования пластинчатой кости, состоящими преимущественно из остеобластов (АЧП =  $108,0 \pm 9,0/\text{п.з.}$ ), а также значительного числа остеоцитов (АЧП =  $91,0 \pm 6,0/\text{п.з.}$ ) и незрелого внеклеточного остеидного матрикса. При этом центральный отдел интермедиарной мозоли представлен небольшим участком волокнистого матрикса, ООП коллагена I типа в котором составляет  $15,61 \pm 2,89\%$ , с группами пролиферирующих остеобластов (рисунок 19).

На 21 сутки в контрольной группе интермедиарная костная мозоль по-прежнему представлена очагами редуцирующейся грануляционной ткани и широкими участками волокнистого матрикса (ООП коллагена I типа составляет  $11,25 \pm 2,12\%$ ) с группами пролиферирующих остеогенных клеток (АЧП =  $27,0 \pm 4,0/\text{п.з.}$ ).

У животных опытной группы на этом сроке вся площадь (периферические и центральные отделы) интермедиарной костной мозоли представлена остатками деградирующего хряща и очагами формирования ретикулофиброзной кости. Последняя состоит преимущественно из остеобластов (АЧП =  $155,0 \pm 12,0/\text{п.з.}$ ) и незрелого внеклеточного остеидного матрикса (ООП коллагена I типа =  $20,7 \pm 3,71\%$ ).



Рисунок 16 - Рентгенограмма бедра крысы контрольной группы, 14 суток

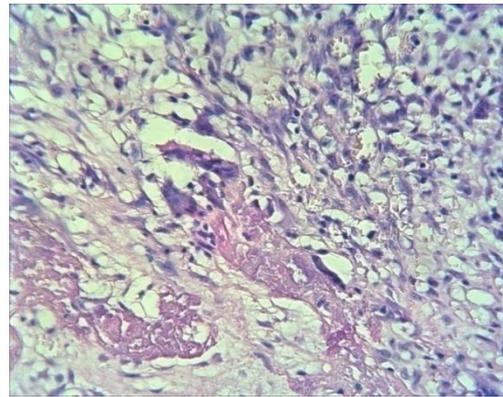


Рисунок 17 - Крыса. Контрольная группа, 14 суток. Гематоксилин-эозин. Ув.300. АЧП остеобластов –  $93,0 \pm 8,0$ /п.з.

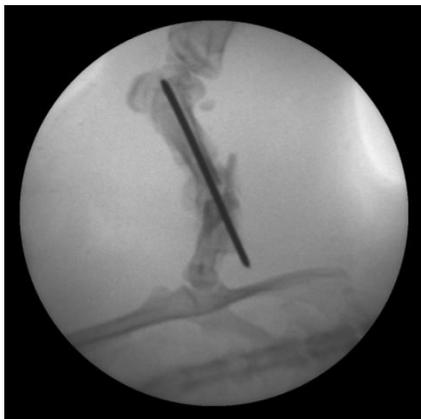


Рисунок 18 - Рентгенограмма бедра крысы опытной группы, 14 суток

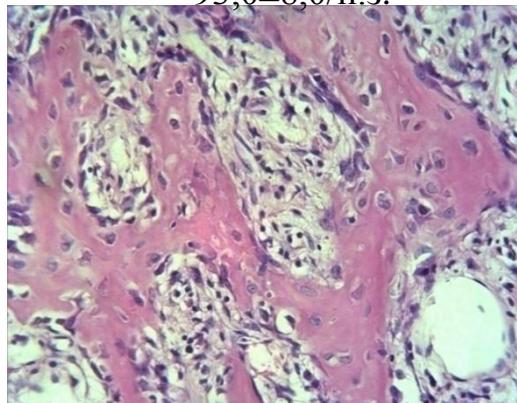


Рисунок 19 - Крыса. Опытная группа. 14 суток. Гематоксилин-эозин. Ув.300. АЧП остеоцитов –  $91,0 \pm 6,0$ /п.з.

Только на 28 суток в контрольной группе на рентгенограммах становятся видны признаки костной мозоли (рисунок 20). На рентгенограммах опытной группы в этом же сроке четко прослеживается костная мозоль (рисунок 21).

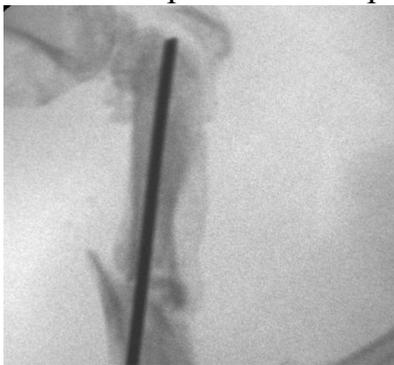


Рисунок 20 - Рентгенограмма бедра крысы контрольной группы, 28 суток



Рисунок 21 - Рентгенограмма бедра крысы опытной группы, 28 суток

На 44 суток у крыс контрольной группы интермедиарная костная мозоль состоит из небольших очагов деградирующего хряща (АЧП хондробластов и хондроцитов составляет  $40,0 \pm 5,0$ /п.з.) и формирующихся балок

ретикулофиброзной кости. Они, в свою очередь, состоят из остеобластов (АЧП=85,0±8,0/п.з.) и остеоцитов (АЧП = 105,0±11,0/п.з.), замурованных в остеоидный матрикс, с ООП коллагена I типа равной 21,23±4,13% (рисунок 22).

На 44 сутки в опытной группе намечается ремоделирование интермедиарной костной мозоли в диафиз трубчатой кости. Из балок пластинчатой кости, хаотично расположенных на более ранних сроках, начинают формироваться компактное и губчатое вещество. В составе компактного вещества присутствует небольшое количество костномозговых полостей. Экспрессия коллагена I типа (ООП 42,43±2,21%) на этом сроке возрастает на четверть (рисунок 23).

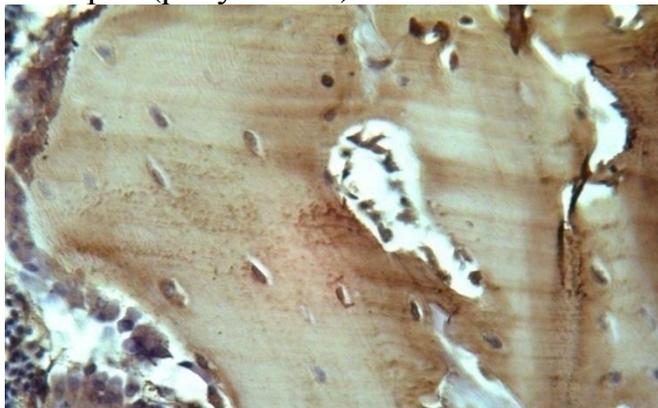


Рисунок 22 - Крыса. Контрольная группа, 44 сутки.

Иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии коллагена I типа. Ув.500

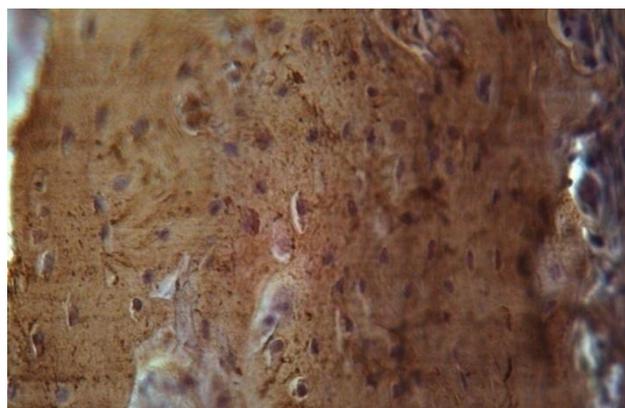


Рисунок 23 - Крыса. Опытная группа. 44 сутки.

Иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии коллагена I типа. Ув.500

Контрольная группа, 61 сутки. На рентгенограммах заметна консолидация перелома (рисунок 24). Интермедиарная костная мозоль представлена разросшейся ретикулофиброзной костной тканью. В некоторых местах ещё сохраняются мелкие очаги деградирующего гиалинового хряща (АЧП хондроцитов составляет 14,0±3,0/п.з.), рисунок 25. Периостальная костная мозоль, сохранившись небольшим участком на границе с интермедиарной костной мозолью, на остальном протяжении преобразована в надкостницу.



Рисунок 24 - Рентгенограмма бедра крысы контрольной группы, 61 сутки

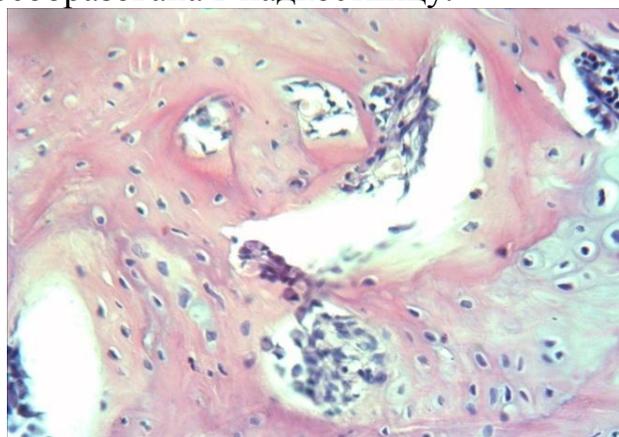


Рисунок 25 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости, 61 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 300

На 61 сутки у животных опытной группы наблюдается полная консолидация перелома (рисунок 26). При гистологическом исследовании консолидация подтверждается полноценной перестройкой костной мозоли в диафиз трубчатой кости с органотипичным строением периоста, компактного вещества и эндоста (рисунок 27).



Рисунок 26 - Рентгенограмма бедра крысы опытной группы, 61 сутки

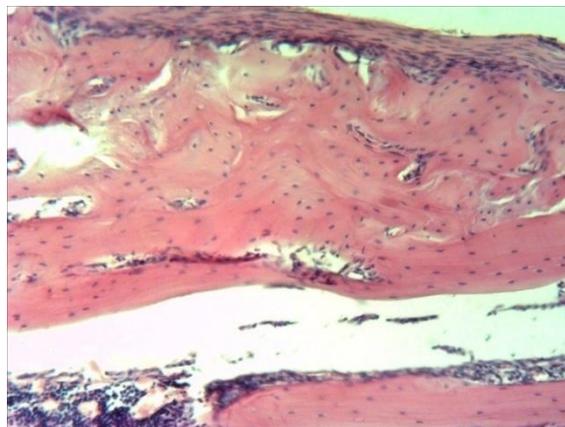


Рисунок 27 - Крыса. Опытная группа. Область консолидированного перелома бедренной кости, 61 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 150

Сравнительные данные о содержании коллагена I типа в области интермедиарной костной мозоли приведены в таблице 11.

Таблица 11- Относительная объёмная плотность коллагена I типа

Сутки после операции	Контрольная группа	Опытная группа	Увеличение содержания коллагена в опытной группе по отношению к контрольной, %	p
7-е сутки	4,83±1,02	7,23±1,02	49,7%	p≤0,05
14 сутки	9,24±2,14	15,61±2,89	68,9%	p≤0,05
21 сутки	11,25±2,12	20,7±3,71	84,0%	p≤0,05
28 сутки	16,23±2,21	29,85±4,01	83,9%	p≤0,05
44 сутки	21,23±4,13	42,43±2,21	99,9%	p≤0,05

На всех сроках наблюдается достоверное различие в относительном содержании коллагена, p≤0,05.

Сравнительные данные о численности остеобластов и остеоцитов в области костной мозоли представлены в таблице 12.

Таким образом, обнаружено, что применение метаболитов *Bacillus subtilis* 804 лимитирует выраженность воспалительного процесса, сокращает фазу ранних посттравматических изменений. Это не противоречит данным Н. Ahn и соавт., которые в 2016 году опубликовали сведения о том, что продукты бактерий *Bacillus subtilis* подавляют активацию NLRP3, NLRP4 и AIM2 белков. Последние

участвуют в образовании провоспалительных интерлейкинов. Следует упомянуть о работах Е.В.Праздновой и соавт. (опубликовано в издании *Lett.Appl.Microbiol.*, 2015), которые установили, что ферменты некоторых штаммов *Bacillus subtilis* обладают ДНК-протективными и антиоксидантными свойствами.

