

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Научный консультант:  
доктор медицинских наук профессор  
А.А.Сафронов

Оренбург - 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
Глава 1. ВОЗДЕЙСТВИЕ НА РЕПАРАТИВНЫЙ ГИСТОГЕНЕЗ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОТКРЫТЫХ ПЕРЕЛОМОВ КОНЕЧНОСТЕЙ – СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ.....	15
1.1. Общие статистические данные.....	15
1.2. Классификация открытых переломов.....	16
1.3. Тактика лечения открытых переломов костей конечностей.....	18
1.3.1. Проблемы, связанные с микробной контаминацией раны и применением антибиотиков.....	19
1.3.2. Хирургическая обработка раны.....	21
1.3.3. Устранение дефектов мягких тканей.....	25
1.3.4. Устранение дефектов костей и остеосинтез.....	28
1.4. Проблема стимуляции репаративного гистогенеза при открытых переломах.....	33
1.5. Доклиническое исследование безопасности фармакологических веществ.....	43
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	47
2.1. Характеристика пациентов с открытыми переломами костей конечностей.....	47
2.2. Методика получения и описание метаболитов <i>Bacillus subtilis</i> 804, содержащих фактор роста фибробластов .....	52
2.3. Материалы и методы исследования влияния метаболитов <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> 804, содержащих фактор роста фибробластов, на репаративный остеогенез.....	53
2.4. Материалы и методы исследования влияния метаболитов <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> 804 на репаративный гистогенез при лечении ран с дефектом мягких тканей.....	55

2.5. Исследование острой токсичности метаболитов <i>Bacillus subtilis</i> 804, содержащих фактор роста фибробластов.....	56
2.6. Исследование хронической токсичности метаболитов <i>Bacillus subtilis</i> 804, содержащих фактор роста фибробластов.....	59
2.7. Оценка анафилактогенной активности метаболитов <i>Bacillus subtilis</i> 804, содержащих фактор роста фибробластов.....	62
2.8. Выявление аллергизирующего действия метаболитов <i>Bacillus subtilis</i> 804, содержащих фактор роста фибробластов.....	62
2.9. Материалы и методы гематологических, биохимических и морфологических исследований .....	63
2.10. Методики статистической обработки данных.....	65
Глава 3. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ОТКРЫТЫМИ ПЕРЕЛОМАМИ КОСТЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ.....	66
Глава 4. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТАБОЛИТОВ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> 804, СОДЕРЖАЩИХ ФАКТОР РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ, НА РЕПАРАТИВНЫЙ ОСТЕОГЕНЕЗ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОТКРЫТЫХ ПЕРЕЛОМОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ.....	83
Глава 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТАБОЛИТОВ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> 804, СОДЕРЖАЩИХ ФАКТОР РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ НА РЕПАРАТИВНЫЙ ГИСТОГЕНЕЗ ПРИ ЛЕЧЕНИИ РАН С ДЕФЕКТОМ МЯГКИХ ТКАНЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ.....	116
Глава 6. ИЗУЧЕНИЕ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ МЕТАБОЛИТОВ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> 804, СОДЕРЖАЩИХ ФАКТОР РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ.....	140
6.1. Изучение хронической токсичности метаболитов <i>Bacillus subtilis</i> 804, содержащих фактор роста фибробластов .....	140
6.1.1. Изучение хронической токсичности в эксперименте на крысах...	140
6.1.2. Результаты исследования хронической токсичности на мышах...	156

6.2. Результаты исследования острой токсичности метаболитов <i>Bacillus subtilis</i> 804, содержащих фактор роста фибробластов.....	170
6.3. Оценка анафилактогенного действия.....	185
6.4. Оценка алергизирующего действия.....	186
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	187
ВЫВОДЫ.....	211
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	213
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	214
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	215



## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования и степень её разработанности**

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).

Согласно данным, приведённым в 11 издании Campbell's operative orthopaedics (2007), открытые переломы длинных костей конечностей встречаются у 21,4— 48,9% пострадавших с травмами. При этом в структуре открытых переломов преобладают переломы костей голени (от 54,7 до 78%). Несколько реже возникают переломы бедренной кости (11,8-16,1%), плечевой кости (8,2-10,7%) и костей предплечья (9,8-12,2%) (Levin L.S., 2007).

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 (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 (до 74,5%) (Attinger C.E. 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 определен ряд способов воздействия и выявлены факторы влияния на разные звенья репаративной регенерации.

Существуют работы по изучению возможностей использования физических факторов для стимуляции репаративной регенерации. 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). Много учёных в последние годы занимаются изучением влияния препаратов костного мозга на репаративную регенерацию кости. 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, эти перспективные методы либо находятся в стадии изучения, либо их применение в клинической практике ограничено из-за технической сложности.

Для формирования костной мозоли при переломах играют роль различные факторы роста (тромбоцитарный, эпидермальный, фибробластический, инсулиноподобный) (Fan L. et al., 2014). Одним из наиболее изученных ростовых факторов является группа факторов роста фибробластов. 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). Факторы роста фибробластов человека продуцируются кератиноцитами, фибробластами, хондроцитами, эндотелиальными, гладкомышечными и тучными клетками (Ceccarelli S. et al., 2007). Во взрослом организме ФРФ являются гомеостатическими факторами и участвуют в восстановлении тканей, а также реагируют на повреждения. ФРФ являются одними из наиболее важных проангиогенных медиаторов, участвующих в заживлении ран (Takayama M. et al., 2010). ФРФ обладают цитопротективным эффектом, приводя к быстрому ограничению цитолиза (Шурыгин М.Г. и др., 2008).

За последние десятилетия выявлено, что экзогенный ФРФ может стимулировать заживление ран косвенно, 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; Hu 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 препарат, содержащий метаболиты *Bacillus subtilis* 804, который получил название «Винфар». Нашу уверенность в необходимости выполнения данной научной работы укрепил тот факт, что технология получения данного 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»;

- получено положительное решение о выдаче патента РФ на изобретение «Средство для стимуляции репаративного остеогенеза», заявка 2015124295/15(037922) от 22.06.2015.

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

Результаты анализа клинических данных 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. 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 аллергизирующего 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.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

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.

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 диссертации**

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

### **Объем и структура работы**

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.

\* \* \*

Автор посвящает данную работу памяти профессора Вячеслава Ивановича Никитенко, идеи и разработки которого сделали возможным выполнение научного исследования. Выполнение данной работы начиналось с помощью научных консультаций В.И.Никитенко.

Автор приносит глубокую благодарность коллективу кафедры травматологии и ортопедии Оренбургского государственного медицинского университета за товарищескую поддержку при выполнении настоящей работы. Обработка результатов исследования, представленных в главах 4, 5, 6, осуществлена при содействии д.м.н. профессора Валентины Сергеевны Поляковой. Автор искренне признателен сотрудникам кафедры патологической анатомии – доценту Василию Александровичу Миханову, лаборантам, коллективу вивария ОрГМУ за помощь в выполнении экспериментальной части работы. Автор благодарит профессора Александра Абрамовича Стадникова за содействие и поддержку при создании диссертации.

# Глава 1. ВОЗДЕЙСТВИЕ НА РЕПАРАТИВНЫЙ ГИСТОГЕНЕЗ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОТКРЫТЫХ ПЕРЕЛОМОВ КОНЕЧНОСТЕЙ – СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

## 1.1. Общие статистические данные

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).

Согласно данным, приведённым в 11 издании Campbell's operative orthopaedics (2007), открытые переломы длинных костей конечностей встречаются у 21,4— 48,9% пострадавших с травмами. При этом в структуре открытых переломов преобладают переломы костей голени (от 54,7 до 78%). Несколько реже возникают переломы бедренной кости (11,8-16,1%), плечевой кости (8,2-10,7%) и костей предплечья (9,8-12,2%) (Levin L.S., 2007).

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).

В наше время повысилась частота околоуставных и внутрисуставных переломов длинных костей конечностей (до 43%), при этом доля открытых повреждений данной локализации достигает 10% (Резник Л.Б., Здебский И.П., 2009; Zalavras C.G. et al., 2005). Так у 21,7-52,6% пациентов отмечаются открытые переломы длинных костей, образующих коленный сустав (Cross III W.W., Swiontkowski M.F., 2008).

Открытые переломы в 61% случаев сопровождаются дефектами костей, в 11% - повреждениями сосудов и нервов, в 57% - обширными ранами мягких тканей, причем у 84% таких пациентов имеется несоответствие размеров внешней

раны и степени внутренних повреждений мягкотканых структур конечностей (Агаджанян В.В., 2006). Вместе с этим возникают гнойно-инфекционные осложнения, приводящие к дефектам кожи и, в дальнейшем, к несращению костей, а также первичному выходу на инвалидность (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 (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 (до 74,5%) (Attinger С.Е. et al., 2006; Levin L.S., 2007).

Анализ литературы показывает неблагополучие во многих аспектах тактики хирургического лечения открытых переломов. Основные «болевые» точки - отсутствие четких стандартов и рекомендаций по использованию различных методов костной фиксации, ведению ран с применением новых технологий и способов реконструкции дефектов мягких тканей (Гордиенко Д.И., 2013). Разработка способов и методов для стимуляции репаративного гистогенеза при открытых переломах, или поддержания нормального, «биологического» его уровня находится в начальной стадии.

## **1.2. Классификация открытых переломов**

Первая классификация открытых повреждений костей конечностей была разработана Р. Лесене в 1929 году во Франции. Российские авторы до недавнего времени наиболее часто использовали классификацию А.В. Каплана и О.Н. Марковой (таблица 1.2.1).

Таблица 1.2.1 - Классификация открытых переломов костей конечностей  
А.В.Каплана и О.Н.Марковой

	<i>Размер раны</i>			
	I	II	III	IV
<b>Характер повреждения (вид) раны кожи и подлежащих тканей</b>	Точечные или малые до 1,5 см	Средние (2-9 см)	Большие (от 10 см и больше)	Особые (крайне тяжелые)
А. Ограниченные нетяжелые повреждения	IA	IIA	IIIA	С нарушением жизнеспособности конечности, раздроблением костей и раздавливанием мягких тканей на обширном протяжении, повреждением крупных магистральных сосудов.
Б. Средней тяжести – ушибленные рваные раны мягких тканей	IB	IIB	IIIB	
В. Тяжелые размозженные и раздавленные раны мягких тканей	IV	IVB	IVC	

Зарубежные авторы используют другие классификации. В настоящее время в России травматологи-ортопеды склоняются к принятию в своей практике этих классификаций. Наиболее распространённая была разработана в 1976 году R.V. Gustilo и J.T. Anderson (таблица 1.2.2).

Тип III данной классификации разделяется на три подтипа – IIIA, IIIB и IIIC. Подтип IIIA – переломы с обширным повреждением мягких тканей, лоскутные раны при сохранении адекватного закрытия кости мягкими тканями. В этот же подтип относят сегментарные, раздробленные переломы и травмы в результате высокоэнергетического воздействия с небольшими ранами (до 1 см). Подтип IIIB характеризуется обширными дефектами мягких тканей с оголением кости. К переломам IIIC относятся травмы с повреждением магистральных сосудов, требующих реваскуляризации.

Таблица 1.2.2 - Классификация открытых переломов по R.V. Gustilo и J.T. Anderson

Тип	Описание
I	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Кожная рана менее 1 см</li> <li>• Рана не загрязнена</li> <li>• Перелом не раздробленный</li> </ul>
II	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Кожная рана более 1 см</li> <li>• Повреждение мягких тканей не обширное</li> <li>• Нет дефектов мягких тканей</li> <li>• Перелом не раздробленный</li> </ul>
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Высокоэнергетичная травма, приводящая к обширному повреждению мягких тканей</li> <li>• Либо размозжение мягких тканей</li> <li>• Либо повреждения сосудов, требующие реваскуляризации</li> <li>• Либо обширное загрязнение раны</li> <li>• Либо сегментарные, раздробленные переломы или дефект кости, независимо от размеров раны.</li> </ul>

Существуют и более сложные классификации. Международной организацией АО ASIF принята своя классификация, опубликованная в изданиях «AO Principles of Fracture Management», под редакцией Thomas P. Rüedi, William M. Murphy (2000) и «Campbell's operative orthopaedics», 11 издание, под редакцией S. Terry Canale и James H. Beaty (2007).

В данной 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.

### **1.3. Тактика лечения открытых переломов костей конечностей**

Как уже отмечалось выше, очень часто открытые переломы сочетаются с политравмой. В этом случае процесс стационарного лечения принято разделять на

два этапа: реанимационный и профильный клинический. На первом этапе все мероприятия должны быть направлены на спасение жизни больного и профилактику тяжелых и жизнеугрожающих осложнений, на втором этапе проводятся восстановительные операции на опорно-двигательном аппарате, а также интенсивное восстановительное лечение пострадавших (Соколов В.А., 2011).

Основные направления исследований в лечении открытых переломов можно разделить на следующие проблемные группы:

- Лечение повреждений мягких тканей
- Устранение дефектов костей и остеосинтез
- Стимуляция репаративных процессов.

### **1.3.1. Проблемы, связанные с микробной контаминацией раны и применением антибиотиков**

Все открытые переломы считаются обсеменёнными. Тактика ведения таких пациентов должно отталкиваться от того, что рана бактериально загрязнена (Ярыгин Н.В. и др., 2009; Ключевский В.В. и др., 2015; Cross III W.W., Swiontkowski M.F., 2008). Методы лечения могут различаться в зависимости от типа перелома. Риск развития раневой инфекции также зависит от объёма повреждения мягких тканей. Так, например, при переломах I типа по классификации R.V.Gustilo и J.T.Anderson частота инфекционных осложнений составляет 0-2%, при переломах II типа – от 2% до 10% и при III типе – от 10% до 50% . Примечательно, что частота осложнений фактически не изменилась за 35 лет (Gustilo R.V., 1976; Gustilo R.V. et al., 1987; Templeman D.C. et al., 1998; Zalavras C.G. et al., 2007).

Большинство исследователей склоняется к тому, что необходимо профилактическое назначение антибиотиков в высокой дозировке с первых суток после госпитализации. Обычно назначают антибиотики широкого спектра действия, первого-второго поколений, для исключения селекции

антибиотикоустойчивой микрофлоры. Длительность профилактического применения составляет от одних до трёх суток (Zalavras C.G., Patzakis M.J., 2003).

Новым направлением стала разработка комплексов антибактериальных веществ с костными цементами. Сейчас данная методика используется при лечении хронического посттравматического остеомиелита и открытых переломов. Костный цемент с антибиотиком, устанавливаемый в рану называют «спейсером» (Schottle P.B. et al., 2005; Zalavras C.G. et al., 2005; Chadayammuri V. et al., 2015; Qiu X.S. et al., 2015).

Рядом исследователей при экспериментах *in vitro* было обнаружено, что стабильность и скорость выделения из костного цемента антибиотиков зависит от их физико-химических параметров, таких как характер взаимодействия с цементом, температура окружающей среды, молекулярная масса, кислотность, скорости циркуляции, а также характеристик костного цемента. В настоящее время большинство авторов рекомендуют тобрамицин или ванкомицин. Данные препараты существуют в порошкообразной форме, хорошо смешиваются с цементом и минимально абсорбируются в кровь. Также было выявлено, что локальная концентрация антибиотиков, выделяемых из костных цементов, в течение длительного времени превышает минимальную подавляющую. Уровень резорбции антибактериальных препаратов в кровь значительно меньше, чем при внутримышечном введении (Heffernan E.J. et al., 2007; McKee M.D. et al., 2010; Seligson D., Berling S., 2015). Одна из распространённых методик – применение костного цемента с тобрамицином. Такую смесь можно приготовить непосредственно в лечебном учреждении. 40 грамм «цемента» на основе полиметилметакрилата смешивают с 3,6 граммами тобрамицина. Затем формируют шарик и помещают в рану. По данным W.W. Cross III, (2008), такой способ позволил снизить частоту инфекционных осложнений при тяжёлых открытых переломах в три раза.

В настоящее время для локальной профилактики инфекции при открытых переломах широко применяются различные синтетические материалы с контролируемым высвобождением антибиотиков (terBoo G.J. et al., 2015). Также



сообщается о применении биodeградируемых антибиотикосодержащих гидроксиапатитных и кальций-сульфатных веществ, обладающих osteoconдуктивными свойствами. Их используют для замещения дефектов костей (Thomas D.B. et al., 2005; Wang S., 2011; Yan R.J. et al., 2014). Аналогичным образом возможно применение биodeградируемых имплантов на основе полилактида (Morawska-Chochół A. et al., 2014). J.S. McLaren и соавторы в 2014 г. описали новые полимерные матрицы для антибиотиков, с возможностью дозированной секреции последних в область перелома. Однако, использование биodeградируемых материалов возможно только в условиях стабильного остеосинтеза (Beardmore A.A. et al., 2005; Thomas D.B. et al., 2005). Перспективным направлением считается разработка и использование штифтов с покрытием, содержащим антибиотик (Metsemakers W.J. et al., 2015).

С.А. Ерофеев, Л.Б. Резник с соавторами (2014) доказали эффективность установки армирующего локального антибактериального носителя на основе полиметилметакрилата в эксперименте для купирования раневой инфекции.

Конечно же, проведение экстренной профилактики столбняка остаётся непреложным мероприятием при поступлении пациентов с открытыми переломами. Это принято как в Российской Федерации (Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за столбняком. Методические указания: МУ 3.1.2436-09. 3.1, 2009), так и в зарубежных странах (Bleck T.P., 2014).

### **1.3.2. Хирургическая обработка раны**

Необходимость хирургических мероприятий, направленных на снижение микробной контаминации и удаление нежизнеспособных тканей неоспорима. Общеизвестным способом выполнения таких мероприятий считается первичная хирургическая обработка (ПХО) (Шаповалов В.М., Овденко А.Г., 2008; Ямщиков О.Н. и др., 2015).

Ряд исследователей обсуждают оптимальное время ПХО раны. Исторически сложилось правило, что обработку раны надо выполнить в первые шесть часов после травмы (Gustilo R.B., 1976). Конечно же, существует влияние многих объективных факторов – наличие операционной, подготовленных специалистов, общее состояние пациента. Большинство авторов сходятся на том, что отсроченная ПХО целесообразна только при тяжёлом общем состоянии пациента. Время необходимо для стабилизации основных функций и систем организма (Соколов В.А. и др., 2005; Такиев А.Т. и др., 2005), даже в условиях военного времени (Ткаченко С.С., 1992). Большинство авторов настоятельно рекомендуют доставлять пациентов с открытыми переломами в специализированные травматолого-ортопедические отделения (Pollak A.N., 2006; Crowley D.J. et al., 2007; Reuss B.L., Cole J.D., 2007; Sungaran J. et al., 2007; Webb L.X. et al., 2007).