Таблица 12 - Абсолютная численная плотность остеобластов и остеоцитов в области костной мозоли (интермедиарная часть) на различных сроках наблюдения

Сутки после операции	АЧП остеобластов, кл/п.зр.			АЧП остеоцитов, кл/п.зр.		
	Контрольная группа	Опытная группа	p	Контрольная группа	Опытная группа	p
3-и сутки	10,0±3,0	66,0±5,0	p≤0,05	-	8,0±3,0	p≤0,05
7-е сутки	33,0±5,0	173,0±17,0	p≤0,05	5,0±2,0	37,0±5,0	p≤0,05
14 сутки	93,0±8,0	108,0±9,0	p≤0,05	7,0±2,0	91,0±6,0	p≤0,05
21 сутки	120±11,0	155,0±12,0	p≤0,05	20,0±4,0	82,0±5,0	p≤0,05
28 сутки	91±6,0	66,0±5,0	p≤0,05	42,0±3,0	108,0±4,0	p≤0,05
44 сутки	85,0±8,0	84,0±7,0	p>0,1	105,0±11,0	76,0±8,0	p≤0,05
61 сутки	73±4,0	25±3,0	p≤0,05	115,0±9,0	80,0±7,0	p≤0,05

В обеих сравниваемых группах сращение отломков кости проходит хрящевую стадию, но в опытной группе, наряду с формированием более массивной хрящевой манжетки уже к 3-м суткам, наблюдается и ранняя резорбцию хряща - на 14 сутки. Благодаря своевременной и надежной фиксации отломков периостальной мозолью в опытной группе интермедиарная мозоль начинает формироваться на 7 сутки (в контрольной группе – на 14 сутки). У животных опытной группы уже на 3 сутки наблюдается значительная активация неоангиогенеза (АЧП эндотелиоцитов 25,0±3,0/п.з., в контрольной группе данный показатель равен 7,0±2,0/п.з.). Это обеспечивает не только более ранние сроки образования костной мозоли, но и преобладание остеобластического типа дивергентной дифференцировки в междифферонной гетероморфии за счет создания лучших условий оксигенации по сравнению с контролем.

На ранних сроках (3 и 7 сутки после перелома) наблюдалась значительная разница между опытной и контрольной группами в содержании остеобластов и остеоцитов. Мы считаем, что резкое увеличение численности остеогенных клеток в опытной группе (в пять и более раз по сравнению с группой контроля) свидетельствует о стимуляции процессов репарации кости под воздействием метаболитов *Bacillus subtilis* 804. Выявленная закономерность согласуется с данными М. Bakhshayesh и соавт. (2012) о том, что фактор роста фибробластов приводит к значительному повышению миграции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и периферической крови в область повреждения. В экспериментах *in vitro* (Wu W. et al., 2015) было показано стимулирующее влияние этих клеток на остеогенную пролиферацию.

Консолидация переломов бедра у животных опытной группы происходила быстрее, чем у крыс группы контроля. Так, на 61 сутки после перелома гистологическая картина костной мозоли в контрольной группе сходна с таковой,

наблюдавшейся в опытной группе на 44 сутки. То есть на сроке 61 день мы видим ускорение консолидации на 17 суток (38%) по отношению к группе контроля.

**В пятой главе** диссертации представлены результаты изучения влияния метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, на репаративный гистогенез при лечении ран с дефектом мягких тканей в эксперименте.

Восьмидесяти крысам были нанесены глубокие скальпированные раны площадью 2,25 см<sup>2</sup>. На 9 сутки струп удаляли, на 10 сутки под тиопенталовым наркозом выполнялась аутодермопластика расщеплённым кожным трансплантатом (рисунок 28). 60 крысам при проведении кожной пластики непосредственно перед укладкой трансплантата рану орошали 0,1 мл метаболитов *Bacillus subtilis* 804. Из них 20 животных получали нативный препарат (опытная группа №1), 20 – разведённый в 10 раз (опытная группа №2), и 20 – разведённый в 100 раз (опытная группа №3). 20 животным контрольной группы рану орошали 1 мл физиологического раствора.



Рисунок 28 - Крыса. Вид раны непосредственно после укладки трансплантата

*В течение первых суток* после операции все крысы обеих групп были вялыми, потребление корма и воды было снижено. Различий в поведении крыс опытных и контрольной групп не было. При дальнейших клинических наблюдениях выявлено, что в группах, где применялся нативный и разведённый в 10 раз препарат, у всех животных произошло приживание трансплантата. При орошении раны разведённым в 100 раз препаратом гибель трансплантатов наблюдалась у трёх животных (15%).

В контрольной группе некроз свободных кожных лоскутов произошёл у семи крыс (35%). Мы можем сделать вывод, что использование метаболитов *Bacillus subtilis* 804, как нативных, так и в разведении до 10 раз, достоверно улучшало приживание кожных лоскутов ( $p < 0,005$ ).

Донорские раны орошались теми же веществами, что и операционные раны. Динамика размеров «донорских» ран дана в таблице 11.

*В контрольной группе на 7 сутки* после пластики в процессе приживания кожного лоскута на месте глубоких гранулирующих раневых дефектов кожи выражены дистрофические изменения эпидермиса, клеток фибробластического дифферона и межклеточного вещества дермы пересаженного участка кожи. В эпителии наблюдается гидропическая дистрофия, в дерме отёк и выраженная лейкоцитарная инфильтрация, проникающая из подлежащего ложа в эпидермис и собственные дериваты трансплантата (рисунок 29). Трансплантат с подлежащим ложем связан рыхлой прослойкой незрелой грануляционной ткани. В последней увеличено число эозинофилов. Краевая эпителизация от трансплантата отсутствует. Пересаженный лоскут кожи окружён грануляционной тканью с признаками выраженной полиморфноядерной инфильтрации.

Таблица 13 - Средние размеры «донорских» ран, см<sup>2</sup>

Сутки после взятия трансплантатов	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Контрольная группа 4
Первые сутки	2,26± 0,191 n=20	2,26± 0,207 n=20	2,34± 0,152 n=20	2,24± 0,189 n=20
Третьи сутки	1,87± 0,243 n=20	1,92± 0,108 n=20	2,20± 0,113 n=20	2,27± 0,138 n=20
Седьмые сутки	0,76± 0,098 n=20 p (1 и3) ≤0,05	0,77± 0,084 n=20 p (2 и3) ≤0,05	1,25± 0,080 n=20	1,48± 0,131 n=20
Десятые сутки	0,30± 0,063 n=15 p (1 и3) ≤0,05	0,31± 0,053 n=15 p (2 и3) ≤0,05	0,78± 0,062 n=15	1,07± 0,069 n=15
Двенадцатые сутки	Все раны эпителизованы n=10	Все раны эпителизованы n=10	0,34± 0,078 n=10	0,46± 0,090 n=10

В опытной группе № 3 изменения, обнаруженные при гистоморфологическом исследовании ран на 7 сутки после пластики, сходны с контрольной группой. В некоторых участках ран видны деструктивные процессы.

В опытных группах №1 и №2 на 7 сутки результаты гистологического исследования сходны между собой. Пересаженный участок кожи на всём протяжении хорошо прикреплен к подлежащему ложу, представленному редуцирующейся грануляционной тканью, с резко уменьшенным плотным фибриллярным матриксом и уже напоминающей рыхлую неоформленную соединительную ткань гиподермы, что является органотипичным для данного слоя кожи (рисунок 30). Выражена краевая эпителизация от трансплантата на зрелую грануляционную ткань, в которой наблюдается незначительная лимфомакрофагальная инфильтрация с примесью эозинофилов. Таким образом, уже на седьмые сутки в опытных группах №1 и №2 наблюдается полноценное приживание аутодермотрансплантата к подлежащему раневому ложу, из которого произошла адекватная реваскуляризация. Причём различий в степени приживания трансплантата между опытными группами №1 и №2 нет.