Принцип радикальности ПХО, сформулированный в годы Великой Отечественной Войны, в настоящее время пересмотрен. В военно-полевой хирургии сейчас существует концепция «сберегательной хирургической обработки ран» (Бельских А.Н., Самохвалов И.М., 2013). Целью является максимальное сохранение живых тканей, для уменьшения в дальнейшем дефектов и деформаций. Некоторые авторы даже рекомендуют не удалять свободные костные отломки (Шаповалов В.М., Ерохов А.Н., 2006; Шаповалов В.М., Овденко А.Г., 2008). Зарубежные исследователи считают, что ограничивать объём иссечения тканей стоит лишь в том случае, если ПХО выполняет неопытный хирург, так как есть риск излишнего удаления костной ткани. К таким выводам авторы пришли после изучения военных конфликтов во Вьетнаме (Hirsch E.R., 1987), Корее, Афганистане (Koskenvuo K., 1984; Pruitt V.A. Jr., Rasmussen T.E., 2014).

Однако, большинство современных зарубежных авторов склоняются к тому, что во время ПХО необходимо удалять все нежизнеспособные ткани, включая кости. Если же планируется повторная хирургическая обработка, то можно оставить неиссечёнными часть мышц, в жизнеспособности которых есть сомнения. По мнению С.G. Zalavras и соавторов (2007) полное закрытие раны

должно быть достигнуто после одной или, максимум, двух хирургических обработок. Один из наиболее важных моментов при ПХО – оценка кровоснабжения повреждённых тканей. Это предполагает не только рассечение травмированных тканей, но и расширение раны с разрезом здоровой кожи. Знание анатомии периферических сосудов помогает избежать раневых осложнений в дальнейшем. Разрезы необходимо делать с учетом сегментарного кровоснабжения (Attinger С.Е. et al., 2006).

Обильное промывание (ирригация) раны также является важнейшим моментом при обработке открытых переломов конечностей. С её помощью достигается удаление контаминированных мелких инородных тел, что снижает риск бактериального инфицирования и развития раневой инфекции (Kural С. et al., 2009). По мнению ряда исследователей, целесообразно использовать изотонические растворы в объеме не менее 10 литров (Crowley D.J. et al., 2007; Owens V.D. et al., 2009). В тоже время существует работа, доказывающая, что использование для ирригации раствора с антибиотиком достоверно уменьшает частоту раневых осложнений, по сравнению с промыванием физиологическим раствором (Anglen J.O., 2006). Ещё 18 лет назад считалось, что промывание ран с помощью высокого давления, по сравнению с промыванием под низким давлением, способствует лучшему удалению некротизированных фрагментов тканей и бактерий (Dirschl D.R. et al., 1998). Однако в настоящее время признано, что лучше использовать для промывания приспособления, создающие низкое давление, так как уменьшается повреждение тканей (Draeger R.W. et al., 2006; Draeger R.W., Dahnners L.E., 2006; Petrisor V. et al., 2011; Bhandari M. et al., 2012).

Ни один исследователь не оспаривает положение, что при самой тщательной и правильно выполненной ПХО не исключена возможность развития раневых осложнений. Многие учёные прямо указывают на то, что важную роль в развитии инфекции играет внутренняя микрофлора, находящаяся по большей части в кишечнике. Значительную роль в обосновании этого положения сыграли работы В.И.Никитенко. Он доказал, что микроорганизмы попадают в очаги

повреждения с помощью бактериальной транслокации (Nikitenko V.I., 2007; Nikitenko V.I. et al., 2011).

Доказано, что транслокация бактерий наблюдается при стрессе, травмах, ожогах, геморрагическом шоке, кишечной непроходимости, полиорганной недостаточности, механической желтухе, остром панкреатите, токсических гепатитах. Хирургическое вмешательство также индуцирует проникновение жизнеспособных бактерий через слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта в кровь, лимфу, органы и ткани (Павлович Е.Р., Дугин С.Ф., 2006; Салато О.В., 2008; Бухарин О.В. и др., 2011; Третьяков Е.В. и др., 2013; Almedia J. et al., 2006; MacFie J. et al., 2006). В Оренбургской медицинской академии было установлено, что первичной локализацией транслоцированных бактерий являются брыжеечные лимфоузлы (Тарасенко В.С. и др., 2000). Выход бактерий из лимфатического комплекса регулируется макроорганизмом. Любая травма или воспалительный процесс, в том числе и за пределами желудочно-кишечного тракта, меняет характер транслокации (Nikitenko V.I. et al., 2011). В.И. Никитенко с соавт. ещё в 1986 году доказали, что транслокация бактерий может быть естественным защитным механизмом при повреждениях. На основе этого открытия был создан бактериальный препарат, содержащий *Bacillus subtilis*, который используется для профилактики хирургической инфекции вместо антибиотиков (Никитенко В.И. и др., 2004; Сулейманов И.М., Есипов В.К., 2009; Сорокина В.О. и др., 2013). Данный препарат хорошо себя зарекомендовал для профилактики хирургической инфекции при остеосинтезе аппаратами внешней фиксации (Алимов Д.В. и др., 2007). В эксперименте доказано, что препараты-пробиотики можно с успехом применять для профилактики инфекции при огнестрельных повреждениях конечностей (Никитенко В.И., Сафронов А.А., 2011).

### 1.3.3. Устранение дефектов мягких тканей

Лечение открытых переломов конечностей, осложненных дефектами покровных тканей, особенно в сочетании с повреждениями функциональных структур – сухожилий, сосудов, нервов, до сих пор сопряжено с серьезными сложностями (Nejedly A., 2007; Erickson J., 2015). Поэтому одним из наиболее обсуждаемых аспектов данной проблемы является определение сроков закрытия ран и дефектов мягких тканей при тяжелых открытых переломах длинных костей конечностей (Sherman R. et al., 2006; Sheean A.J. et al., 2015). По срокам закрытия раны выделяют первичное закрытие (во время ПХО), раннее или отсроченное и позднее. Но эти термины достаточно условны и трактуются по-разному (Levin L.S. et al., 2007). Большинство авторов сходятся на том, что раннее закрытие осуществляется в течение 24 – 72 часов после травмы, а позднее – после 3 суток.

Традиционно предпочиталось позднее закрытие раны (Lambert E.W. et al., 2003). Это было связано с риском клостридиальной инфекции, особенно при тяжелых повреждениях мягких тканей (Редько К.Г., Корнилов Н.В., 2005). Ряд авторов считали, что первичное и раннее закрытие раны показано только при открытых переломах I типа (по классификации R.Gustilo и J.Anderson), а также в ограниченных показаниях случаев при переломах II типа (Гордиенко Д.И. и др., 2003; Lin D.L. et al., 2006). Ряд исследований доказывали, что при открытых переломах костей голени III типа время проведения свободной кожной пластики почти не оказывало влияния на ее результаты, но выполнение пересадок комплексов тканей в сроки от 3 до 5 суток после ранней радикальной ПХО достоверно снижало частоту развития раневых осложнений (Breugem C.C., Strackee S.D., 2006).

Однако существует диаметрально противоположная точка зрения, находящая всё больше сторонников. Она заключается в признании необходимости раннего закрытия раны (Ryan S.P., Pugliano V., 2014). Строгое и правильное соблюдение вышеизложенных принципов ПХО раны позволяет свести к минимуму риск бактериального загрязнения и развития анаэробной

инфекции. Доказано, что раннее закрытие раны предотвращает возникновение нозокомиальных инфекций (Rajasekaran S., 2007; Wei S.J. et al., 2014; Gupta A. et al., 2015). Ряд исследований показали, что раннее закрытие открытых переломов костей голени приводит к снижению частоты раневых осложнений и несращений костей (Naique S.V. et al., 2006; Azzam W., Atef A., 2016).

Существенным дополнением к лечению ран, по мнению ряда авторов, является использование устройств, обеспечивающих вакуумный дренаж. В последние годы широкое распространение получил способ лечения ран в условиях отрицательного давления под названием Negative Pressure Wound Therapy – NPWT. Отрицательное давление над раной создавали с помощью пластиковых воронок или полусфер, соединенных с хирургическими вакуумными системами. Было доказано, что применение таких устройств способствует заживлению раны, снижает отёк, повышает локальный кровоток (Hardwicke J., Paterson P., 2006; Parrett B.M. et al., 2006; Dedmond B.T. et al., 2007; Tarkin I.S. et al., 2008). Хотя не всегда использование вакуум-терапии позволяет выполнить раннее закрытие раны (Bhattacharyya T. et al., 2008).

М.Т. Archdeacon и Р. Messerschmitt в 2006 г. предложил специальные синтетические губки, соединённые с вакуумной помпой, для дренирования ран. Однако, по мнению D.R. Schlatterer и соавторов (2015), возможность использования данного метода в сочетании с ранним закрытием раны при тяжёлых открытых переломах III типа (по классификации R.Gustilo и J.Anderson) нуждается в дальнейшем изучении.

В настоящее время всё больше сторонников завоёвывает метод замещения дефектов покровных тканей, удовлетворяющий всем требованиям первичной пластики, — это микрохирургическая аутотрансплантация тканевых комплексов. Пластика данным методом выполняется сразу, при этом используются ткани из неповрежденных отдаленных частей тела. Нормальное кровоснабжение пересаженного трансплантата обеспечивается восстановлением магистральных питающих сосудов. Возможно включение в состав трансплантатов разных видов тканей в различных комбинациях, что позволяет решать более широкие

пластические задачи (Fathi M. et al., 2008; Yildirim S., 2009). Кроме того, может быть достигнута чувствительная или двигательная реиннервация трансплантата. Первичное восстановление покровных тканей хорошо кровоснабжаемыми тканями обеспечивает оптимальные условия для сращения отломков костей и репаративных процессов в ране. Возможность одномоментного укрытия дефекта покровов позволяет выполнить более радикальную первичную хирургическую обработку и полноценную реконструкцию функциональных элементов. При использовании описанного метода существенно уменьшаются сроки лечения и функциональной реабилитации пострадавших от тяжелых травм опорно-двигательного аппарата (Шибаетов Е.Ю. и др., 2010; Song D. et al., 2015; Jacob N. et al., 2015).

Хорошо себя зарекомендовал, по данным G. Ye (2015), метод совмещения закрытия дефекта мягких тканей «скользящим» трансплантатом и последующего вакуумного дренажа. Первичный дефект при открытых переломах II – III типа замещался смещаемым лоскутом на двух ножках, а образовавшаяся рана затем дренировалась с помощью вакуум-аппарата.

Так, например, потребность в микрохирургических операциях по замещению дефектов мягких тканей может достигать 24,4% (Минасов Б.Ш. и Валеев М.М., 2006). Авторы рекомендуют шире использовать метод дермотензии. Многие ученые сообщают о высокой эффективности ранних микрохирургических операций даже при обширных дефектах мягких тканей конечностей. Необходимо чаще использовать пластику свободными многослойными лоскутами с микрососудистыми анастомозами (Родманова Л.А. и др., 2007, 2008). Таким образом, анализ современной литературы позволяет сделать вывод об увеличении количества пластических операций у пациентов с открытыми переломами конечностей.

### 1.3.4. Устранение дефектов костей и остеосинтез

Ранняя стабилизация открытых переломов, как считает большинство исследователей, несёт много преимуществ для пациента. Прежде всего, это защита мягких тканей от дальнейшего повреждения при движениях нестабильных костных отломков. Восстановление длины конечности также приводит к снижению частоты инфекционных осложнений. Немаловажным считается возможность ранней мобилизации пациента (Ajmera A. et al., 2015; Azzam W., Atef A., 2016). Выбор фиксаторов включает в себя скелетное вытяжение, чрескостный остеосинтез, погружной остеосинтез пластинами и штифтами. Выбор фиксатора зависит от типа перелома, локализации (диафиз или околоуставной перелом), степени травматизации мягких тканей, общего состояния пациента (Hildebrand F. et al., 2016). Существуют специфические ситуации, при которых используются два и более вида фиксации. Например, при переломах дистального отдела костей голени применяют остеосинтез малоберцовой кости пластиной для восстановления длины и оси конечности, и чрескостный остеосинтез большеберцовой кости с фиксацией подтаранного сустава (Jacob N. et al., 2015).

Скелетное вытяжение, по мнению современных учёных, применимо лишь при весьма ограниченных показаниях. Например, переломы таза либо проксимального отдела бедра. Многие исследователи считают, что наружная фиксация – очень ценный метод в арсенале врача. Показания к данному методу – обширное загрязнение мягких тканей, переломы III типа (по классификации R.Gustilo и J.Anderson), нестабильность общего состояния пациента (Апагуни А.Э., Власов А.Ю., 2009; Heffernan E.J. et al., 2007; Roberts C.S., Feher L., 2015).

Полилокальный остеосинтез по Илизарову, по мнению многих специалистов, обладает бесспорными преимуществами даже по сравнению со свободной костной пластикой (Назаров Ф.Н. и Линник С.А., 2014; Самусенко Д.В. и др., 2014). При открытых многооскольчатых раздробленных переломах костей голени, когда риск травматического остеомиелита высок, формирование



первичного костного дефекта и выращивание регенерата по Илизарову позволяет существенно снизить количество случаев травматического остеомиелита (Назаров Х.Н., Линник С.А., 2014). Обширное исследование, проведённое в странах Европейского Союза, показывает, что применение аппарата внешней фиксации при открытых переломах голени III типа (по классификации R.Gustilo и J.Anderson) привело к лучшим функциональным результатам, по сравнению с другими методами (Lawrence X.W. et al., 2007; John J.K. et al., 2008).

Многие авторы предпочитают закрытие дефектов костей мышечным лоскутом, в сочетании с чрескостным остеосинтезом. Первичная костная пластика, по их данным не приносит желаемого результата и не влияет на исходы лечения открытых переломов (Lawrence X.W. et al., 2007; Hutson Jr. J.J. et al., 2010). Костная пластика более приемлема в отдалённом периоде лечения открытого перелома (Ахмедов Б.А., 2010). При костном дефекте рекомендуют использовать метод биллокального остеосинтеза в различных модификациях (Камека А.Л. и др., 2013). Например, высокую эффективность показал метод транспозиции одного или двух фрагментов малоберцовой кости по способу Илизарова в медицинской и социальной реабилитации больных с обширными острыми дефектами большеберцовой кости (Мартель И.И., Чевардин А.Ю., 2012).

Основными причинами распространенности чрескостного остеосинтеза, как отмечают учёные, являются малотравматичность, отсутствие дополнительной кровопотери, высокая стабильность соединения отломков, относительная простота выполнения операции и низкая стоимость фиксаторов (Копысова В.А. и др., 2011). Возможность этапного выполнения монтажа и управления фрагментами в процессе лечения обеспечивают оптимизацию репаративных процессов и раннее восстановление функции конечности (Назаров Х.Н., 2014).

Однако многие авторы придерживаются мнения, что аппарат внешней фиксации – временная мера, ограниченная ранним периодом после травмы. Наиболее распространенные показания для внешней фиксации открытых переломов – политравма и нестабильность основных жизненных функций

организма. Тактика при данных состояниях изложена в концепции «damage control» (Hildebrand F. et al., 2004; Roberts C.S. et al., 2005; Mathieu L. et al., 2011; Pape H.C., Champion H.R., 2015). В русскоязычной литературе это словосочетание применяется в оригинальной транскрипции (Лернер А.А. и Фоменко М.В., 2012; Сироджов К.Х. и др., 2013; Панков И.О. и др., 2014). S. Recknagel и соавторы (2013) признают, что операция по «замене» аппарата внешней фиксации на внутренний фиксатор является дополнительной травмой для организма и может ухудшать репаративные процессы.

Чрескостный остеосинтез является оптимальным только с позиций лечения повреждений мягких тканей и профилактики инфекционных осложнений, но при лечении переломов костей сам аппарат может способствовать замедлению процессов консолидации отломков и серьезно препятствовать восстановлению функции конечности (Корнилов Н.В. и др., 2006). В процессе обследования самыми современными методами больных после травм были выявлены недостатки в реализации лечения с помощью аппаратов Илизарова. Считается, что надо лечить не только место перелома, но и нормализовать все измененные функции организма, с тем, чтобы репаративный процесс протекал в самых благоприятных условиях. Поэтому могут измениться уже известные сроки формирования костных регенератов и темпы distraction (Свешников А.А., 2012). Немало работ посвящено сравнительной оценке эффективности различных видов аппаратов. Критерии оценки при этом предлагаются самые разные - универсальность устройства, травматичность остеосинтеза, его стабильность, дозированность управления, степень взаимного перемещения опор, величина рентгеновской тени аппарата, удобство для пациента, сложность и стоимость технологии изготовления (Соломин Л.Н., 2005; Редько К.Г. и др., 2009; Сергеев С.В. и др., 2009). В настоящее время проводятся дальнейшие исследования для совершенствования аппаратов внешней фиксации, достижения необходимой жёсткости и стабильности фиксации, выполняется разработка новых методик применения таких аппаратов внешней фиксации (Бейдик О.В. и др., 2009; Виноградов В.Г., Агафонов Н.Е., 2011). Таким образом, многие авторы не

рекомендуют использовать внешнюю фиксацию в течение всего срока сращения перелома.

Выходом из этой ситуации явилось создание методик многоэтапного остеосинтеза при лечении открытых переломов конечностей. Они подразумевают замену аппарата внешней фиксации на погружной имплант (Ключевский В.В. и др., 2012; Wang X. et al., 2011). Особенно эффективна такая методика при огнестрельных переломах. Она позволяет в подавляющем большинстве случаев добиться полноценного сращения костных отломков и снижает вероятность их замедленной консолидации по сравнению с чрескостным остеосинтезом. Также снижается частота развития контрактур крупных суставов (Шаповалов В.М., Хомянец В.В., 2010).

Сроки выполнения второго этапа остеосинтеза зависят от заживления ран мягких тканей и стабилизации показателей гомеостаза (Шаповалов В.М. и др., 2010). Но многие исследователи сходятся в том, что замена аппарата внешней фиксации на интрамедуллярный штифт должна проводиться в срок не позднее 2 недель после травмы, при условии отсутствия инфекции мягких тканей в области вмешательства (Dougherty P.J. et al., 2006; Suzuki T. et al., 2010; Pairon P. et al., 2015). При инфекциях области раны, обширных дефектах мягких тканей сроки таких операций могут изменяться. Хорошие результаты процедура замены внешней фиксации показывает при закрытии дефектов свободными кровоснабжаемыми лоскутами (Lee J.H. et al., 2012). Однако в последние годы был выполнен ряд исследований, которые показывают, что замена аппарата внешней фиксации на внутренний фиксатор не улучшает процессы регенерации костей (Sigurdson U. et al., 2010, 2011; Rodrigues F.L., 2014).

Первичный внутренний остеосинтез при открытых переломах является дискуссионным способом лечения в настоящее время. Так, ряд исследований показывают, что у первичного интрамедуллярного остеосинтеза есть ряд недостатков – риск развития остеомиелита и нарушений консолидации. Но аппарат внешней фиксации, в свою очередь, может приводить к контрактурам, воспалению спицевых ран (Muharrem I., 2007).

Фиксация интрамедуллярным штифтом в настоящее время является наиболее распространённым методом лечения открытых диафизарных переломов голени и бедра. Большинство учёных рекомендует применять первичный остеосинтез открытых диафизарных переломов интрамедуллярными штифтами с блокированием только при I и II типе (по классификации R.Gustilo и J.Anderson) (Ключевский В.В. и др., 2010, 2012). Ведутся дискуссии относительно способа остеосинтеза штифтом – с рассверливанием костно-мозгового канала, или без него. Последние клинические исследования не показали значительных статистических различий в исходах после остеосинтеза с рассверливанием либо без рассверливания костно-мозгового канала (Lin C.A. et al., 2016). Но в экспериментах установлено, что рассверливание канала приводит к снижению минеральной плотности кости (Allen Jr. J.C. et al., 2008).

Остеосинтез пластинами рекомендуют выполнять только при открытых переломах верхней конечности, либо при внутри- и околоуставных переломах. Некоторые протоколы ведения пациентов исключают фиксацию пластинами при обширных повреждениях мягких периартикулярных тканей (Achten J. et al., 2015; McNamara I.R. et al., 2015). В конце XX века отмечалась высокая частота инфекционных осложнений при первичном накостном остеосинтезе открытых переломов (Bach A.W., Hansen Jr. S.T., 1989). Однако появление новых малоинвазивных технологий и новых материалов для изготовления металлоконструкций значительно снизило количество осложнений (Kim J.W. et al., 2012). Поэтому многие авторы настоятельно рекомендуют выполнять первичный остеосинтез пластинами при открытых внутрисуставных переломах (Cole P.A. et al., 2004; Mei Z.F. et al., 2014; Sîrbu P.D. et al., 2014; Sarkhel S. et al., 2015; Wan Y. et al., 2015; Zhang Q.X. et al., 2015).

Проблема остеосинтеза открытых переломов в настоящее время не решена. По данным С.А. Линник и соавторов (2014), такие причины, как травматичность операции, нестабильный остеосинтез, неправильный подбор металлических конструкций явились причиной 42,1% случаев развития остеомиелита. Ещё в 9,4% случаев причиной были тактические ошибки (несвоевременно выполненная

операция при наличии экстренных показаний или чрезмерное расширение показаний к ней и др.).

Ряд исследователей докладывают об эффективности «профилактической» костной пластики. Она выполняется во время ПХО раны, в качестве источника материала для костной пластики используется обычно гребень подвздошной кости (Kobbe et al., 2008). Но более перспективной является пластика дефектов костей кровоснабжаемыми свободными костными ауто трансплантатами (Дажин А.Ю. и др., 2013).

Е.А. Волокитина и соавторы (2014) опубликовали результаты своих исследований по замещению дефектов костей материалом на основе β-трикальцийфосфата. Применение этого биокompозитного материала является малотравматичным и эффективным способом остеопластики при внутрисуставных переломах костей конечностей.

Существуют данные о применении алломатериалов для замещения дефектов костей. Например, А.Г. Игнатъев и Л.Б. Резник (2006) опубликовали сведения об успешном использовании алломатериала «Тутопласт». Получен хороший эффект от применения нанокристаллических имплантов для замещения дефектов костей (Резник Л.Б., Стасенко И.В., 2015). Широко используются материалы из пористого никелида титана (Казанцев А.Б. и др., 2005). С.А. Линник и соавторы (2009) рекомендовали применять кристаллический сульфат кальция, обладающий остеиндуктивным действием, в сочетании с 4% тобрамицином и стеариновой кислотой (OSTEOSETT) для замещения дефектов костной ткани.

#### **1.4. Проблема стимуляции репаративного гистогенеза при открытых переломах**

Как уже указывалось выше, несмотря на большое число научных работ, посвящённых проблеме лечения открытых переломов, частота осложнений последних остаётся стабильно высокой. Очевидно, что одной из важнейших причин неудовлетворительных исходов при лечении открытых переломов

является нарушение механизмов репаративного гистогенеза. По данным В.А.Соколова (2008), частота замедленной консолидации отломков после остеосинтеза длинных трубчатых костей составляла 13,3%. Естественно, учёные постоянно ищут пути влияния на эти механизмы. В этой связи необходимо учитывать общности и основные отличия репаративной и физиологической регенерации, которые заключаются в условиях обоих процессов (Лиознер Л.Д., Сидорова В.Ф., 1975). При физиологической регенерации восстановление повреждённых органов и тканей происходит в условиях функционирования восстанавливаемого органа при сохранности его нормального состояния. При репаративной регенерации ситуация характеризуется выпадением или ограничением функции, которая в этом случае часто не восстанавливается и по завершении регенерации, а также сопровождается изменением органотипичности регенерата (Лиознер Л.Д., Сидорова В.Ф., 1975). Это говорит об общей детерминированности физиологической и репаративной регенерации. Врачебное воздействие должно иметь целью получение органотипичного регенерата с нормализацией биомеханических, физиологических и биохимических условий существования. Немаловажным является возможность функционирования повреждённого органа в период заживления.

Успехи, достигнутые в изучении морфологических особенностей процесса репаративной регенерации кости, позволили сформировать положения о биологических свойствах и реактивности соединительной ткани, о стадийности в развитии регенерата кости. Достаточно много данных накоплено по течению репаративных процессов в ответ на различные нейрогуморальные, химические и физические воздействия.

Таким образом, выделяют три вида процессов костной регенерации (Виноградова Т.П., Лаврищева Г.И., 1974):

- по типу первичного сращения костных отломков;
- по типу первично-задержанного сращения;
- вторичное сращение костных отломков.

Структурно выделяют четыре стадии процесса костной регенерации:

1. Катаболизм тканевых структур с пролиферацией клеточных элементов.
2. Образование и дифференцировка клеточных элементов.
3. Образование костной структуры.
4. Перестройка костного регенерата с восстановлением костной ткани.

Некоторые авторы считают более правильным разделение процесса на пять - шесть стадий, однако это принципиально не меняет его сущности.

В настоящее время не вызывает сомнений, что указанные стадии репаративной регенерации зависят от точности сопоставления отломков сломанной кости, прочности фиксации и сохранности кровоснабжения в зоне перелома (Мартель И.И. и др., 2012).

Сращение костей по первичному типу наблюдается при точной репозиции, наличии диастаза между отломками в пределах 50 — 200 мкм в условиях их стабильной фиксации (Schenk R.K., 1985).

Первично-задержанный тип сращения переломов отмечается при отсутствии щели между отломками в условиях стабильной фиксации. При этом определяются ранние формы образования костной мозоли, преимущественно в области сосудистых каналов. Полному же сращению, как правило, предшествует процесс резорбции концов костных отломков (Aro H.T. et al., 1993).

В случае нестабильной фиксации костных фрагментов сохраняется подвижность в зоне перелома, происходит травма регенерата. В результате, сращение происходит по вторичному типу с образованием фиброзно-хрящевой мозоли. Дифференцировка клеток в сторону фибробластов и хондробластов описывал ещё в 1926 г. R. Leriche известным принципом, который заключается в том, что в аваскулярной зоне перелома формируется хрящевая ткань, в то время как в хорошо кровоснабжаемой зоне образуется костная ткань.

«Золотым стандартом» считается сращение переломов по первичному типу. Для стимуляции репаративной регенерации применяются и разрабатываются разные методы. Условно их можно разделить на группы. Это совершенствование аппаратов и способов фиксации, использование специальных имплантов, местное

применение химических, чаще всего органических веществ для стимуляции остеогенеза, использование различных физических факторов.

Краткий обзор работ по улучшению аппаратов и методов остеосинтеза был дан выше. Ряд авторов предлагают использовать аппарат внешней фиксации совместно с интрамедуллярным введением спиц с биоактивным кальций-фосфатным покрытием из гидроксиапатита. Установлено, что вокруг спиц образуется зона активного репаративного костеобразования и ангиогенеза, формируется костный футляр со свойствами кондуктора и индуктора остеогенеза. Консолидация перелома осуществляется в ранние сроки по первичному типу без образования хрящевой и соединительной ткани в костной спайке. То есть интрамедуллярные спицы с покрытием из гидроксиапатита положительно влияют на течение и интенсивность репаративного костеобразования при заживлении перелома (Шевцов В.И. и др., 2008; Агаджанян В.В. и др., 2011; Попков А.В., Попков Д.А., 2012; Ирьянов Ю.М. и др., 2014; Lin C.M., Yen S.K., 2006). На основе экспериментальных исследований разработан способ покрытия титановых имплантов оксидом графита для стимуляции остеогенеза (La W.G. et al., 2014).

Существуют работы по изучению возможностей использования физических факторов для стимуляции репаративной регенерации. 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 сращение отломков (Ирьянов Ю.М. и др., 2012). Также некоторые учёные применяют низкоинтенсивный импульсный ультразвук после интрамедуллярного остеосинтеза титановыми имплантатами. По их данным, ультразвук оказывает оптимизирующее действие на остеорепаративный процесс и перестройку поврежденной кости в зоне имплантации (Малышкина С.В. и др., 2013). Л.Б.Резник и соавторы (2015) в



эксперименте доказали возможность применения фиксирующих стержней для внеочагового чрескостного остеосинтеза в качестве волноводов для ультразвука.

Перспективны исследования по влиянию на заживление переломов локального очага остеогенеза, созданного путем остеоперфорации в контралатеральной конечности. Установлено, что остеоперфорация активизирует репаративное костеобразование, ускоряет перестройку новообразованной костной ткани, увеличивает степень ее зрелости и обеспечивает формирование полноценного костного регенерата в более ранние сроки (Ирьянов Ю.М. и др., 2010).

Сообщается о возможности использования имплантации сетчатых конструкций из никелида титана в область перелома. По данным авторов, имплантат из сетчатых конструкций никелида титана служит эффективным остеокондуктором, обеспечивающим активизацию репаративного костеобразования. Благодаря прорастанию костной ткани, содержащей факторы роста и костные морфогенетические белки, такой имплантат приобретает свойства остеогенности и остеоиндуктивности, способствуя трехмерному пространственному развитию костной ткани в регенерате (Чернов В.Ф. и др., 2008; Давыдов Е.А. и др., 2010; Ирьянов Ю.М. и др., 2012).

Есть исследования, посвященные влиянию введения остеоиндуктивных веществ в область перелома. Например, применение коллапанов - комплексов гидроксиапатита с коллагеном и лекарственными средствами (антибиотиками) - показало хорошие результаты при заживлении переломов (Котомцев В.В. и др., 2012). Сообщают об использовании материала «Депротекс» на основе депротенизированной аллокости в сочетании с аутогенными факторами роста в виде тромбоцитарно-фибринового геля. Данная методика ускоряет хондрогенез и остеогенез (Кирилова И.А., 2011). Использование костнопластических материалов на основе аморфного трикальцийфосфата для пластики костных дефектов сопровождается биологической резорбцией и обнаруживает стимулирующий эффект на процессы репаративной регенерации кости (Дмитриева Э.А., 2014).

В.И. Шевцов, Е.А. Волокитина и соавторы (2008) разработали способ получения кальцийфосфатных соединений из костной ткани животных. Сочетание этих соединений с сывороточными полипептидами улучшает васкуляризацию регенерата, ослабляет иммуногенные и повышает остеокондуктивные свойства минерального компонента и активизирует репаративный остеогенез. В итоге были получены биodeградируемые имплантационные наноматериалы с остеокондуктивными свойствами.

С.Н. Лунова и соавторы (2013) добавляли в кальций-фосфатный имплантационный материал фракцию низкомолекулярных кислото- и водорастворимых белков из костной ткани быков. При введении в зону перелома у крыс наблюдали положительную динамику показателей скелетного гомеостаза.

Интересное исследование посвящено влиянию гирудотерапии на заживление костной ткани при переломах. Установлено, что метод гирудотерапии способствует снятию посттравматического отека, развитию капиллярного русла и стимуляции остеогенеза, что подтверждено клиническими, рентгенологическими и морфологическими данными (Якиманская Ю.О. и др., 2011).

Существует способ коррекции репаративной регенерации при открытых переломах конечностей. Первично выполняют билокальный остеосинтез аппаратом Илизарова. Затем в толщу образовавшегося регенерата вводят компактный спонгиозный аутоотрансплантат. Способ, по данным авторов, обеспечил ускорение репарации, укрепление и компактизацию регенерата, улучшение кровоснабжения, сокращение сроков лечения в 1,5 раза (Атаев Э.А., 2012).

Много исследователей в последние годы занимаются изучением влияния препаратов костного мозга на репаративную регенерацию кости. В эксперименте получены хорошие результаты влияния пунктата костного мозга на активность клеток, участвующих в остеогенезе (Torres J. et al., 2015). При дальнейших исследованиях выделили 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). Было обнаружено при исследованиях на животных, что при введении мезенхимальных стволовых клеток в область перелома значительно раньше формируются структуры красного костного мозга, чем при естественном ходе репарации. Указанные изменения свидетельствуют об ускоренном развитии процессов восстановления целостности костной ткани. Дальнейшие исследования в этом направлении связаны с созданием композитных материалов, состоящих из мезенхимальных клеток, гидроксиапатита и коллагена (Майбородин И.В. и др., 2011; Chang S.H. et al., 2010; Deng Y. et al., 2014; Harada N. et al., 2014; Salem A.K., 2014; Yang W. et al., 2014).

Интересен способ стимуляции репаративного остеогенеза, связанный с использованием аутоплазмы, обогащённой тромбоцитарными факторами роста. Выделенные компоненты лиофилизируют. Затем получают мазевой состав, обладающий способностью проникновения через кожные покровы. Накладывают состав в виде аппликаций на поверхность тела в проекции зоны формирования костного регенерата (Ачкасов Е.Е. и др., 2014). Некоторые исследователи обогащённую аутоплазму вводят в зону перелома пункционным способом (Ачкасов Е.Е. и др., 2013).

Широко в последние годы изучается возможность использования кораллов для замещения дефектов костей и стимуляции регенерации. Доклинические исследования показали, что материалы на основе кораллов обладают остеоиндуктивным действием, не вызывают реакций отторжения, не обладают токсичностью. Применение кораллов ускоряло процессы костной регенерации. Более эффективны для стимуляции репаративной регенерации кости материалы, содержащие в качестве матрицы кораллы, обогащённые костным морфогенетическим белком 2 типа (BMP-2; bonemorphogeneticprotein) или инсулиноподобный фактор роста-1 (соматомедин C) (Carinci F. et al., 2014; Nandi S.K. et al., 2015).

Крупное направление современных исследований стимуляции остеогенеза посвящено получению различных материалов на основе нанотехнологий. Эти материалы должны быть биodeградируемыми, обладать остеоиндуктивными свойствами, или использоваться в качестве матрицы для биологически активных веществ (факторы роста, цитокины). В экспериментах на животных показано положительное влияние местного применения лития на сращение костей. Этот эффект, как сообщают авторы, связан с тем, что литий ингибирует гликогенсинтазкиназу – 3 (Glycogensynthasekinase (GSK) - 3). Тем самым он может ускорять остеобластогенез и угнетать остеокластогенез (Arioka M. et al., 2014). В качестве кандидатов биоматериала для индукции репарации кости предлагается активированный силикат магния (Wu Z. et al., 2014). Есть данные о стимулирующем влиянии на остеорегенерацию цинка, который импрегнируется в поверхность имплантов для остеосинтеза (Qiao Y. et al., 2014); поликапролактона в композиции с кремнием (PlazasBonilla C.E. et al., 2014) и других веществ.

Отечественными исследователями разработана и успешно применена на практике методика введения перфторана в ткани области раны при лечении открытых переломов конечностей. Использование перфторана в лечебном периоде способствовало купированию воспаления и стимуляции репаративных процессов (Дубровин Г.М. и др., 2008; Кавалерский Г.М. и др., 2012; Лебедев В.Ф. и др., 2014).

Для формирования костной мозоли при переломах играют роль различные факторы роста (тромбоцитарный, эпидермальный, фибробластический, инсулиноподобный) (Fan L. et al., 2014). Одним из наиболее изученных ростовых факторов является группа факторов роста фибробластов. 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). Во взрослом организме ФРФ являются гомеостатическими факторами и участвуют в восстановлении тканей, а также реагируют на повреждения. Они стимулируют рост множества типов клеток,

включая фибробласты, эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки сосудов и миоциты (Fisher F.M., Maratos-Flier E., 2016). ФРФ обладают цитопротективным эффектом, приводя к быстрому ограничению цитолиза (Шурыгин М.Г. и др., 2008).

Семейство факторов роста млекопитающих может быть разделено на несколько подгрупп: внутриклеточные факторы роста фибробластов (ФРФ 11, 12, 13, 14), гормоноподобные факторы роста фибробластов (ФРФ 15, 19, 21, 23) и канонические факторы роста фибробластов, включающие: ФРФ1/2/5, ФРФ3/4/6, ФРФ7/10/22, ФРФ8/17/18, и ФРФ9/16/20 (Itoh N. et al., 2008). Наиболее важными в процессе заживления ран и переломов костей являются ФРФ-2, ФРФ-7 и ФРФ-10 (Barrientos S. et al., 2008).

ФРФ-2 или основной ФРФ (оФРФ) известен давно. Он состоит из 146 аминокислот и имеет молекулярный вес 16,5 – 18,2 кДа, оказывает митогенный эффект на клетки тканей нейроэктодермального и мезодермального происхождения (Cheng E.T. et al., 2001; Chen G.J. et al., 2015). Согласно недавним исследованиям, ФРФ-2 является одним из наиболее важных проангиогенных медиаторов, участвующих в заживлении ран (Takayama M. et al., 2010). ФРФ-2 заставляет эндотелиальные клетки секретировать протеазы и активаторы плазминогена, которые деградируют базальную мембрану сосудов, усиливая инвазию клеток в окружающий матрикс и увеличивают этим количество новых сосудов (Singla D., Wang J., 2015). ФРФ-2 также стимулирует синтез эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов/хемокинов и их рецепторов, молекул адгезии эндотелиальных клеток и простагландинов (Presta M. et al., 2009). ФРФ-2 усиливает рост нервных волокон во время заживления ран (Jungnickel J. et al., 2006; Imaizumi T. et al., 2007). ФРФ-2 также повышает и синтез матриксных макромолекул, особенно дермальных гликозаминогликанов, гиалуроновой кислоты, которые также активно участвуют в заживлении ран и переломов (Kuroda K. et al., 2001).

Экзогенный ФРФ может также стимулировать заживление ран косвенно, 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; Hu Y. et al., 2015).

М.С. Robson и соавторы в 1992 году исследовали ФРФ в различных концентрациях и дозах на безопасность. Никакой токсичности, значительной сывороточной абсорбции и формирования антител не было обнаружено. Гистологическое исследование тканей при применении ФРФ показало повышение количества фибробластов и капилляров.

В 2005 году М. Miyoshi было создано экспериментальное раневое покрытие, в состав которого входил ФРФ. При его применении выявлено увеличение количества вновь образованных кровеносных сосудов и грануляционной ткани, а также ускорение эпителизации и закрытия раны. Усиление ангиогенеза при использовании ФРФ для лечения ран получено и в других экспериментальных работах (Kawai K. et al., 2005; Wilcke I. et al., 2007; Takikawa M. et al., 2015). Согласно наблюдениям некоторых исследователей наибольший уровень ангиогенеза был на 3 сутки после применения ФРФ (S.L.Qiu, 2008). А на четырнадцатые сутки фибробласты были правильно упорядочены. При этом наблюдалась повышенная экспрессия сосудистого эндотелиального фактора роста, которая имела пик к 10 суткам и держалась на высоком уровне до 14 суток. Ряд авторов отмечают, что усиление ангиогенеза и формирования грануляционной ткани происходит на 14 сутки после применения ФРФ (Obara K. et al., 2005; Nagato H. et al., 2006; Akasaka Y. et al., 2010).