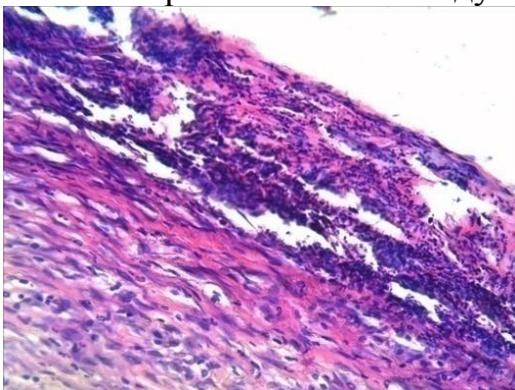


Рисунок 29 - Крыса. Контрольная группа, 7 сутки. Деструктивный процесс в ране. Гематоксилин-эозин. Ув. 300

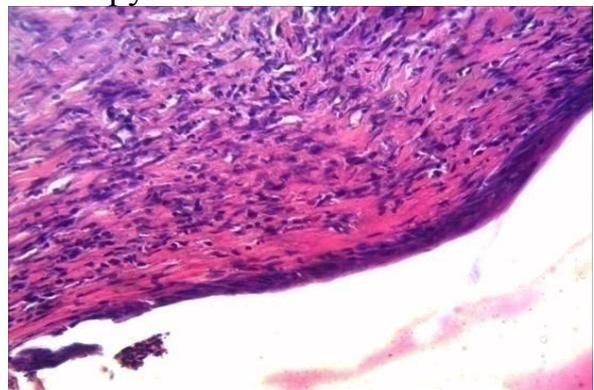


Рисунок 30 - Крыса. Опытная группа №2, 7 сутки. Трансплантат. Гематоксилин-эозин. Ув. 300

Только на 10 сутки в контрольной группе и опытной группе №3 происходило прикрепление трансплантата. При иммуногистохимическом исследовании на выявление экспрессии белка Ki-67 в пролиферирующих клетках установлено, что в краевых участках трансплантата митотическая активность клеток базального и шиповатого слоев выросла до  $45,8 \pm 0,5$  % по сравнению с участками, удаленными от этой зоны ( $18,3 \pm 0,4$ %,  $p < 0,05$ ). В почти редуцированной грануляционной ткани под трансплантатом, иногда встречаются очаги расширенных полнокровных сосудов, питающих пересаженный участок кожи.

В опытных группах №1 и №2 на 10 сутки после пластики приживление трансплантатов произошло у всех животных (рисунок 31). При гистологическом исследовании выявлено, что очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация сохранялась только в краевых отделах на границе с участками реэпителизации. В остальном строение трансплантата напоминает строение интактной кожи краёв раны. Краевая эпителизация завершена, многослойный эпидермис приобретает все функциональные слои (5-6 слоёв) и признаки поверхностной кератинизации. Это соответствует общепризнанным представлениям о нормальном строении эпидермиса кожи крыс (Шаповалов Д.А., Голуб А.П., 2008). Выражен синтез зрелого коллагена I типа, почти отсутствующий у животных контрольной группы и опытной группы №3 на этом же сроке эксперимента. В связи с завершением формирования эпителиального пласта, дифференцирующегося на все функциональные слои, показатель митотической активности краевых участков трансплантата снижается по сравнению с контролем в 1,4 раза до  $32,3 \pm 0,4$  % ( $p < 0,05$ ), и остается одинаковым по всей площади пересаженного участка кожи.

Таким образом, морфологические изменения трансплантата и подлежащего раневого ложа в контрольной группе контроля и опытной группе №3 на десятые сутки после кожной пластики напоминают изменения в пересаженном лоскуте кожи опытных групп №1 и №2 на седьмые сутки после трансплантации. Процесс созревания грануляционной ткани в окружающем трансплантат раневом дефекте даже отстаёт, несмотря на разницу в трое суток.



Рисунок 31 - Крыса. Опытная группа №1, 10 сутки

На 20 сутки у животных группы контроля и опытной группы №3, несмотря на успешное приживление трансплантата, не достигнута органотипичность пересаженного участка кожи. Из-за асинхронного течения стадий репарации в окружающих трансплантат тканях, процесс восстановления идёт по типу субституции с формированием грубой рубцовой ткани.

20 сутки, опытные группы №1 и №2. Кожный лоскут по строению и гистоархитектонике идентичен интактной коже данной области и плотно фиксирован к подлежащему ложу. Воспалительная инфильтрация отсутствует, грануляционная ткань полностью редуцирована. Встречная краевая эпителизация с трансплантата и с кожи краёв раны завершена.

Таким образом, впервые доказано, что местное однократное орошение гранулирующей раны метаболитами *Bacillus subtilis*804 при аутодермопластике улучшает приживание кожных лоскутов. Данный препарат стимулирует реваскуляризацию, клеточную пролиферацию фибробластов и эпителиоцитов кожи и восстанавливает органотипическое строение кожного покрова, при этом происходит усиление синтеза зрелого коллагена I типа и снижается активность склеротических процессов. Это подтверждает мнение ряда ученых о том, что факторы роста фибробластов являются антагонистами фиброза (Dang С.М. et al., 2003; Kong W. et al., 2008; Abe M. et al., 2012).

**В шестой главе** диссертации представлены результаты изучения доклинической безопасности метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов.

Для изучения *хронической токсичности* были выполнены эксперименты с использованием 50 крыс линии «Wistar» массой 180-200 г. и 50 мышей линии BALB/С массой 18-20 г. В ходе проведения ежедневных клинических осмотров симптомов интоксикации не выявлено. Общее состояние удовлетворительное, поведение обычное, движения координированы, судорог не отмечалось. Реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители – идентичная наблюдавшейся до эксперимента. Волосистой и кожный покров не изменялся. Потребление корма и воды обычное. Изменений в поведении, реакции тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, в потреблении корма и воды, в характере, режиме дефекации и мочеиспускания не зафиксировано.

На 112 сутки опыта было выявлено некоторое снижение концентрации триглицеридов и увеличение показателей аланинаминотрансферазы и щелочной фосфатазы в сыворотке крови животных опытной группы. Однако, спустя месяц после отмены препарата (140-е сутки эксперимента) отмечено снижение и даже исчезновение статистически достоверных различий между значениями аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и триглицеридов в опытной и контрольных группах. Это позволило сделать заключение об обратимости незначительного токсического воздействия препарата на печень опытных животных в условиях хронического эксперимента (таблицы 14, 15).