Установлено, что применение ФРФ может быть полезным при лечении бактериально-загрязнённых и длительно незаживающих ран (Martí-Carvajal A.J. et al., 2015). Также было установлено, что через 7 дней после нанесения ФРФ снижалась бактериальная обсеменённость раны, увеличивалось количество

фибробластов и вновь сформированных капилляров по сравнению с контролем (Kawai K. et al., 2005; Dantas A.M. et al., 2007).

В результате анализа мировой научной литературы и предварительных исследований, мы пришли к выводу, что одним из наиболее перспективных методов воздействия на репаративный гистогенез является использование фактора роста фибробластов. К сожалению, данные клинического применения факторов роста фибробластов немногочисленны. Представленные здесь результаты экспериментальных работ позволяют предположить, что применение факторов роста фибробластов может способствовать заживлению ран и переломов.

В настоящее время ФРФ выпускается лишь для лабораторного применения за рубежом. Факторы роста фибробластов получают путём встраивания гена, кодирующего их синтез, в генотип бактерий. Например, это могут быть *Escherichia coli* (Славченко И.Ю. и др., 2003; Гаспарян М.Э. и др., 2009). Очевидно, что поиск новых, более доступных, источников ФРФ представляется чрезвычайно актуальным.

В результате многолетних исследований в Оренбургской государственной медицинской академии был обнаружен природный штамм бактерий *Bacillus subtilis* 804, продуцирующий бактериальный фактор роста фибробластов (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, содержащий метаболиты штамма *Bacillus subtilis* 804.

### **1.5. Доклиническое исследование безопасности фармакологических веществ**

В международной практике при изучении доклинической безопасности веществ для последующего медицинского применения принято

руководствоваться несколькими рекомендациями. В Европейском Союзе это «OECD Principles on Good Laboratory Practice», в США – «Good Laboratory Practice for Non-clinical Laboratory Studies». В Российской Федерации для этих целей издано «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», под редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У.Хабриева.

Согласно вышеперечисленным руководствам, целью доклинических токсикологических исследований фармакологического вещества является установление характера и выраженности его повреждающего воздействия на организм экспериментальных животных и оценка его безопасности. Общепринятым является разделение токсикологических исследований на изучение общетоксического действия и специфических видов токсичности (аллергенность, мутагенность и т.п.). Изучение общетоксического влияния разделяют на два этапа – изучение острой токсичности при однократном введении в течении суток, изучение хронической токсичности при длительном применении.

Рекомендовано проводить исследования на нескольких видах животных. Наиболее часто используемыми являются мыши и крысы. Для изучения аллергенности, иммунотоксичности применяют эксперименты на морских свинках. При изучении острой токсичности определяют среднелетальную дозу ( $LD_{50}$ ), часто используется метод Спирмэна-Кербера (Cornfield J., Mantel N., 1956). На основе среднелетальной дозы определяют максимальные дозировки для многократного введения при изучении хронической токсичности. Если летальной дозы нет (например, в случае с пробиотиками), то вводят половину от максимально объёма вещества, допустимого для введения определённому виду животного. Например, для крысы максимальный объём для внутримышечного введения составляет 5,0 мл (Хабриев Р.У., 2005).

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. Х.Уе 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.

Р.Хи и соавт. (2016) показали, что один из факторов роста фибробластов не только не оказывает токсического эффекта на печень, но имеет антидиабетический эффект и даже может снижать фиброзные процессы в печени, то есть в перспективе может использоваться для лечения цирроза печени. J.I.Chuang и соавт. (2015) опубликовали данные об антитоксическом действии ФРФ-9 на нейроны головного мозга.

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*. В.J.Lampe и J.C.English (2016) доказали безопасность фермента «наттокиназы» для крыс при назначении этого вещества в максимальных дозах.

Многие вещества, выделяемые *Bacillus subtilis*, обладают полезными свойствами для макроорганизма. J.Jiang и соавт. (2016) показали антигрибковую активность штамма *Bacillus subtilis* против *Fusarium moniliforme*. Y.Fan и соавт. в 2015 г. опубликовали данные о защитном действии *Bacillus subtilis* против афлотоксинов. Последние являются очень сильными гепатоканцерогенами (Wogan G.N. et al., 2004; Ricordy R. et al., 2002)

R.Chandrasekaran и соавт. (2014) установили, что некоторые штаммы *Bacillus subtilis* выделяют ферменты, губительно действующие на насекомых.

\* \* \*

На основании фактов, изложенных в данном обзоре литературы, мы пришли к убеждению в необходимости выполнить исследование, посвящённое улучшению результатов лечения открытых переломов и разработке новых способов стимуляции репаративного гистогенеза при травме.

Таким образом, представляет существенный научный и практический интерес разработка нового метода локального стимулирующего воздействия на гистогенез костной ткани и кожи при лечении открытых переломов костей конечностей с целью совершенствования методов лечения открытых переломов.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Характеристика пациентов с открытыми переломами костей конечностей

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.

Критерии включения в исследование:

- Госпитализация в ГБУЗ ГКБ №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.

Возраст пациентов составил от 18 до 78 лет (рисунок 2.1.1). 76 человек (26,1%) были в возрасте от 18 до 30 лет, 131 пациент (45%) – от 31 до 55 лет, 44 пострадавших (15,1%) в возрасте 56-65 лет и 40 больных (13,7%) были старше 65 лет (66-78 лет). Подавляющее большинство пациентов составили лица трудоспособного возраста.

Пациентов мужского пола было 204 человека (68,9%) , женского пола – 87 (29,9%).

Анализ обстоятельств получения травм выявил следующее (рисунок 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).

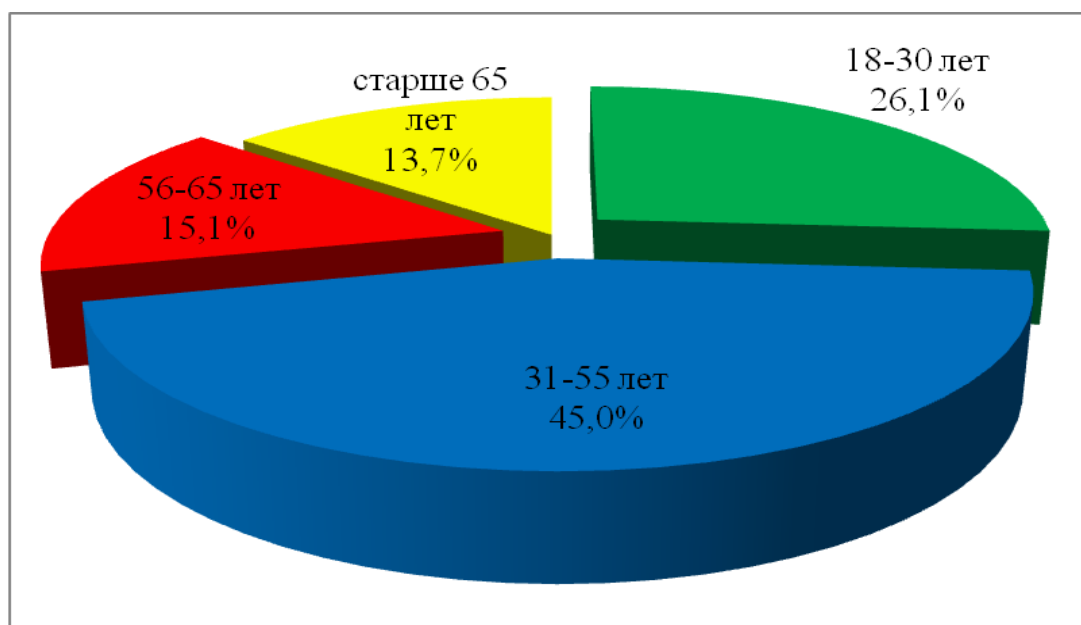


Рисунок 2.1.1 – Распределение пациентов по возрасту

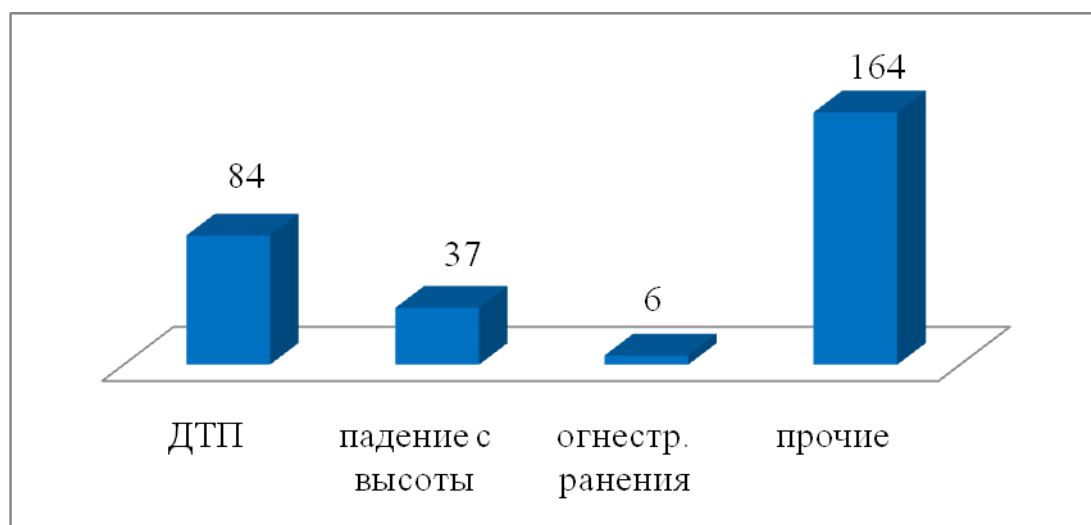


Рисунок 2.1.1 – Обстоятельства травмы

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 (рисунок 2.1.3).

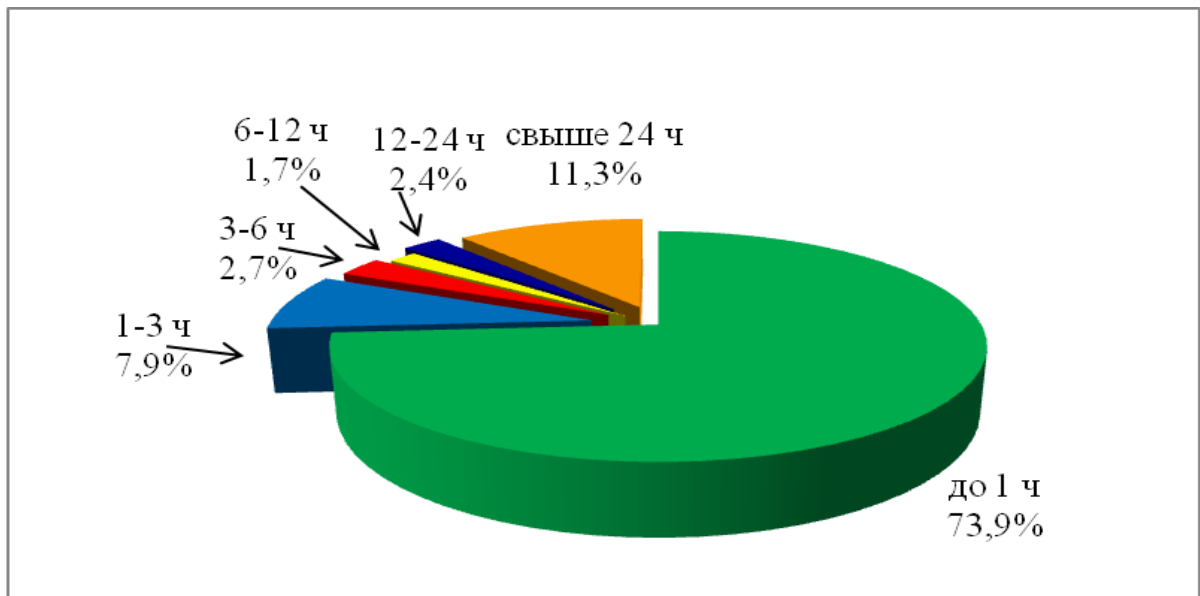


Рисунок 2.1.3 – Сроки поступления в стационар

Характеристика общего состояния пациентов при поступлении в стационар отражены в таблице 2.1.1. 95 человек (32,1%) находились в состоянии шока различной степени тяжести.

Таблица 2.1.1 - Общее состояние пострадавших с открытыми переломами костей конечностей

Удовлетворительное или средней тяжести (без шока)	Шок лёгкой степени	Шок средней и тяжёлой степеней
258 (87,2%)	13 (4,4%)	20 (6,8%)

По локализации открытые переломы распределились следующим образом (рисунок 2.1.4). Преобладали переломы костей голени - 167 (57,4%) пациентов. 21 человек (7,2%) поступили с переломами бедра, 65 пациентов (22,3%) – с переломами костей предплечья. У 23 пострадавших (7,9%) были открытые переломы плеча, 15 человек (5,2%) получили переломы двух сегментов конечностей.

Распределение по характеру излома отражено на рисунке 2.1.5. Большинство пациентов (249; 84,1%) имели оскольчатые переломы. У 15 человек (5,1%) были косые и винтообразные переломы, у 27 (9,1%) – поперечные переломы.

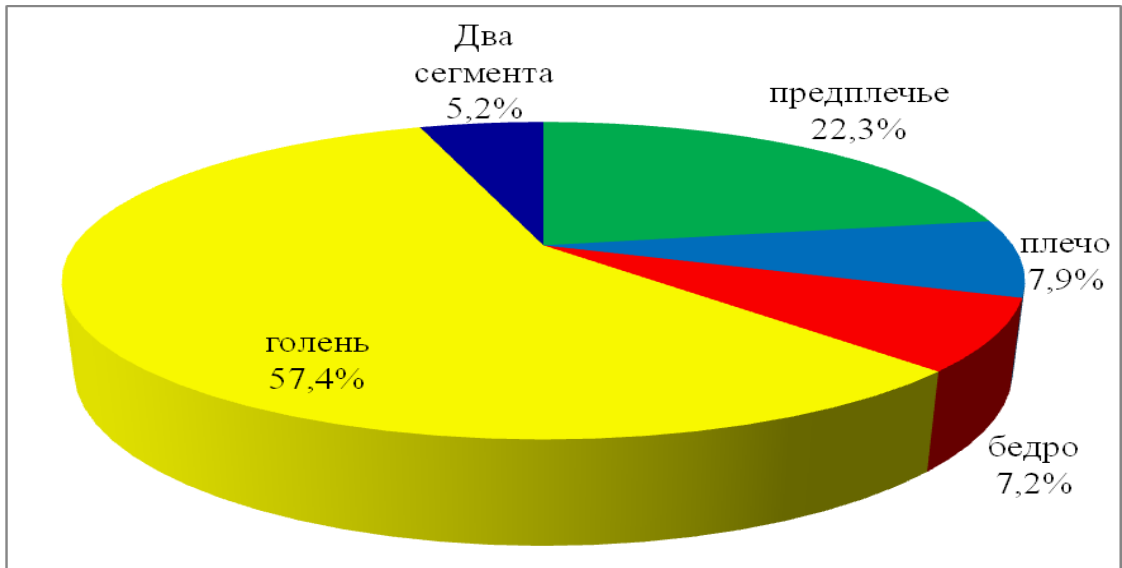


Рисунок 2.1.4 – Локализация открытых переломов

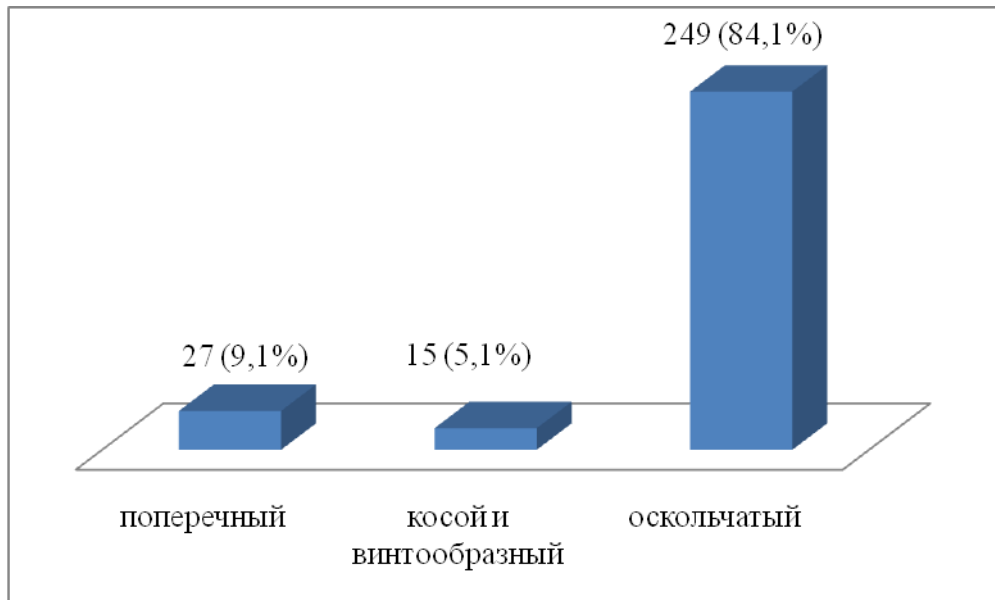


Рисунок 2.1.5 – Характер линии излома

Согласно классификации R. Gustilo и J. Anderson пациенты распределились следующим образом (рисунок 2.1.6). Более половины составляли переломы I и II типа, 86 (29,6%) и 103 (35,4%) пациентов соответственно. У 73 пострадавших (25,1%) были переломы IIIA, у 22 человек (7,6%) – IIIB, и 7 пациентов (2,4%) госпитализировано с переломами IIIC типа.

Дефекты кожи и мягких тканей имели 58 человек (19,9%). Дефекты костей в сочетании с дефектами мягких тканей были у 14 (4,8%) пострадавших.

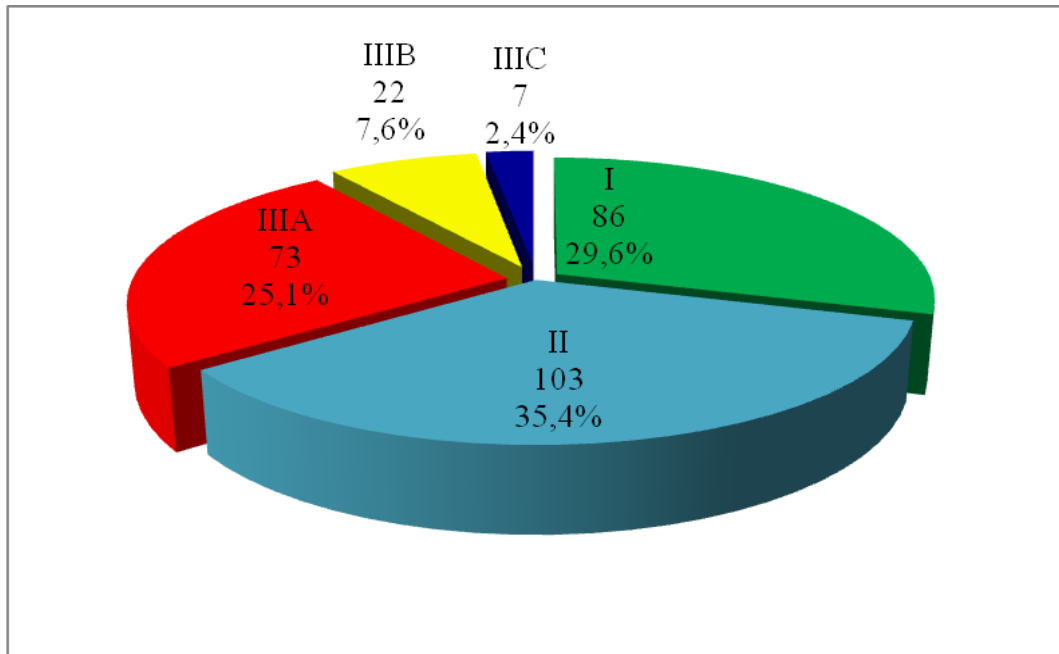


Рисунок 2.1.6 – Распределение пациентов по типу перелома по классификации R.Gustilo и J.Anderson

Сведения о частоте повреждений магистральных сосудов представлены на рисунке 2.1.7.

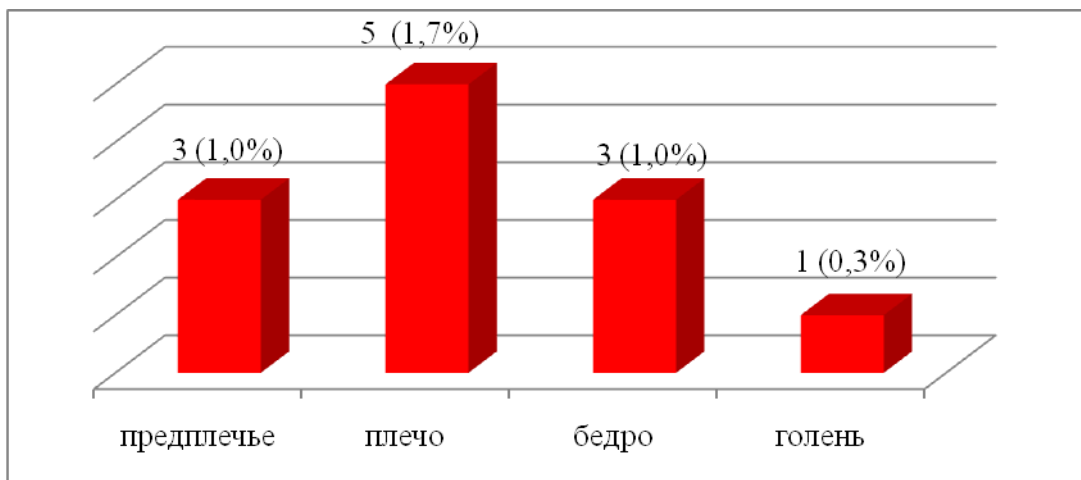


Рисунок 2.1.7 – Частота повреждений магистральных сосудов

Такие осложнения открытых переломов присутствовали у 12 (4,1%) пациентов. Ранения плечевой артерии были у 5 человек (1,7%), повреждения магистральных сосудов бедра – у 3 пострадавших (1%), артерий предплечья – у 3 человек (1%). Повреждения артерий при открытых переломах голени встречались реже – только в 0,3% случаев (1 пациент).

У пострадавших было выполнено 257 операций остеосинтеза. Более подробная характеристика операций, исходов дана в главе 3.

## **2.2. Методика получения и описание метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов**

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 человека. 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.

Для проведения исследования мы применяли метаболиты штамма *Bacillus subtilis* 804 в виде стандартизированного препарата под названием «Винфар», изготовленные в ООО «Бакорен». Для изготовления препарата суточную культуру *Bacillus subtilis* 804 из коллекции ГИСК им. Тарасевича № 288 засекали в среду М-9 (таблица 2.2.1) с казаминовыми кислотами в соотношении 1:40 и выращивали в колбах на качалке при температуре 37°С в течение 18 часов.

В качестве казиминовых кислот использовали Casein, Acidhydrolysedfrombovinemilk, Ну-CaseSF (фирма Sigma, кат. № C-9386).

Для сепарации бактериальной массы и клеточного дебриса применяли ультрафильтрацию на установке Minitan (фирма Millipore) с мембранами 100000 Da. Фильтрат разводили в двадцать раз стерильным 7% раствором натрия хлорида. 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 –  $7,1 \pm 0,2$ .

Таблица 2.2.1 - Состав среды М-9 для культивирования штамма бактерий *Bacillus subtilis* 804

Вещество	Количество
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	15 г
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 г
$\text{NaCl}$	0,5 г
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1 г
Казаминовые кислоты	5 г
Вода	до 1 л

### **2.3. Материалы и методы исследования влияния метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, на репаративный остеогенез**

Все эксперименты на животных 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.

Нами выполнены эксперименты, включающие моделирование открытого перелома бедренной кости, остеосинтез спицей, клинические наблюдения за течением раневого процесса и заживления переломов, морфологические исследования тканей области перелома.

Исследование было выполнено с использованием 112 белых крыс-самцов линии «Wistar» массой 185 – 215 г. Животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Животные находились в идентичных

условиях кормления и содержания. Крыс содержали в клетках по 7-8 особей в условиях искусственного освещения (по 12 часов светлого и темного времени), принудительной 12-кратной в час вентиляции, при температуре 18-20°C и относительной влажности 50-65 %, на подстилке из древесных стружек, стерилизованных в сухожаровом шкафу. Животные имели свободный доступ к корму и питьевой воде. Для питья использовали поилки (стеклянные бутылки по 500 мл с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре). Животные получали стандартный брикетированный корм.

Для наркоза 1% раствор тиопентала натрия вводился 112 крысам внутрибрюшинно в дозе 40 мг на 1 кг массы животного. Из разреза 1,0 см по латеральной поверхности бедра была выполнена остеотомия бедренной кости в средней трети. После чего выполнялся интрамедуллярный остеосинтез бедра спицей диаметром 1 мм. 56 крысам опытной группы сразу после наложения швов в область перелома введено 0,2 мл метаболитов *Bacillus subtilis* 804 (в виде препарата «Винфар»), 56 животным группы контроля 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. После выполнения операции животные содержались в клетках отдельно, по 1 особи.

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.

## **2.4. Материалы и методы исследования влияния метаболитов *Bacillus subtilis* 804 на репаративный гистогенез при лечении ран с дефектом мягких тканей**

Нами были выполнены клинические наблюдения за течением раневого процесса скальпированных ран области спины крыс и заживления их после аутодермопластики.

Исследование было выполнено с использованием 80 белых крыс-самцов линии «Wistar» массой 185 – 215 г. Животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Животные находились в идентичных условиях кормления и содержания. Крыс содержали в клетках по 7-8 особей в условиях искусственного освещения (по 12 часов светлого и темного времени), принудительной 12-кратной в час вентиляции, при температуре 18-20°C и относительной влажности 50-65%, на подстилке из древесных стружек, стерилизованных в сухожаровом шкафу. Животные имели свободный доступ к корму и питьевой воде. Для питья использовали поилки (стеклянные бутылки по 500 мл с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре). Животные получали стандартный брикетированный корм.

Для наркоза 1% раствор тиопентала натрия вводился крысам внутрибрюшинно в дозе 40 мг на 1 кг массы животного. 80 крысам под наркозом были нанесены глубокие скальпированные раны площадью 2,25 см<sup>2</sup> на предварительно выбритые участки в области спины. Дном ран являлась фасция. После выполнения операции животные содержались в клетках отдельно, по 1 особи. Раны ежедневно промывали 1% раствором йодопирона, до формирования грануляций. На 10 сутки под тиопенталовым наркозом выполнялась аутодермопластика расщеплённым кожным трансплантатом. При этом донорские места на спине в поясничной области тщательно выбривали, обрабатывали 70% этиловым спиртом, острым лезвием выкраивали расщеплённые свободные кожные лоскуты. В последующем повязки не накладывали. Средние размеры ран показаны в таблице 2.4.1.

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. Донорские раны орошались теми же веществами, что и операционные раны.

Таблица 2.4.1 - Размеры гранулирующих ран, кожных лоскутов

	Опытная группа	Контрольная группа	p
Размер ран перед аутодермопластикой (см <sup>2</sup> )	2,25 ± 0,04 см <sup>2</sup> (n =35)	2,25±0,05 см <sup>2</sup> (n=35)	p > 0,5
Размер донорских ран (см <sup>2</sup> )	2,25 ±0,03 см <sup>2</sup> (n=35)	2,25 ±0,03 см <sup>2</sup> (n=35)	p> 0,5

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.

## **2.5. Исследование острой токсичности метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов**

Для изучения доклинической безопасности мы руководствовались рекомендациями, изложенными в издании под редакцией профессора Р.У.Хабриева, 2005 г. Исследование было выполнено с использованием 72 взрослых крыс линии «Wistar» массой 180-200 г. (36 самцов и 36 самок) и 72 взрослых мышей линии BALB/C массой 18-20 г. (36 самцов и 36 самок).

Животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Мышей и крыс содержали в клетках по 7-8 особей в условиях искусственного освещения (по 12 часов светлого и темного времени), принудительной 12-кратной в час вентиляции, при температуре 18-20°C и относительной влажности 50-65 %, на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу. Животные имели свободный доступ к корму и водопроводной питьевой воде. Для питья использовали поилки (стеклянные бутылки по 500 мл с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре). Животные получали стандартный брикетированный корм.

Животные содержались в идентичных условиях кормления и содержания. Исследуемый препарат мы наносили на раны и в область перелома. Крысам препарат вводился внутримышечно, а мышам – внутрибрюшинно. Схема исследования отражена в таблице 2.5.1.

Таблица 2.5.1 - Схема исследования острой токсичности метаболитов *Bacillus subtilis* 804

Группы	Кол-во животных	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

Мы использовали концентрированный препарат, для клинического использования его планируется разводить в 20 раз. Крысы были разделены на 6 групп (три опытные и три контрольные). Первой группе вводили 0,5 мл препарата внутримышечно, второй – 1,5 мл и третьей – 5,0 мл (максимально возможное количество жидкости для внутримышечного введения у крыс, Р.У.Хабриев, 2005). Животным трёх контрольных групп вводился физиологический раствор хлорида натрия в тех же объёмах.

Мыши также были разделены на 6 групп (три опытные и три контрольные). Первой группе вводили 0,1 мл препарата внутрибрюшинно, второй – 0,5 мл и третьей – 1,0 мл (максимально возможное количество жидкости для внутрибрюшинного введения у мышей, Р.У.Хабриев, 2005). Животным трёх контрольных групп вводился физиологический раствор хлорида натрия в тех же объёмах.

Вещества вводились однократно, до утреннего кормления. Все процедуры осуществлялись с соблюдением правил асептики и антисептики. Внутримышечное введение осуществлялось с помощью одноразовых шприцов объемом 5,0 мл, внутрибрюшинное – инсулиновых шприцов объемом 1,0 мл.

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-е, 7-е и 14 сутки путем взвешивания решетки с кормом в начале и спустя 24 часа. Масса тела подопытных животных регистрировалась перед первым введением, на 7-е и на 14-е сутки.

Клинический анализ крови выполнялся на вторые, седьмые и четырнадцатые сутки опыта. Кровь забирали до утреннего кормления из вен хвоста.

На 15-е сутки животных выводили из опыта. Выполнялись патоморфологические исследования. Среднелетальную дозу - LD<sub>50</sub> - определяли по методу Спирмэна-Кербера (Cornfield J., Mantel N., 1956).

## **2.6. Исследование хронической токсичности метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов**

Для изучения хронической токсичности препарата были поставлены эксперименты с использованием 50 крыс линии «Wistar» массой 180-200 г. и 50 мышей линии BALB/C массой 18-20 г., по 25 самцов и 25 самок каждого вида животных. Мышей и крыс содержали в клетках по 7-8 особей в условиях искусственного освещения (по 12 часов светлого и темного времени), принудительной 12-кратной в час вентиляции, при температуре 18-20°C и относительной влажности 50-65 %, на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу. Животные имели свободный доступ к корму и водопроводной питьевой воде. Для питья использовали поилки (стеклянные бутылки по 500 мл с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре). Животные получали стандартный брикетированный корм.

Животные каждого пола содержались отдельно, в идентичных условиях кормления и содержания. Крысам препарат вводился внутримышечно, а мышам – подкожно. Перед началом исследований животных выдержали на карантине в течение 12 дней. Схема исследования отражена в таблице 2.6.1.

Животным контрольной группы вводился физиологический раствор хлорида натрия в том же объёме. При исследовании острой токсичности мы не выявили токсического эффекта при введении препарата в максимальных дозах. Поэтому для изучения хронической токсичности мы уменьшили дозу препарата в 2 раза.

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

Внутримышечное введение осуществлялось с помощью одноразовых шприцов объемом 5,0 мл, подкожное – инсулиновых шприцов объемом 1,0 мл.

Таблица 2.6.1 - Схема исследования хронической токсичности препарата метаболитов *Bacillus subtilis* 804

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	

На протяжении опыта наблюдали за поведением животных, их подвижностью, состоянием шерсти, кожного покрова, аппетитом, динамикой веса.

Потребление корма определялось для каждой группы животных визуально каждый день и количественно один раз в неделю путем взвешивания решетки с кормом в начале и спустя 24 часа. Масса тела подопытных животных регистрировалась перед первым введением, затем один раз в неделю.

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.



В крови подсчитывалось содержание форменных элементов: эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов; определялась лейкоцитарная формула и концентрацию гемоглобина. Из биохимических показателей крови анализировались концентрация билирубина, креатинина, аминотрансфераз, глюкозы, щелочной фосфатазы, мочевины и холестерина. Для оценки функции выделительной системы определяли плотность и рН 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). Патоморфологическое исследование включало в себя: макроскопическое исследование, взвешивание и гистологическое исследование внутренних органов. Взятые для морфологических исследований органы были подвергнуты однотипной гистологической обработке. Кусочки органов фиксировали в 10% водном растворе нейтрального формалина. Фиксированные кусочки органов в последующем дегидрировались в спиртах возрастающей крепости и заливались парафином – целлоидином. С каждого объекта на ротационном микротоме изготовили серийные парафиновые срезы толщиной 6-8 мкм. Препараты окрасили гематоксилином Майера и эозином. Выполняли светооптическое изучение препаратов. Для выявления готовности клеток к апоптозу выявляли экспрессию каспазы-3. Иммуногистохимические исследования проводили на парафиновых срезах с использованием моноклональных антител и системы визуализации фирмы BioGenexSuperSensytiveDetectionSystem (США) по протоколам фирмы производителя.

Особое внимание при исследовании обращалось на степень кровенаполнения органов, присутствие кровоизлияний, изъязвлений слизистых оболочек, а также наличие зон дистрофии и некроза.

## **2.7. Оценка анафилактогенной активности метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов**

Для изучения анафилактогенного 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 объеме 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).

Расчет интенсивности анафилактического шока в индексах Weigle:

- ++++ шок со смертельным исходом;
- +++ шок тяжелой степени (общие судороги, асфиксия, животное теряет способность удерживаться на лапах, падает на бок, не погибает);
- ++ шок умеренный (небольшие судороги, выраженные явления бронхоспазма);
- + шок слабый (некоторое беспокойство, учащенное дыхание, почесывание мордочки, непроизвольное мочеиспускание, дефекация, шерсть взъерошена);
- 0 шок не развился, признаки его отсутствуют.

## **2.8. Выявление алергизирующего действия метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов**

Десяти морским свинкам 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.

Шкала оценки кожи при аллергии.

0 - видимой реакции нет;

1 - бледно-розовая эритема по всему участку или по его периферии;

2 - ярко-розовая эритема по всему участку или его периферии;

3 - красная эритема по всему участку;

4 - инфильтрация и отек кожи (утолщение кожной складки) при наличии или отсутствии эритемы;

5 - эритема, выраженная инфильтрация, очаговые изъязвления (некроз), возможны геморрагии, образование корочек.

## **2.9. Материалы и методы 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 рН 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 ImageJ 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.

Плоскости срезов ориентированы продольно костным отломкам с целью включения в каждый срез оба костных отломка и все слои костной мозоли, толщину которой измеряли по цифровым микрофотографиям в программе ImageJ 1.48v после соответствующей калибровки.

## **2.10. Методики статистического анализа данных**

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  $p \leq 0,05$ .

### Глава 3. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ОТКРЫТЫМИ ПЕРЕЛОМАМИ КОСТЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ

Общая характеристика пациентов дана в главе «Материалы и методы». Стоит ещё раз отметить, что у 35,1% пациентов были тяжелые открытые переломы (III типа по классификации R.Gustilo и J. Anderson).

Всем 291 пациенту выполнялась первичная хирургическая обработка (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 вмешательств дана в таблице 3.1 и на рисунке 3.1.

Таблица 3.1 - Характеристика операций остеосинтеза

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

95 пациентам был выполнен остеосинтез аппаратом внешней фиксации (АВФ), 106 пострадавшим – экстремедуллярный остеосинтез пластинами и винтами, 47 – интрамедуллярный остеосинтез. У 8 человек в день госпитализации выполнялась фиксация АФВ, в дальнейшем (в срок от 3 до 12 суток, после купирования отёка и острых воспалительных явлений) – демонтаж аппарата и внутренняя фиксация перелома.