При макроскопическом исследовании внутренних органов различий между опытной и контрольными группами животных не обнаружено. Статистический анализ показателей массы внутренних органов не выявил достоверных различий между опытной и контрольными группами. При гистологическом и иммуногистохимическом исследовании на 112 сутки выявлены слабо выраженные изменения в печени, органах иммунной системы.

При изучении *печени крыс на 112 сутки в опытной группе* выявлено следующее. В гепатоцитах преобладают полиплоидные ядра, а среди центролобулярных клеток обращает на себя внимание увеличение количества

двухъядерных клеток до  $4,3 \pm 0,1\%$  по сравнению с контролем  $1,2 \pm 0,3\%$ . Повышение числа полиплоидных и двухъядерных клеток, по мнению Д.С. Саркисова (1977), является общей закономерностью функционирования популяции гепатоцитов, которая обеспечивает поддержание гомеостаза органа в условиях повышенной функциональной нагрузки. Центролобулярные клетки участвуют преимущественно в биотрансформации поступающих ксенобиотиков (Полякова В.С., 2003). У животных контрольной группы изменений в печени не выявлено.

При изучении препаратов *селезёнки крыс опытной группы* выявлено следующее. Красная пульпа полнокровная. Относительная объёмная плотность красной пульпы  $48,4 \pm 0,5\%$ . Белая пульпа гиперплазирована, как за счёт периартериолярных (Т-клеточных) зон, так и за счёт расширения светлых реактивных центров (В-клеточных) лимфатических фолликулов. Относительная объёмная плотность белой пульпы составляет  $51,6 \pm 0,3\%$ . При исследовании препаратов селезёнки животных контрольной группы отклонений от обычного строения не выявлено. Относительная объёмная плотность красной пульпы составляет  $69,8 \pm 0,6\%$ , белой пульпы –  $30,2 \pm 0,4\%$ .

Таким образом, у животных опытной группы наблюдается слабовыраженный продуктивный гепатит с компенсаторно-увеличенной регенераторной активностью гепатоцитов. Изменения в иммунологическом статусе организма этой группы животных подтверждаются гиперплазией Т- и В-клеточных зон белой пульпы селезёнки с расширением светлых реактивных центров в лимфатических фолликулах.

Слабо выраженные изменения в печени, органах иммунной системы и отсутствие изменений в других органах позволяют сделать вывод о минимальном токсическом воздействии метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, на организм подопытных крыс в условиях проведённого эксперимента.

При исследовании *печени мышей в опытной группе* признаков повреждения гепатоцитов не было. У животных обеих групп распределение богатых гликогеном клеток в пределах дольки мозаичное. Но у двух животных ( $13,3\%$ ) в условиях опыта обнаружили явления гидропической дистрофии, а также единичные оксифильные тельца Каунсельмена - запрограммированная гибель отдельных гепатоцитов. В контрольной группе, и у остальных мышей опытной группы эти тельца не выявлялись. Активизация апоптотической доминанты среди гепатоцитов в печени у данных опытных животных подтвердилась иммуногистохимическими исследованиями с использованием антител к каспазе-3. Выявленный факт может быть связан с повышением функциональной нагрузки на гепатоциты у отдельных животных в условиях длительного введения препарата. Среди клеток синусоидных капилляров в печени отдельных животных обнаруживались скопления перисинусоидальных макрофагов.

Слабо выраженные изменения в печени и отсутствие изменений в других органах позволили сделать вывод о минимальном токсическом воздействии препарата на организм подопытных мышей в условиях проведённого эксперимента.

Таблица 14 - Средние значения биохимических показателей сыворотки крови крыс при исследовании хронической токсичности

Показатели	0 день		28-е сутки		56-е сутки		84-е сутки		112-е сутки		140-е сутки	
	Опыт n=30	Контр. n=10	Опыт n=15	Контр. n=5								
АСТ, мккат/л	0,22± 0,03	0,22± 0,02	0,22± 0,02	0,23± 0,02	0,23± 0,03	0,21± 0,02	0,22± 0,02	0,23± 0,02	0,22± 0,02	0,22± 0,03	0,22± 0,02	0,22± 0,02
АЛТ, мккат/л	0,13± 0,01	0,13± 0,01	0,14± 0,01	0,14± 0,02	0,13± 0,01	0,13± 0,01	0,13± 0,01	0,14± 0,01	0,18± 0,03	0,14± 0,01	0,16± 0,02	0,13± 0,01
ЩФ, мккат/л	1,53± 0,13	1,60± 0,13	1,51± 0,14	1,53± 0,16	1,55± 0,13	1,57± 0,16	1,53± 0,15	1,50± 0,16	1,89± 0,11	1,59± 0,09	1,79± 0,26	1,66± 0,08
Креатинин, мкмоль/л	38,52± 2,26	37,71± 2,06	38,46± 2,38	36,69± 1,79	37,76± 2,25	38,29± 2,63	37,86± 2,37	38,43± 1,99	38,02± 2,31	38,39± 2,39	37,53± 2,42	38,36± 1,93
Мочевина, ммоль/л	8,04± 1,21	8,99± 1,77	8,09± 1,40	8,67± 1,17	8,56± 1,67	8,39± 1,53	8,32± 1,45	8,12± 1,63	8,55± 1,68	8,69± 1,98	8,88± 1,33	8,91± 0,97
Холестерин, ммоль/л	2,00± 0,05	2,00± 0,06	2,03± 0,05	1,98± 0,05	2,00± 0,06	1,97± 0,05	2,01± 0,06	2,00± 0,06	2,00± 0,06	2,00± 0,06	2,01± 0,06	2,01± 0,08
Триглицери- ды, ммоль/л	0,71± 0,05	0,70± 0,04	0,71± 0,04	0,69± 0,03	0,71± 0,04	0,72± 0,05	0,72± 0,04	0,72± 0,04	0,51± 0,07	0,73± 0,06	0,62± 0,14	0,71± 0,05
Билирубин, мкмоль/л	1,10± 0,23	1,12± 0,23	1,13± 0,17	1,06± 0,21	1,14± 0,21	1,16± 0,16	1,13± 0,19	1,17± 0,20	1,20± 0,22	1,14± 0,25	1,18± 0,21	1,01± 0,20
Глюкоза, ммоль/л	4,84± 0,95	5,20± 0,96	4,54± 1,01	4,84± 1,18	4,66± 0,84	4,97± 0,80	4,57± 1,05	4,36± 0,96	4,34± 1,02	4,42± 1,16	4,27± 1,15	4,59± 1,23

Таблица 15 - Биохимические показатели крови мышей при исследовании хронической токсичности

Показатели	0 день		28-е сутки		56-е сутки		84-е сутки		112-е сутки		140-е сутки	
	Опыт n=30	Контр. n=10	Опыт n=15	Контр. n=5								
АсАТ, мккат/л	94,08± 4,53	95,86± 4,78	93,05± 4,44	92,16± 4,42	94,64± 5,03	94,40± 4,22	94,77± 4,79	96,17± 4,11	93,49± 4,34	93,58± 4,89	93,88± 4,11	93,72± 4,51
АлАТ, мккат/л	16,23± 0,96	16,66± 1,15	16,26± 1,02	16,60± 0,74	16,41± 0,87	16,40± 1,04	16,17± 0,84	16,67± 0,81	18,48± 2,97	15,74± 0,88	15,84± 0,93	16,04± 0,62
ЩФ, мккат/л	96,66± 4,50	94,78± 5,24	94,86± 4,68	95,43± 5,32	96,33± 4,53	95,61± 4,83	95,58± 4,63	97,67± 3,68	94,73± 4,23	92,97± 5,02	95,81± 5,84	93,88± 5,49
Креатинин, мкмоль/л	44,25± 3,50	44,54± 3,66	43,88± 3,48	44,65± 3,72	44,22± 3,34	43,20± 2,59	43,09± 3,78	44,70± 2,92	44,56± 4,03	43,69± 3,69	43,58± 3,11	42,26± 3,25
Мочевина, ммоль/л	7,19± 0,56	7,13± 0,60	7,23± 0,58	7,15± 0,53	7,06± 0,51	6,98± 0,58	7,19± 0,59	7,08± 0,48	7,05± 0,51	7,15± 0,42	7,38± 0,52	6,49± 0,29
Холестерин, ммоль/л	3,11± 0,18	3,08± 0,19	3,06± 0,17	3,06± 0,16	3,13± 0,15	3,11± 0,12	3,12± 0,17	3,17± 0,18	3,09± 0,16	3,08± 0,18	3,05± 0,16	3,12± 0,22
Билирубин, мкмоль/л	6,45± 1,21	6,22± 1,40	6,84± 1,41	7,02± 1,68	5,97± 1,38	7,00± 1,67	6,76± 1,37	7,12± 1,32	6,41± 1,37	6,77± 1,34	6,53± 1,18	6,33± 1,27
Глюкоза, моль/л	6,52± 0,37	6,47± 0,29	6,70± 0,35	6,50± 0,37	6,69± 0,33	6,49± 0,34	6,48± 0,32	6,79± 0,35	6,54± 0,38	6,61± 0,41	6,57± 0,35	6,69± 0,29

Таким образом, при изучении хронической токсичности выявлено минимальное токсическое воздействие метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, на организм подопытных животных. Факт минимальной хронической токсичности клинического значения не имеет.

Для определения **острой токсичности** мы использовали 72 взрослых крыс линии «Wistar» массой 180-200 г и 72 взрослых мышей линии BALB/C массой 18-20 г. Гибели животных за весь период наблюдения на протяжении 15 дней не наблюдалось. Изменений в поведении, реакции тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, в потреблении корма и воды, в характере, режиме дефекации и мочеиспускания не было.

При макроскопическом исследовании внутренних органов различий между группой животных, получавших тестируемый препарат, и контрольной группой не обнаружено.

При гистологическом изучении *внутренних органов крыс* выявлены следующие изменения. В опытной группе гепатоциты обычных размеров, небольшая часть находится в состоянии гидропической дистрофии, иногда переходящей в фокальные колликвационные некрозы - разрозненные очаги баллонной дистрофии отдельных гепатоцитов. Количество двух- и многоядерных гепатоцитов у животных опытной группы сравнимо с контрольной группой, что говорит об отсутствии повышенной регенераторной активности. Картина изменений печени опытных животных в условиях эксперимента свидетельствовала о слабовыраженной воспалительной реакции. В других органах изменений не зафиксировано.

При гистологическом изучении *внутренних органов мышей* выявлены следующие изменения. В условиях опыта у мышей в печени наблюдались центролобулярные участки гидропической дистрофии гипертрофированных гепатоцитов, в периферических отделах долек гепатоциты пролиферировали. У опытной группы животных в селезёнке наблюдалась умеренно выраженная гиперплазия белой пульпы и увеличение числа мегакариобластов и мегакариоцитов по сравнению с группой контроля. Описанные выше изменения в селезёнке мышей опытной группы подтверждают изменение иммунного статуса животных в условиях проведения опыта. Отсутствие гистопатоморфологических признаков изменений сердца, почек, надпочечников, а так же незначительные изменения в селезёнке и печени позволили сделать вывод о незначительной токсичности лекарственного препарата в условиях проведения данного опыта (внутрибрюшинном введении максимального количества препарата).

Таким образом, при изучении острой токсичности метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, установлено, что при парентеральном введении в максимальной дозе метаболиты не вызывают летального и выраженного токсического эффекта.

Для изучения **анафилактогенного действия** метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, были выполнены эксперименты с использованием 15 морских свинок.

Морские свинки были разделены на три группы по 5 животных – две опытные и одна контрольная. Первой опытной группе вводилось 0,1 мл

препарата, второй – 1,0 мл препарата. Всего было сделано три инъекции. Первая инъекция была выполнена подкожно, две последующие – через день внутримышечно в область бедра. Контрольной группе были выполнены инъекции изотонического раствора натрия хлорида – по 1,0 мл. На 17 день была выполнена внутримышечная разрешающая инъекция (животным первой группы – в объёме 0,3 мл, второй группы – 3,0 мл). Контрольной группе животных вводилось 3,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида.

После разрешающей инъекции в опытных группах изменений в состоянии животных не было. В контрольной группе изменений в поведении и общем состоянии животных также не зафиксировано. Таким образом, анафилактической активности у препарата не выявлено.

Для изучения *аллергизирующего действия* мы использовали метод кожных аппликаций. Десяти морским свинкам-альбиносам наносили на выстриженный участок кожи туловища по 3 капли препарата 5 раз в неделю, сроком две недели. Реакция кожи учитывалась ежедневно. Видимых изменений кожи не выявлено. Таким образом, мы исключили возможность развития контактного дерматита. Затем выполнили 20 повторных кожных аппликаций на другой выстриженный участок кожи размером 2x2 см, в количестве трёх капель, частотой 5 раз в неделю (всего 4 недели). Реакция кожи учитывалась на 10 и 20 дни. Видимых изменений кожи также не выявлено. Таким образом, аллергизирующего действия у препарата не выявлено.