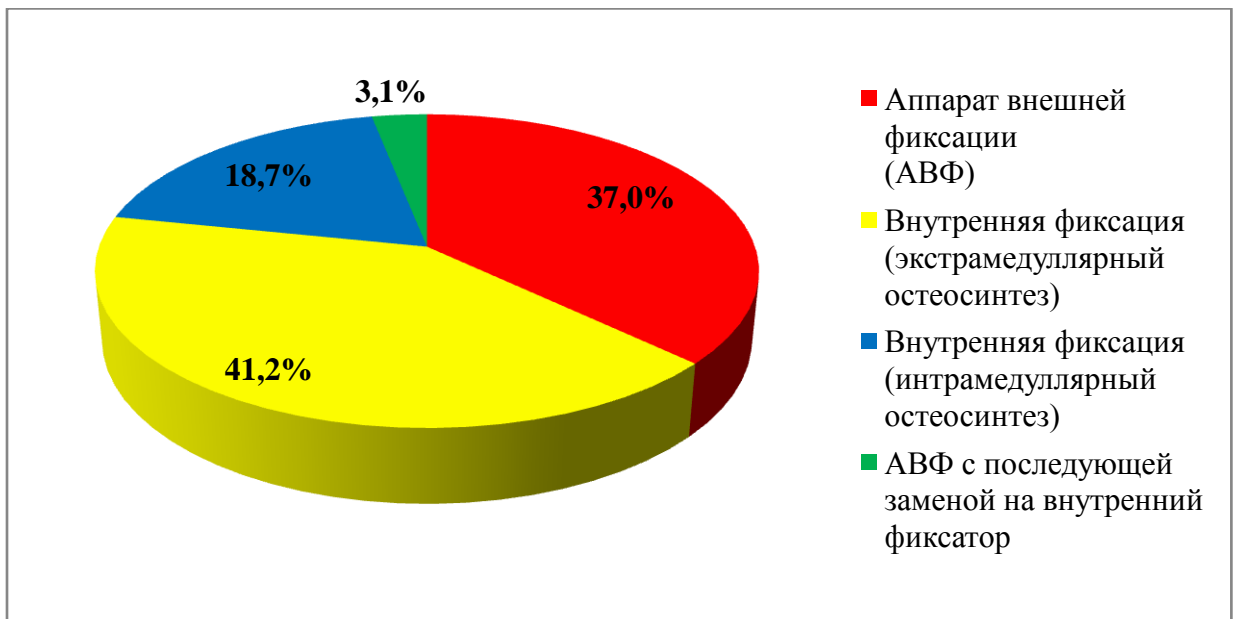


Рисунок 3.1 - Общее распределение видов остеосинтеза

Операции по восстановлению магистральных сосудов были выполнены у трёх пациентов. Например, пациентка В., 24 года, госпитализирована после дорожно-транспортного происшествия – была сбита автомобилем. Доставлена в состоянии шока средней степени тяжести. Полученные травмы – открытый перелом средней трети левого бедра ШС типа, рваная рана правого бедра с повреждением бедренной артерии, закрытый перелом хирургической шейки левого плеча. При поступлении – противошоковая терапия и операция – аллопластика бедренной артерии синтетическим протезом, ПХО раны левого бедра с закрытием дефекта мягких тканей перемещенными лоскутами, фиксация перелома скелетным вытяжением. На пятые сутки выполнена закрытая репозиция, остеосинтез левого бедра штифтом с блокированием, остеосинтез плеча блокированной пластиной. В связи с наличием костного дефекта бедра операция выполнена с укорочением последнего на 5 см. Раны зажили первичным натяжением. Перелом консолидировался. Через год выполнена серия оперативных вмешательств с целью восстановления длины левого бедра. Первый этап – остеотомия средней трети бедра, удаление дистальных блокирующих винтов и монтаж дистракционного аппарата внешней фиксации (рисунок 3.2). Штифт и проксимальные винты не удалялись. Затем выполнялось удлинение бедра в течение месяца (рисунок 3.3).

После достижения нормальной длины выполнен второй этап – дистальное блокирование штифта и демонтаж дистракционного аппарата. Пациентке было разрешено ходить с частичной нагрузкой на ногу. Через 2,5 месяца наступила консолидация (рисунок 3.4). Длина конечности была восстановлена.



Рисунок 3.2 - Пациентка В.  
Рентгенограмма после  
osteotомии бедра с  
наложением  
дистракционного аппарата

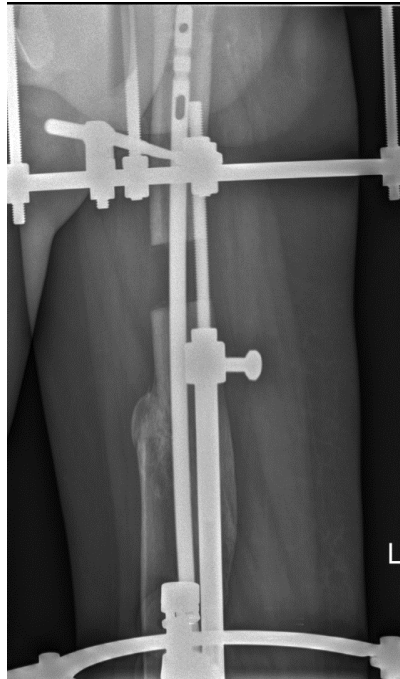


Рисунок 3.3 - Пациентка В. Рентгенограмма через  
месяц после остеотомии (2 проекции)



Рисунок 3.4 - Пациентка В.  
Рентгенограмма через 3,5  
месяца после остеотомии



У четырёх человек произведены ампутации при поступлении. Одному пациенту с переломом костей голени ШВ типа был выполнен остеосинтез аппаратом Илизарова, в дальнейшем течение осложнилось тромбозом подколенной артерии, и на 4-е сутки выполнена ампутация на уровне нижней трети бедра.

Остеосинтез костей предплечья выполнен у 53 пациентов (рисунок 3.5). Из них остеосинтез АФВ выполнен у 13 пациентов, экстрамедуллярный остеосинтез – у 35 пострадавших, интрамедуллярная фиксация – у 5 человек.

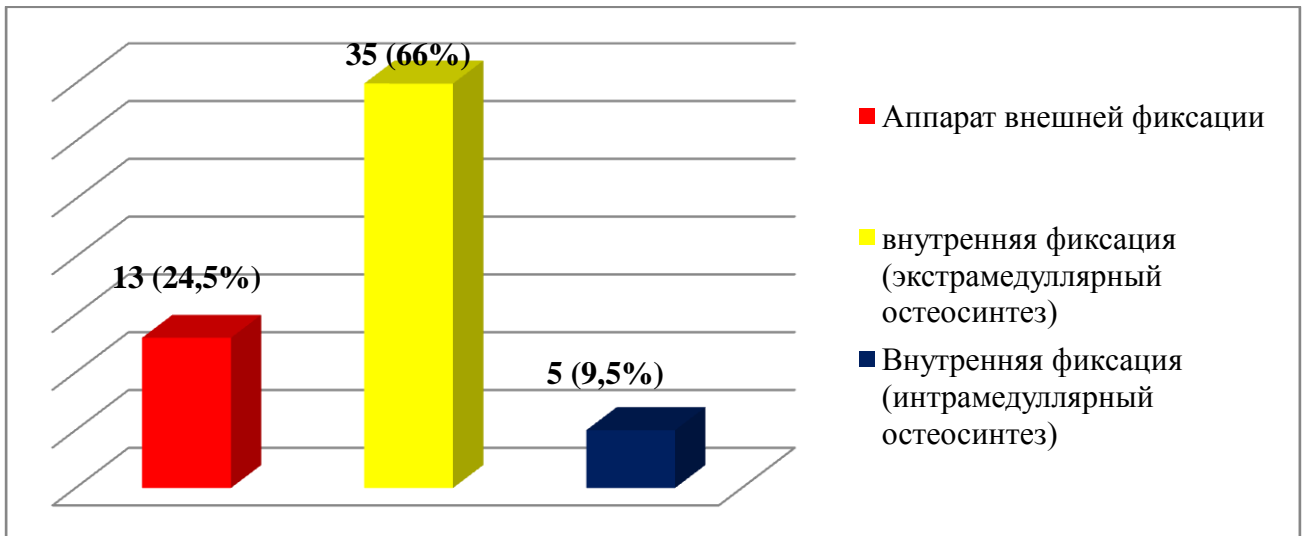


Рисунок 3.5 - Способы остеосинтеза у пациентов с переломами предплечья

С открытыми переломами плеча госпитализировано 23 человека. Остеосинтез проведён у 17 пациентов. АФВ установлен двум больным, экстрамедуллярный остеосинтез выполнен у 12 пострадавших, интрамедуллярная фиксация – у 2 человек, остеосинтез АФВ с последующей заменой на внутренний фиксатор – у одного пациента (рисунок 3.6).

Остеосинтез бедра проведён у 19 пациентов. АФВ установлен одному больному, экстрамедуллярный остеосинтез выполнен у 8 пострадавших, интрамедуллярная фиксация – у 7 человек, остеосинтез АФВ с последующей заменой на внутренний фиксатор произведён 3 пациентам (рисунок 3.7).

Остеосинтез при открытых переломах голени выполнен у 153 пациентов. АФВ установлен 75 больным, экстрамедуллярный остеосинтез выполнен у 47 пострадавших, интрамедуллярная фиксация – у 28 человек, остеосинтез АФВ с

последующей заменой на внутренний фиксатор произведён 3 пациентам (рисунок 3.8).

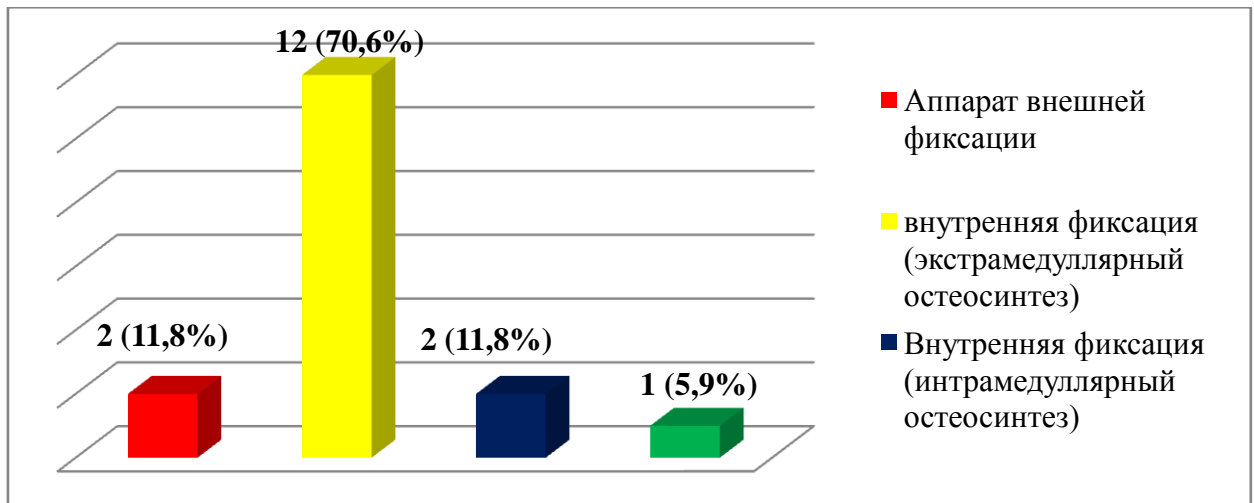


Рисунок 3.6 - Способы остеосинтеза у пациентов с переломами плеча

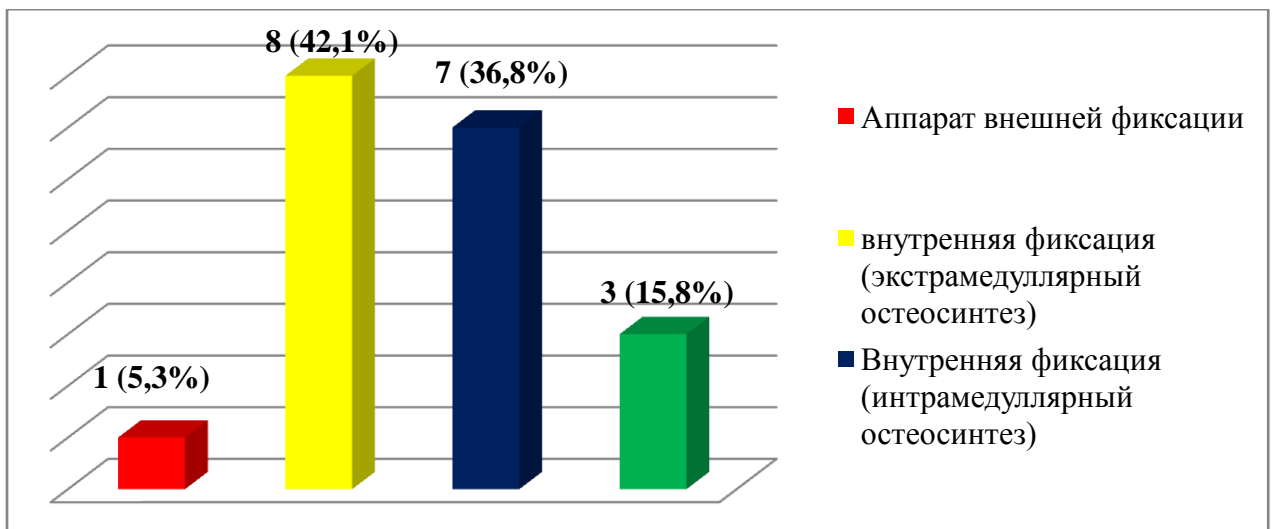


Рисунок 3.7 - Способы остеосинтеза у пациентов с переломами бедра

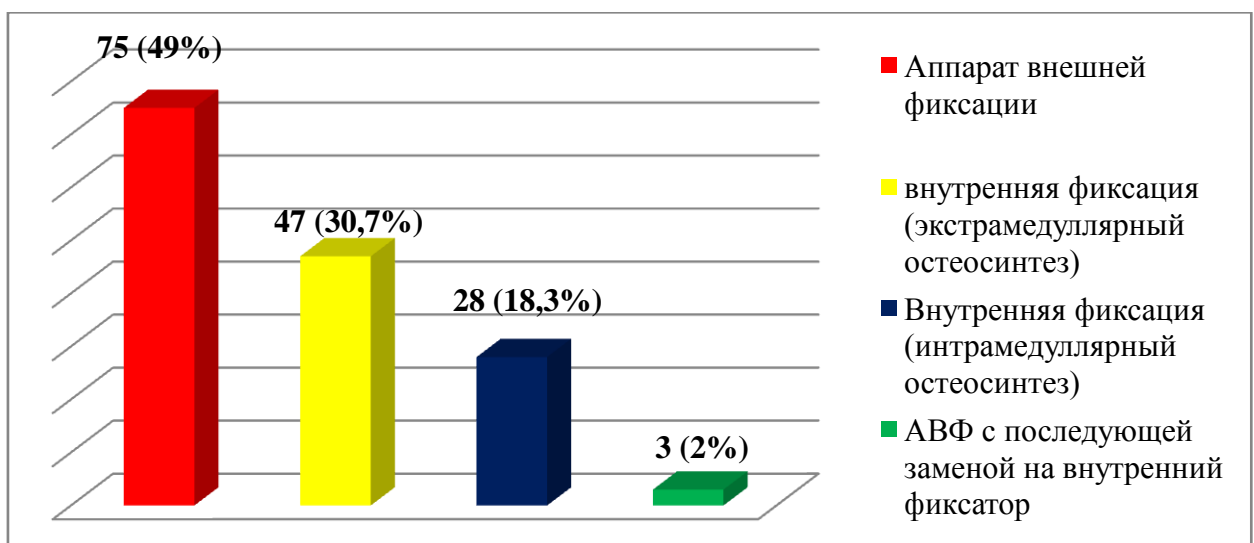


Рисунок 3.8 - Способы остеосинтеза у пациентов с переломами голени

15 пациентов поступило с открытыми переломами двух сегментов. Остеосинтез проведён у всех пациентов. АВФ установлен 4 (26,7%) больным, экстрamedулярный остеосинтез выполнен у 4 (26,7%) пострадавших, интрамедуллярная фиксация – у 6 (40%) человек, остеосинтез АВФ с последующей заменой на внутренний фиксатор произведён одному пациенту.

На рисунке 3.9 отражена зависимость выбора метода остеосинтеза от тяжести открытого перелома (по классификации R.Gustilo и J. Anderson). Оказалось, что при переломах II типа большая часть пациентов была прооперирована с использованием внутренней фиксации. 36 (47,4%) пострадавшим с открытыми переломами I типа выполнен экстрamedулярный остеосинтез, 17 (22,4%) – интрамедуллярная фиксация. 22 (28,9%) пациентам произведен остеосинтез АВФ. При переломах II типа – похожее распределение: 44 (48,4%) больным с переломами II типа выполнен экстрamedулярный остеосинтез и 15 (16,5%) пациентам – интрамедуллярная фиксация.

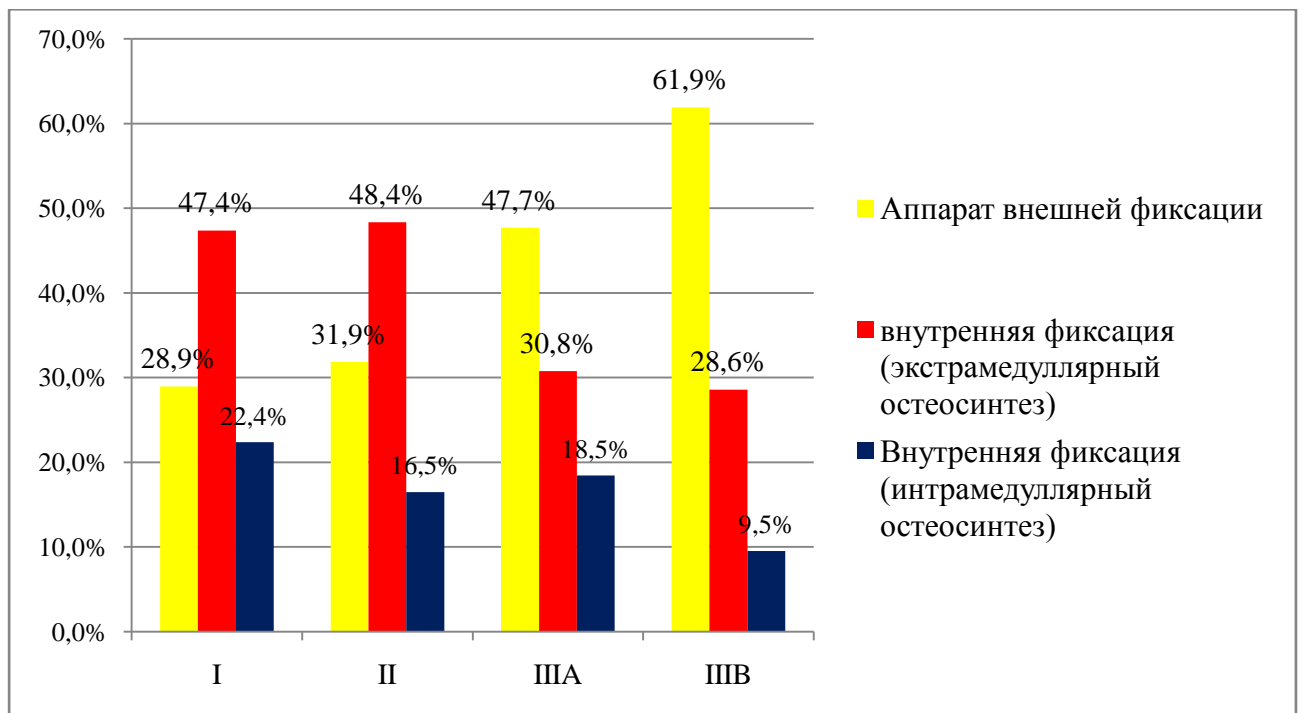


Рисунок 3.9 - Распределение видов остеосинтеза по тяжести открытых переломов

Остеосинтез АВФ произведен 29 (31,9%) пострадавшим. Однако при тяжелых переломах IIIA и IIIB 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 3.2.

Таблица 3.2 - Частота осложнений после остеосинтеза открытых переломов

<i>Осложнение</i>	Нет осложнений	Некроз краев раны	Некроз лоскута частичный	Некроз лоскута полный	Нагноение раны поверхностное	Нагноение раны глубокое
<i>Число пациентов</i>	225	8	15	4	20	19
<i>Доля от общего числа пациентов</i>	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 3.3.

Таблица 3.3 - 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 IIIC 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 3.4.

Таблица 3.4 - 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 3.5).

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

Таблица 3.5 - 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>

Распределение по виду осложнений сходно у обеих групп, кроме частичных некрозов лоскутов, которые чаще встречались в первой группе. Это можно объяснить тем, что оценить состояние мягких тканей в ранние сроки после травмы сложнее, чем по истечении нескольких суток. Тем не менее, ПХО ран выполнялась всем пациентам при поступлении. Решение о том, выполнять ли остеосинтез сразу, принималось по нескольким критериям. Это тяжесть перелома, локализация, характер смещения отломков, состояние мягких тканей, общее состояние пациента и т.д.

Более половины (56,8%) операций остеосинтеза открытых переломов с помощью АВФ выполнено при поступлении (рисунок 3.10).

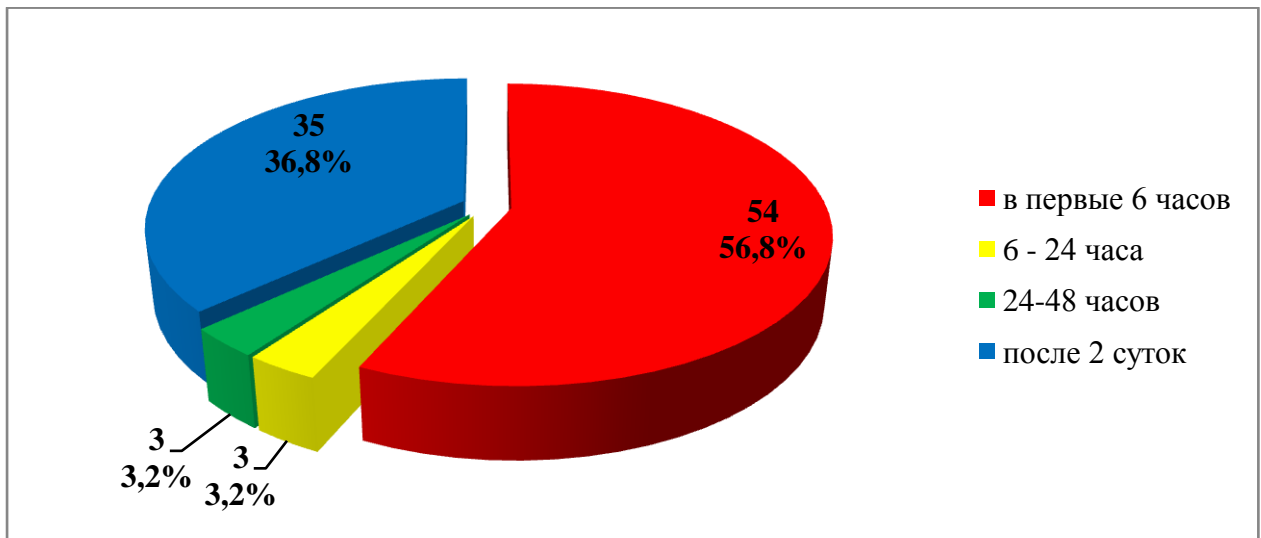


Рисунок 3.10 - Сроки выполнения остеосинтеза АВФ

В тоже время большая часть операций по внутреннему (погружному) остеосинтезу была проведена позднее 2 суток после госпитализации (рисунки 3.11 и 3.12).

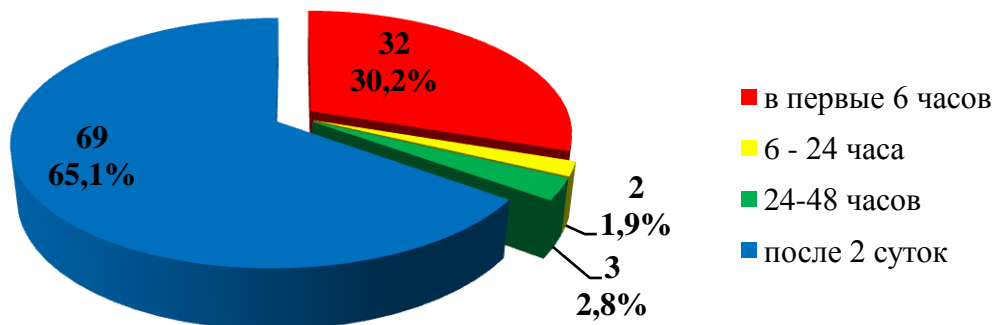


Рисунок 3.11 - Сроки выполнения экстрamedулярного остеосинтеза

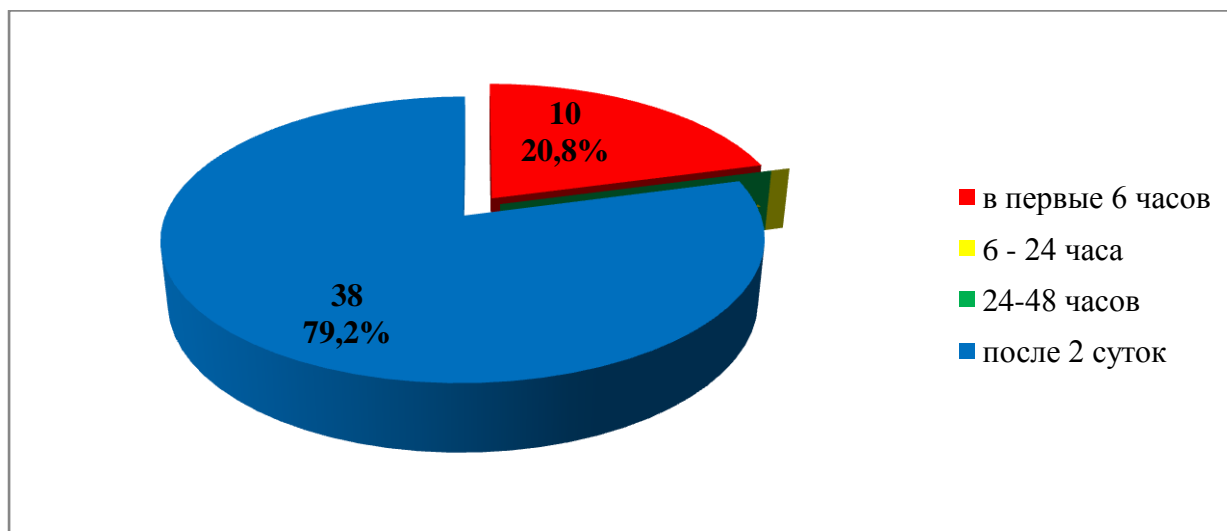


Рисунок 3.12 - Сроки выполнения интрамедуллярного остеосинтеза

Восьми пациентам выполнялась при поступлении фиксация перелома АВФ, затем, после заживления раны и при условии отсутствия воспалительных явлений демонтаж аппарата и внутренняя фиксация.

При анализе зависимости частоты и вида осложнений от типа остеосинтеза выявлено следующее (таблица 3.6).

Таблица 3.6 - Зависимость частоты осложнений от типа остеосинтеза

Вид осложнения	АВФ		Экстремедуллярный остеосинтез		Интрамедуллярный остеосинтез		Замена АВФ на внутренний фиксатор	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Некроз краев раны	2	2,1%	5	4,7%	3	6,3%	0	
Некроз лоскута частичный	5	5,3%	6	5,7%	2	4,2%	2	25%
Некроз лоскута полный	2	2,1%	2	1,9%	0		0	
Нагноение раны поверхностное	6	6,3%	10	9,4%	5	10,4%	1	12,5%
Нагноение раны глубокое	5	5,3%	4	3,8%	7	14,6%	0	
<b>Всего</b>	<b>20</b>	<b>21,1%</b>	<b>27</b>	<b>25,5%</b>	<b>17</b>	<b>35,4%</b>	<b>3</b>	<b>37,5%</b>

Осложнения после двухэтапного остеосинтеза, включающего в себя фиксацию АВФ при поступлении и дальнейшую замену аппарата внутренним фиксатором, были у 3 из 8 пациентов. Но, учитывая малое количество наблюдений, результаты статистически недостоверны. В тоже время, более наглядной и достоверной представляется зависимость инфекционных осложнений от тяжести перелома, показанная выше в таблице 3.3.

Общие данные об анатомо-функциональных отдаленных результатах лечения открытых переломов у пациентов, которым выполнялись операции остеосинтеза, представлены в таблице 3.7. Сроки наблюдения – от 1 до 2 лет после травмы.

Таблица 3.7 - 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%

В целом, сращение перелома с восстановлением функции наступило у 212 из 257 пациентов, что составило 82,5% от общего числа наблюдений. У 4 пострадавших (1,6%) сформировались деформации конечности. У 27 больных (10,5%) были нарушения консолидации. Хронический остеомиелит развился у 14 человек (5,4%).

Распределение отдалённых результатов после различных видов остеосинтеза отражено в таблице 3.8.



Таблица 3.8 - Распределение анатомо-функциональных результатов лечения открытых переломов после разных видов остеосинтеза

Анатомо-функциональные результаты	АВФ		Экстрamedулярный остеосинтез		Интрамедулярный остеосинтез		Замена АВФ на внутренний фиксатор	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Сращение перелома с восстановлением функции	83	87,4%	90	84,9%	33	68,8%	6	75,0%
Сращение перелома с деформацией конечности и нарушением функции	2	2,1%	1	0,9%	1	2,1%	0	0,0%
Нарушения консолидации (несращения, ложные суставы)	7	7,4%	10	9,4%	9	18,8%	1	12,5%
Хронический остеомиелит	3	3,2%	5	4,7%	5	10,4%	1	12,5%

При анализе отдаленных исходов различных по тяжести открытых переломов выявлено следующее. Частота удовлетворительных результатов лечения снижается с увеличением тяжести перелома (рисунок 3.13). 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 IIIA и IIIB типа отдаленные удовлетворительные результаты отмечены лишь у 49 (67,1%) и 15 (68,2%) пострадавших соответственно. При открытых переломах IIIC у трех из семи пациентов выполнены ампутации, у одной возникла деформация конечности и лишь у трех больных (42,9%) наступило хорошее сращение перелома.

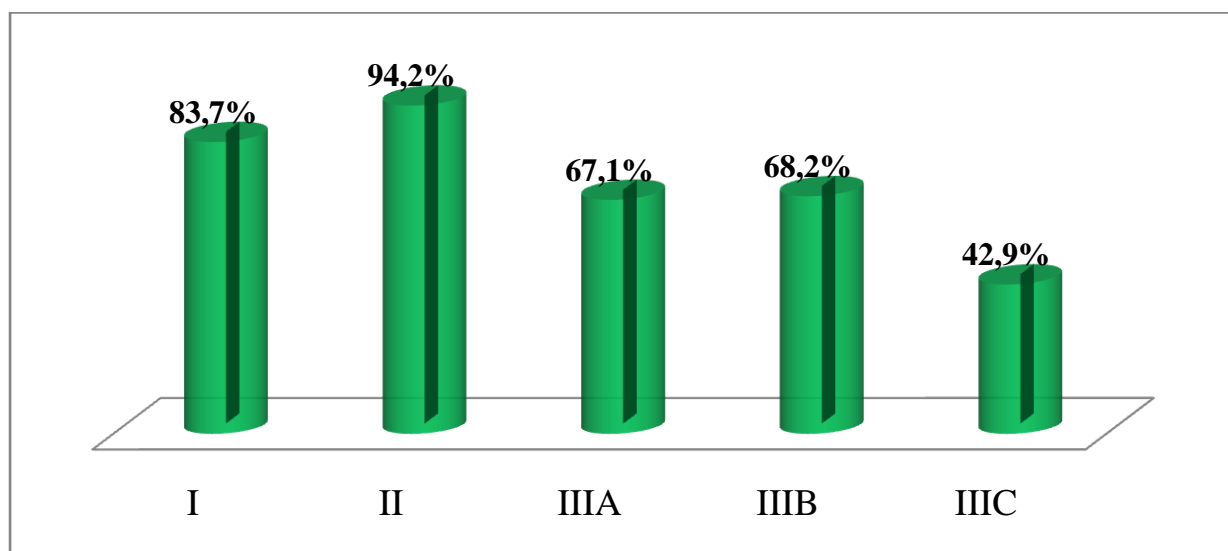


Рисунок 3.13 - Частота сращения с восстановлением функции после переломов различной тяжести

Более детальный анализ отдаленных исходов в зависимости от тяжести перелома дан в таблице 3.9.

Таблица 3.9 - 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%
IIIA	49	67,1%	1	1,4%	17	23,3%	6	8,2%
IIIB	15	68,2%	0		2	9,1%	5	22,7%
IIIC	3	42,9%	1	14,3%	У трех пациентов выполнены ампутации			

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 голени). У 6

человек (40%) произошли несращения переломов одного из сегментов, причём ложные суставы были именно после открытых переломов.

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 3.14). Выполнялся остеосинтез обеих бёдер штифтами (рисунок 3.15). Операции выполнены на 5-е сутки после травмы.



Рисунок 3.14 - Пациентка А.  
Рентгенограммы правого бедра при  
поступлении



Рисунок 3.15 - Пациентка А.  
Остеосинтез правого бедра на  
5 сутки после травмы

В ноябре 2014г. на контрольных рентгенограммах выявлены нарушения консолидации (рисунки 3.16, 3.17). 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 (рисунок 3.18). Через 6 недель пациентке разрешили наступать на правую ногу. Перелом

консолидировался (рисунок 3.19). Пациентка стала ходить самостоятельно, без помощи костылей. Ложный сустав левого бедра был подвергнут оперативному лечению 12 апреля 2016 г. Выполнено удаление металлоконструкций, рассверливание костно-мозгового канала с 9 мм до 11 мм, остеосинтез штифтом большего диаметра с блокированием.

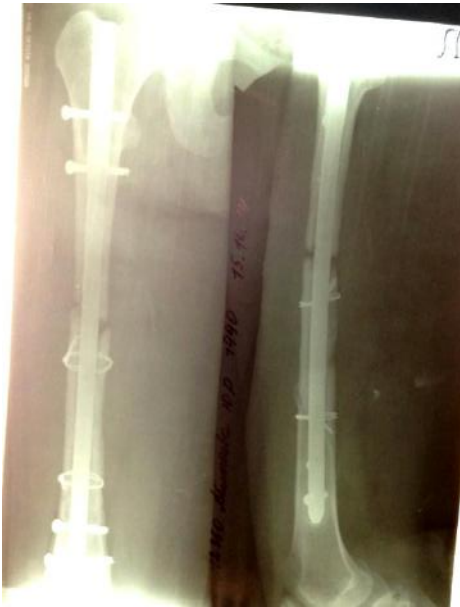


Рисунок 3.16 - Пациентка А.  
Рентгенограммы правого бедра через  
10 месяцев



Рисунок 3.17 - Пациентка  
А. Рентгенограммы левого  
бедра через 10 месяцев



Рисунок 3.18 - Пациентка А.  
Рентгенограммы правого бедра после  
реконструктивной операции по  
поводу ложного сустава.



Рисунок 3.19 - Пациентка А.  
Рентгенограммы правого бедра  
через 4 месяца после  
реконструктивной операции

Таким образом, общее количество ранних осложнений после операций остеосинтеза открытых переломов составило 66 случаев (22,7%). Основными видами были – частичный некроз мягкотканого лоскута (5,2%), и нагноение раны (поверхностное, в пределах подкожной клетчатки, до фасции – 6,9%, глубокое – 6,5%). Некроз краёв раны встречался у 2,7% пострадавших, полный некроз лоскута – у 1,4% пациентов. Видна устойчивая тенденция к увеличению частоты осложнений с повышением степени тяжести открытого перелома.

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. У пострадавших с переломами двух сегментов ложные суставы возникли в 40% случаев.

Наибольшее число неблагоприятных исходов, в том числе и нарушений консолидации, возникало после тяжелых открытых переломов III типа по классификации R. Gustilo и J. Anderson. Наличие дефектов мягких тканей и костей при таких переломах приводит к образованию длительно незаживающих ран, что ухудшает результаты лечения пациентов.

Определены 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).

После проведённого анализа выявлено, что основными проблемами, требующими изучения и решения, в раннем периоде являлись инфекционные осложнения – некроз лоскутов и нагноение раны, а в отдалённые сроки – нарушения консолидации переломов. Степень тяжести перелома прямо влияет на развитие инфекционных осложнений и на отдалённые результаты лечения. Частота нарушений консолидации после тяжелых открытых переломов III типа оставалась высокой, вне зависимости от способа остеосинтеза. При переломах двух сегментов резко возрастала частота несращений, причём ложные суставы возникали в тех сегментах, в которых были открытые переломы.

Результаты анализа клинических данных доказали необходимость разработки методов воздействия на репаративный гистогенез. Созданию препарата для улучшения репаративного гистогенеза мы и посвятили данную работу.

Глава 4. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТАБОЛИТОВ *BACILLUS SUBTILIS* 804, СОДЕРЖАЩИХ ФАКТОР РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ, НА РЕПАРАТИВНЫЙ ОСТЕОГЕНЕЗ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОТКРЫТЫХ ПЕРЕЛОМОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Нами были выполнены клинические наблюдения за течением открытых переломов бедренной кости в условиях интрамедуллярного остеосинтеза у 112 крыс. Для наркоза 1% раствор тиопентала натрия вводился 112 крысам внутривенно в дозе 40 мг на 1 кг массы животного. Из разреза 1,0 см по латеральной поверхности бедра была выполнена остеотомия бедренной кости в средней трети. После чего выполнялся интрамедуллярный остеосинтез бедра спицей (рисунок 4.1).

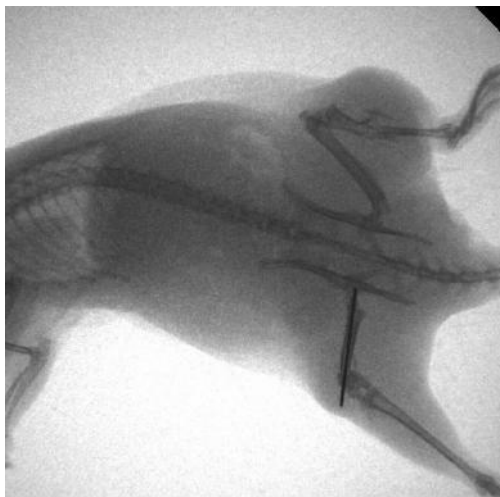


Рисунок 4.1 - Остеосинтез бедра крысы спицей.

Интраоперационная ренгенограмма

Далее 56 крысам опытной группы в рану введено 0,2 мл метаболитов *Bacillus subtilis* 804 (в виде препарата «Винфар»), 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. Манипуляции производились по методикам, описанным в главе материалы и методы.

На 3, 7, 14, 21, 28, 44 и 61 сутки по 8 крыс каждой группы были подвергнуты эвтаназии путём декапитации под эфирным наркозом. Забирались ткани области перелома для морфологических исследований

В результате наблюдения за поведением животных контрольной группы установлено, что нагружать оперированную конечность крысы начали через 2-3 дня после операции. Двигательная активность животных контрольной группы восстанавливалась до нормальной через 14-17 дней. Следует отметить, что уже с первых суток после операции крысы сами подходили к воде и корму.