Наши данные согласуются со сведениями, опубликованными в мировой литературе. М.С. Robson и соавт. в 1992 году исследовали ФРФ в различных концентрациях и дозах на безопасность. Никакой токсичности, значительной сывороточной абсорбции и формирования антител не было обнаружено. Ye X. и соавт. (2016) опубликовали данные о том, что при подкожном введении мышам ФРФ-21 признаков острой и хронической токсичности обнаружено не было. Изменений во внутренних органах и тканях, в биохимических показателях не зафиксировано. Бактерии *Bacillus subtilis* являются сапрофитами и безвредны для человека и животных. В мире выпускается ряд лекарственных препаратов-пробиотиков на основе этих бактерий. Существуют исследования, где подтверждается безопасность различных веществ, вырабатываемых штаммами *Bacillus subtilis*. Например, Lampe B.J. и English J.C. (2016) доказали безопасность фермента «наттокиназы» для крыс при назначении этого вещества в максимальных дозах.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Проблема лечения открытых переломов конечностей сложна и многогранна. На основе анализа результатов лечения пациентов с открытыми переломами длинных трубчатых костей с учетом развития ранних и поздних осложнений, авторами выделены группы пострадавших и параметры, определяющие повышенный риск неудовлетворительных результатов лечения, что имеет существенное значение для практического здравоохранения в плане совершенствования оказания травматологической помощи пострадавшим с открытыми переломами конечностей.

Разработано экспериментальное обоснование применения метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, для лечения открытых переломов. Доказано, что использование этого вещества при кожной пластике существенно улучшает результаты лечения ран с дефектом кожи. При изучении доклинической безопасности установлено, что метаболиты *Bacillus subtilis* 804 не обладают острой и хронической токсичностью и не оказывают анафилактического и алергизирующего действия на животных. Выполненная работа является необходимым этапом разработки оригинального отечественного лекарственного препарата, содержащего фактор роста фибробластов. Полученные результаты делают возможным и целесообразным проведение клинических испытаний метаболитов *Bacillus subtilis* 804 с целью создания оригинального отечественного лекарственного препарата для лечения открытых переломов конечностей и внедрения в клиническую практику.

### ВЫВОДЫ

1. Основными проблемами, возникающими при лечении открытых переломов, являлись: в раннем периоде нагноение раны (поверхностное, в пределах подкожной клетчатки у 6,9% пациентов, глубокое – в 6,5% случаев), а в отдалённые сроки – нарушения консолидации переломов. Степень тяжести перелома прямо влияла на вероятность развития инфекционных осложнений и неблагоприятного исхода вне зависимости от способа остеосинтеза. Общая частота неудовлетворительных исходов в отдалённом периоде – 17,5%. Нарушения консолидации составили 10,5%.

2. Выявлены закономерности воздействия метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, на заживление открытых переломов. Метаболиты *Bacillus subtilis* 804 при двукратном введении в зону перелома оптимизируют течение воспалительного процесса, приводят к значительной активации неоангиогенеза в области костной мозоли. На 3 сутки после операции абсолютная численная плотность (АЧП) эндотелиоцитов в опытной группе составляет  $42,0 \pm 6,0$ /поле зрения (п.з.), в контрольной группе данный показатель равен  $7,0 \pm 2,0$ /п.з.

3. В первые 14 суток после перелома у животных, получавших метаболиты *Bacillus subtilis* 804, наблюдается резкое увеличение численности остеобластов (в пять раз на 3 и 7 сутки) и остеоцитов (в 11 раз на 14 сутки) по сравнению с группой контроля. На всех сроках наблюдается увеличение относительной объёмной плотности коллагена I типа в опытной группе по сравнению с контрольной (на 49,7-99,9%).

4. При использовании метаболитов *Bacillus subtilis* 804 происходит более раннее формирование периостальной костной мозоли, что приводит к своевременной и надёжной фиксации отломков в первые две недели после перелома. У животных, получавших метаболиты *Bacillus subtilis* 804, происходит более быстрая резорбция хряща и замещение его костной тканью - на 14 сутки. В контрольной группе хрящевая мозоль полностью деградирует только к 21 суткам после перелома.

5. Консолидация перелома диафиза бедренной кости при использовании метаболитов *Bacillus subtilis* 804 происходит быстрее, чем в контрольной группе. На 61 сутки после перелома гистологическая и рентгенологическая картина костной мозоли в контрольной группе сходна с таковой, наблюдавшейся в опытной группе на 44 сутки. На сроке 61 день после перелома ускорение консолидации составляет в среднем 17 суток (38%) по отношению к группе контроля.

6. Доказано, что местное однократное применение метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, улучшает результаты кожной пластики при лечении ран с дефектом мягких тканей. При использовании как нативных, так и разведённых в 10 раз метаболитов *Bacillus subtilis* 804 у всех животных произошло приживание трансплантатов и эпителизация ран. В контрольной группе некроз аутотрансплантатов наблюдался в 35 % случаев.

7. Установлено, что метаболиты *Bacillus subtilis* 804, содержащие фактор роста фибробластов, при парентеральном введении в максимальной дозе не вызывают летального и острого токсического эффекта. При изучении хронической токсичности выявлено минимальное токсическое воздействие метаболитов *Bacillus subtilis* 804 на организм подопытных животных. Установлено, что исследуемые метаболиты не оказывают аллергизирующего и анафилактического действия.

8. Полученные результаты делают целесообразным и необходимым проведение клинических испытаний метаболитов *Bacillus subtilis* 804 с целью создания оригинального отечественного лекарственного препарата для лечения открытых переломов конечностей.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. При определении тактики лечения пациентов с открытыми переломами костей конечностей необходимо учитывать факторы риска развития нарушений консолидации, а именно высокоэнергетичный механизм травмы, переломы двух и более сегментов, наличие сопутствующей патологии, тяжесть открытого перелома (III тип по классификации R.V. Gustilo и J.T. Anderson).

2. В случае выявления подобных факторов риска необходимо более тщательно контролировать процесс сращения костей: принимать меры для улучшения микроциркуляции в повреждённых тканях, добиваться компенсации сопутствующих заболеваний, выполнять контрольные рентгенограммы с большей частотой, чем описано в клинических рекомендациях.

3. При открытых переломах с дефектом мягких тканей следует применять раннее закрытие дефекта, в том числе с использованием пластических методик, а при необходимости – шире применять повторную хирургическую обработку.

4. При лечении открытых переломов конечностей необходимо как можно раньше стабилизировать отломки. При переломах I-II типа по R.V. Gustilo и J.T. Anderson предпочтителен первичный внутренний остеосинтез, а при переломах III типа – остеосинтез аппаратами внешней фиксации.

5. При переломах III типа по R.V. Gustilo и J.T. Anderson необходимо шире использовать этапный остеосинтез, который заключается в замене аппарата

внешней фиксации на внутренний фиксатор на сроках от 5 до 12 суток после травмы.

6. При выполнении профилактики инфекционных осложнений целесообразно использовать сочетание антимикробных препаратов с антибиотиками, а именно периоперационное применение антибиотиков с последующим назначением пробиотиков на основе *Bacillus subtilis*.

#### **СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Никитенко, В.И. Новые технологии в лечении ожогов и обширных дефектов мягких тканей / В.И.Никитенко, А.М. Гурьянов, С.А.Павловичев, В.В.Захаров, В.А. Копылов, И.Е. Никитенко // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2010. - № 1. - С. 84-85.
2. Копылов, В.А. Применение фактора роста фибробластов человека в медицине / В.А.Копылов, И.Е.Никитенко // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2010. - № 4. - С. 95.
3. Копылов, В.А. Использование метаболитов бактерий *Bacillus subtilis* 804 при аутодермопластике ожоговых ран / В.А. Копылов, И.Е. Никитенко, А.М. Гурьянов // Вестник ОГУ. - 2011- № 16 (декабрь). - С. 289-291.
4. Миханов, В.А. Влияние метаболита культуры *Bacillus subtilis* 804 на процессы заживления ран при проведении аутодермопластики / В.А.Миханов, В.С.Полякова, В.А. Копылов // Морфология. – 2011. – Том 140, №5. - С. 100-101.
5. Миханов, В.А. Экспериментально - гистологическое обоснование применения препарата на основе метаболитов *Bacillus subtilis* 804 для оптимизации заживления глубоких ран кожи / В.А.Миханов, В.С.Полякова, В.А. Копылов // Морфология. – 2011. – Том 140, №5. - С. 107-108.
6. Никитенко, В.И. Факторы роста в травматологии и хирургии / В.И.Никитенко, С.А.Павловичев, А.А.Сафронов, В.А.Копылов, И.Е.Никитенко // Травматология және ортопедия. – 2011 - №2(20). – С.357 (Казахстан).
7. Nikitenko, V.I. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract in healthy and injured rats / V.I.Nikitenko, A.A.Stadnikov, V.A.Kopylov // Journal of wound care/ 2011. - V.20, No3. - P.114-121.
8. Копылов, В.А. Лечение дефектов кожи с помощью нового препарата на основе фактора роста фибробластов / В.А. Копылов, И.Е. Никитенко // Актуальные вопросы медицинской науки: Сборник научных работ молодых ученых Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», посвященной 70-летию профессора А.А. Чумакова. – 2012. – Ярославль: ООО «Издательско-полиграфический комплекс «Индиго». -С. 181.
9. Миханов, В.А. Особенности репаративного гистогенеза при заживлении глубоких скальпированных ран кожи под действием препарата «Винфар»/ В.А. Миханов, В.С. Полякова, В.А.Копылов // Морфологические ведомости. – 2012. - №2. – С. 105-109.

10. Копылов, В.А. Использование препарата «Винфар» на основе фактора роста фибробластов при аутодермопластике / В.А.Копылов, И.Е.Никитенко, В.А. Миханов, В.С. Полякова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012. - №6. – С.9-12.
11. Никитенко, В.И. Использование факторов роста фибробластов для лечения ран и ожогов / В.И. Никитенко, С.А.Павловичев, В.С.Полякова, В.А.Копылов, С.Н.Гнедой, В.А.Миханов, И.Е.Никитенко // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. - 2012. - № 12. - С. 72-76.
12. Миханов, В.А. Особенности приживления аутодермотрансплантатов на негранулирующие глубокие послеожоговые раны кожи под действием препарата «Винфар» / В.А. Миханов, В.А. Копылов, В.С. Полякова, Р.А. Абземелева // Морфологические ведомости. – 2013. - №2. -С. 55-59.
13. Копылов, В.А. Лечение дефектов кожи с помощью препарата «Винфар» на основе нового фактора роста фибробластов / В.А.Копылов, В.И.Никитенко, В.А.Миханов // В мире научных открытий. – 2013. - №11,12. – С. 90-108.
14. Копылов, В.А. Аутодермопластика с использованием препарата «Винфар» на основе нового фактора роста фибробластов / В.А.Копылов, В.И.Никитенко, В.А.Миханов // Хирург. - 2014. – № 1.– С. 50-56.
15. Копылов, В.А. Лечение открытых переломов с использованием препарата «Винфар» на основе нового фактора роста фибробластов / В.А. Копылов, В.А. Миханов, В.С. Полякова, А.А.Сафронов, В.В.Захаров // Актуальные проблемы и достижения в медицине: Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. – 2015. – С.171-175.
16. Миханов, В.А. Экспериментальное исследование репаративного остеогенеза у крыс при использовании препарата «Винфар» / В.А.Миханов, В.С.Полякова, В.А.Копылов, Е.И.Шурыгина // Морфологические науки и клиническая медицина, материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2015. - С.101-104.
17. Миханов, В.А. Репаративный гистогенез костной ткани в условиях открытого перелома диафиза длинной трубчатой кости у крыс при использовании препарата «Винфар» / В.А.Миханов, В.С.Полякова, В.А.Копылов, Е.Е.Мхитарян, К.Н.Мещеряков, Н.Р.Бакаева, Е.И.Шурыгина // Современные проблемы науки и образования. – 2015. - №3. (электронный журнал).
18. Пат. 2431203 РФ Способ аутодермопластики в эксперименте / Никитенко В.И., Копылов В.А., Никитенко И.Е., Гнедой С.Н.; заявл. 15.03.2010 г; опубл. 10.10.2011 г., Бюл. № 28.
19. Копылов, В.А. Экспериментальная разработка нового препарата, содержащего фактор роста фибробластов, для лечения открытых переломов / В.А. Копылов, А.А. Сафронов // Кафедра травматологии и ортопедии. – 2016. - №1(17). – С.5-9.
20. Копылов, В.А. Лечение открытых переломов с помощью метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов /

**В.А.Копылов, В.А.Миханов, А.А. Сафронов // Гений ортопедии. – 2016. - №2. – С.78-83.**

- 21.Копылов, В.А. Влияние препарата, содержащего фактор роста фибробластов, на репаративный остеогенез в эксперименте / В.А. Копылов, А.А. Сафронов // Врач-аспирант. – 2016. - №5(78). – С.78-86.**
- 22. Пат. 2606257 РФ Средство для стимуляции репаративного остеогенеза / Копылов В.А., Миханов В.А., Сафронов А.А., Полякова В.С.; заявл. 22.06.2015; опубл. 10.01.2017, Бюл. №1.**

#### **Информационно-методические письма.**

1. Копылов, В.А. Современные аспекты лечения открытых переломов длинных трубчатых костей конечностей (информационно-методическое письмо для врачей) / В.А.Копылов // Оренбург. - 2016. – 33с.