Животные опытной группы с первых суток после операции также хорошо ели обычный корм, через 2 дня после операции начинали активно нагружать оперированную конечность. Их двигательная активность возросла до нормальной через 9-13 дней.

У двух животных из контрольной группы возникли инфекционные осложнения области хирургического вмешательства (на вторые и третьи сутки). Они были выведены из опыта. У остальных животных раны зажили первичным натяжением (рисунки 4.2, 4.3).



Рисунок 4.2 - Крыса.  
Контрольная группа. Рана  
через сутки после операции



Рисунок 4.3 - Крыса.  
Контрольная группа. Рана на 14  
сутки после операции



*Морфометрия костной мозоли.*

Уже при сравнении средней толщины периостальной костной мозоли у животных контрольной и опытной групп наглядны различия в динамике репаративного остеогенеза (таблица 4.1).

Таблица 4.1 - 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

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.

*Третьи сутки после вмешательства, контрольная группа.*

На 3 сутки у животных контрольной группы послеоперационные раны без признаков воспаления. На рентгенограммах признаков миграции металлоконструкций нет (рисунок 4.4).

При морфологическом исследовании выявлено, что 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 4.5). Признаки формирования эндостальной костной мозоли отсутствуют.



Рисунок 4.4 - Рентгенограмма бедра крысы контрольной группы, 3 сутки

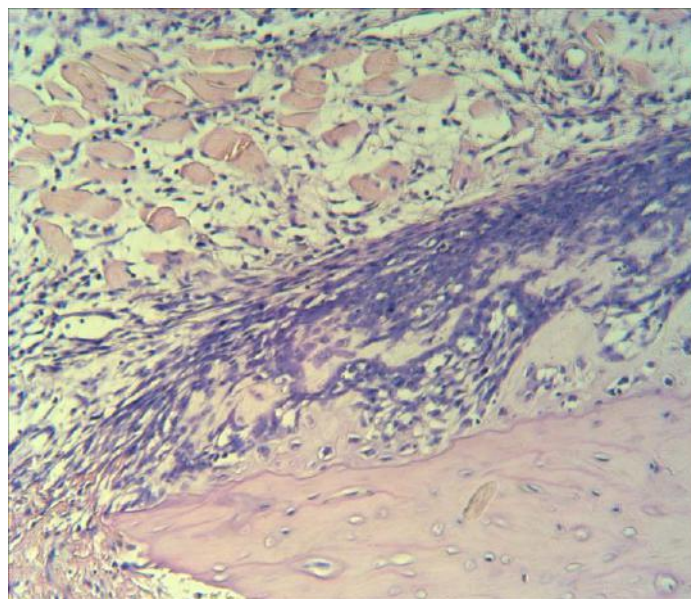


Рисунок 4.5 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости, 3 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 150

*Третьи сутки после вмешательства, опытная группа.*

На 3 сутки у животных опытной группы послеоперационные раны без признаков воспаления. На рентгенограммах признаков миграции металлоконструкций нет, костная мозоль пока не определяется (рисунок 4.6).

При морфологическом исследовании выявлено, что 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 (рисунок 4.7).



Рисунок 4.6 -Рентгенограмма бедра крысы опытной группы, 3 сутки

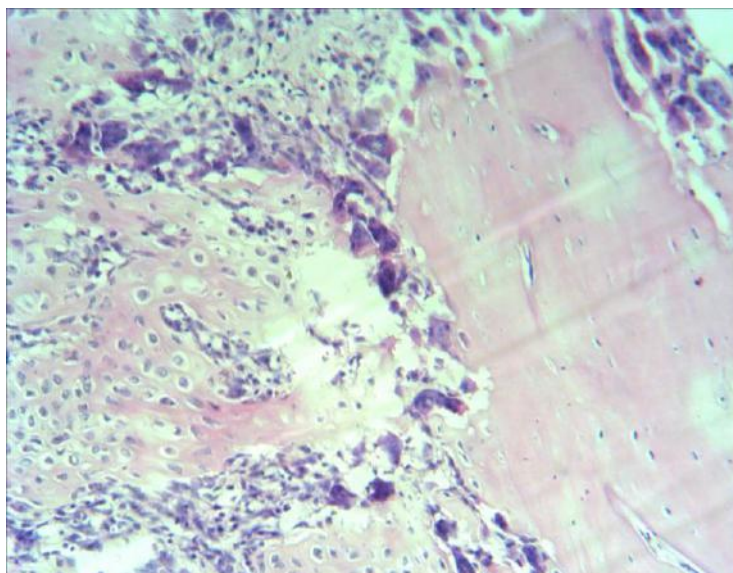


Рисунок 4.7 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (интермедиарная костная мозоль), 3 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 150

Сформирована толстая периостальная костная мозоль толщиной  $0,79 \pm 0,020$  мм, хрящ которой в центральных отделах состоит преимущественно из хондроцитов (АЧП  $31,0 \pm 4/п.з.$ ). Часть этих клеток находится в состоянии вакуолярной дистрофии и лизиса (деградация хряща). В периферических отделах формирующейся периостальной мозоли число остеобластов достигает  $66,0 \pm 5,0/п.з.$ , а остеоцитов –  $10,0 \pm 2,0/п.з.$ , то есть преобладают процессы остеогенной дифференцировки клеток (рисунок 4.8).

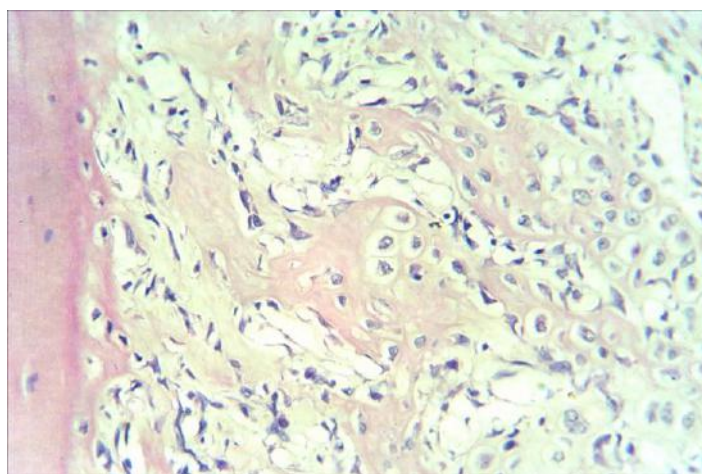


Рисунок 4.8 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (периостальная костная мозоль), 3 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.150

В эндостальной зоне перелома заметны признаки пролиферации клеток эндоста с миграцией в интермедиарную зону, на границе с которой формируется тонкая прослойка хряща. Отмечается реакция остеокластов, АЧП которых составляет  $3,0 \pm 1,0$ /п.з. (рисунок 4.9). Эндостальная костная мозоль в центральных отделах представлена значительным числом пролиферирующих механоцитов (АЧП  $411,0 \pm 25,0$ /п.з.) с отсутствием признаков хондро- или остеогенной дифференцировки. Число эндотелиоцитов (АЧП  $25,0 \pm 3,0$ /п.з.) двукратно превосходит этот же показатель в группе контроля (АЧП  $13,0 \pm 2,0$ /п.з.).

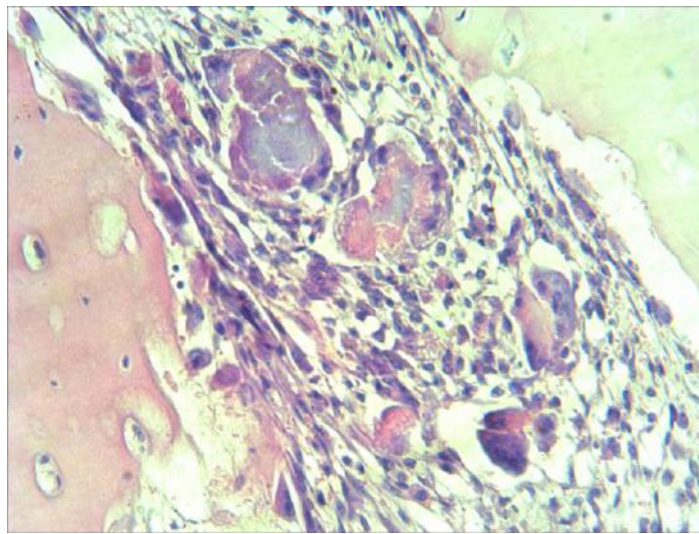


Рисунок 4.9 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (эндостальная костная мозоль), 3 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.300

*Седьмые сутки после вмешательства, контрольная группа.*

На 7 сутки у животных контрольной группы на рентгенограммах признаков костной мозоли пока не определяется, остеосинтез стабилен (рисунок 4.10).

При морфологическом исследовании 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 (п.з.). В небольшом количестве появляется волокнистый матрикс, в котором относительная объёмная плотность (ООП) коллагена I типа составляет  $4,83 \pm 1,02\%$  (рисунок 4.11), также отмечаются группы остеобластов с АЧП  $33,0 \pm 5,0$ /п.з.). Остеокласты единичны (АЧП = 1-2/п.з.), резорбция костных отломков не выражена (рисунок 4.12).



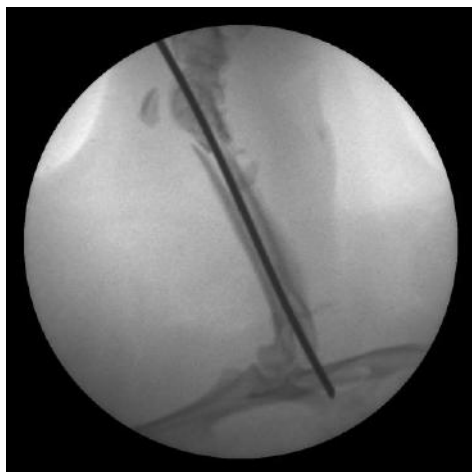


Рисунок 4.10 - Рентгенограмма бедра крысы контрольной группы, 7 суток

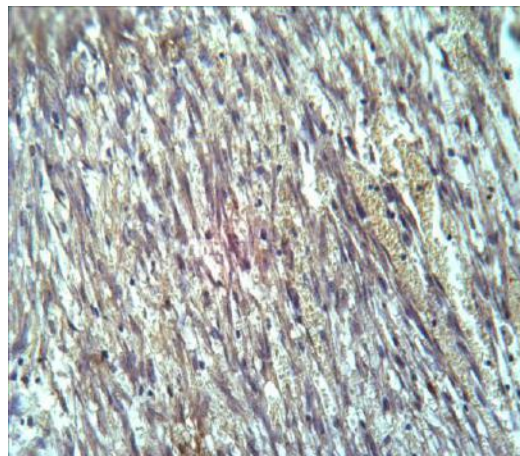


Рисунок 4.11 - Крыса. Контрольная группа, 7 суток, интермедиарная зона перелома (мозоль), иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии коллагена I типа (коричневого цвета). Ув. 300

Хрящ периостальной костной мозоли толщиной  $1,25 \pm 0,14$  мм состоит из хондробластов и хондроцитов (АЧП хондробластов и хондроцитов составляет  $165,0 \pm 15,0$ /п.з.), незначительная часть которых находится в состоянии вакуолярной дистрофии и лизиса (рисунок 4.13).

В эндостальной зоне перелома заметны признаки пролиферации клеток эндоста с дифференцировкой в остеобласты (АЧП остеобластов =  $33,0 \pm 4,0$ /п.з.) и незрелой ретикулофиброзной костной ткани, частично заполняющей костномозговой канал в области костных отломков (рисунок 4.14).

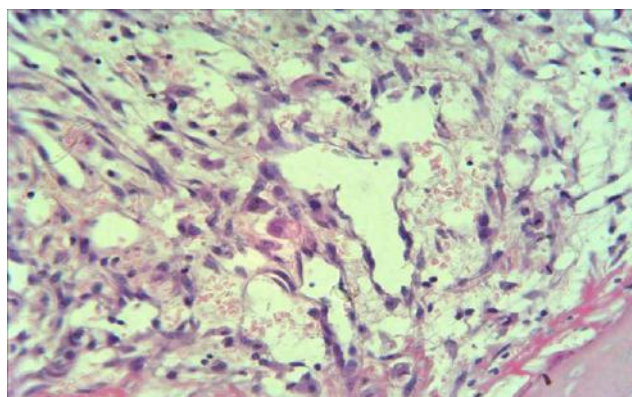


Рисунок 4.12 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (интермедиарная костная мозоль), 7 суток. Окраска гематоксилин-эозин.

Ув.300

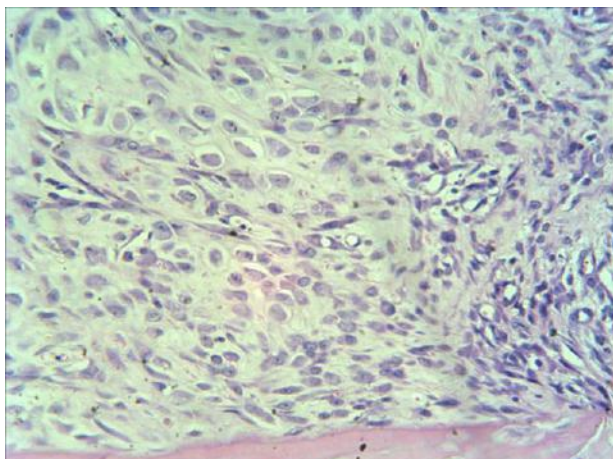


Рисунок 4.13 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (периостальная костная мозоль), 7 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 300

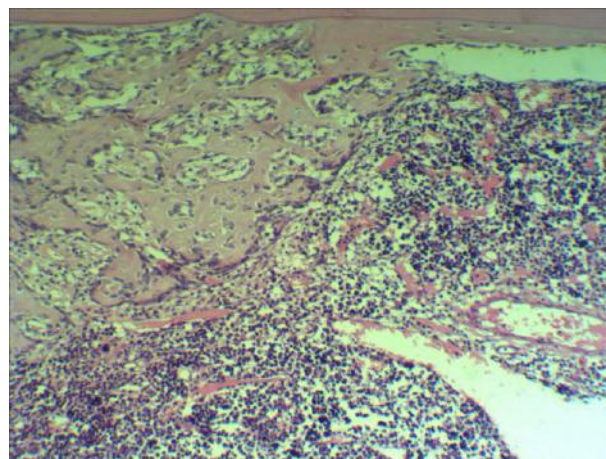


Рисунок 4.14 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (эндостальная костная мозоль), 7 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 150

*Седьмые сутки после вмешательства, опытная группа.*

На 7 сутки у животных опытной группы на рентгенограммах признаков костной мозоли пока не определяется, как и в контрольной группе, остеосинтез стабилен (рисунок 4.15).

При морфологическом исследовании выявлено, что со стороны периостальных зон перелома 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 (АЧП эндотелиоцитов  $27,0 \pm 3,0$ /п.з.) с обилием волокнистого матрикса (рисунок 4.16) и пролиферирующих остеобластов. ООП коллагена I типа составляет  $7,23 \pm 1,02\%$ , АЧП остеобластов составляет  $173,0 \pm 17,0$ /п.з. (рисунок 4.17).



Рисунок 4.15 - Рентгенограмма бедра крысы опытной группы, 7 суток

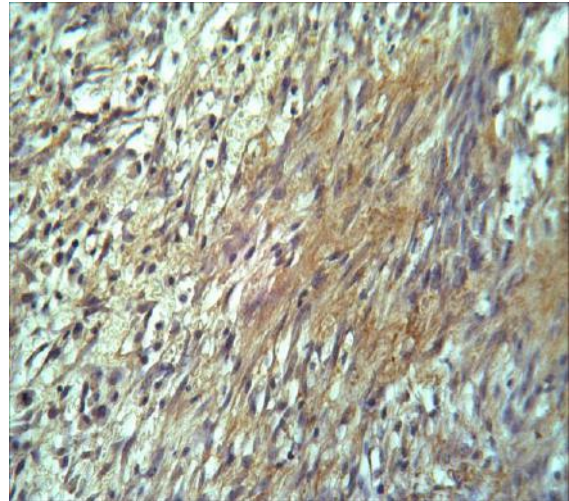


Рисунок 4.16 - Крыса. Опытная группа, 7 суток, интермедиарная зона перелома (мозоль), иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии коллагена I типа (коричневого цвета).  
Ув. 300

Периостальная костная мозоль деградирует за счёт лизиса хондроцитов и формирования очагов резорбции с замещением хряща на хорошо васкуляризованную волокнистую соединительную ткань с формированием остеогенных островков ретикулофиброзной кости (рисунок 4.18).

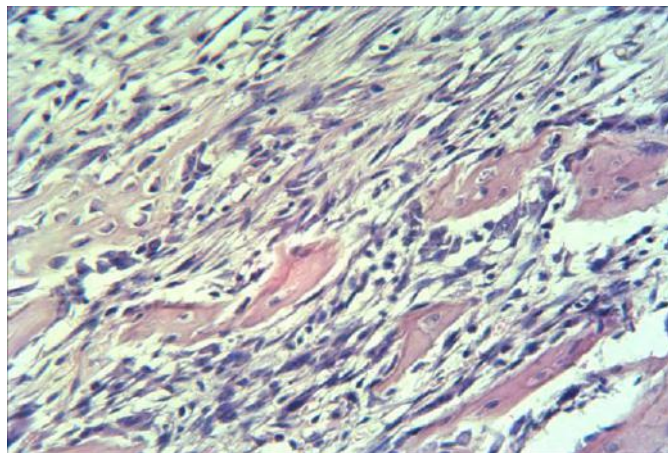


Рисунок 4.17 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (интермедиарная костная мозоль), 7 суток. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 300



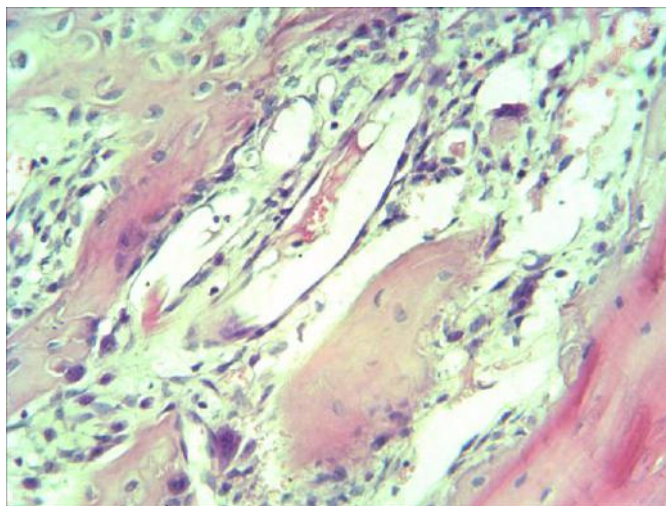


Рисунок 4.18 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (периостальная костная мозоль), 7 сутки. Окраска гематоксилин-эозин.

Ув.300

Со стороны эндоста, контактирующего с интермедиарной зоной, сформирована тонкая прослойка эндостальной костной мозоли. Она переходит в интермедиарную мозоль. Эндостальная костная мозоль представлена деградирующим хрящом с формированием костных балок, состоящих из остеобластов и незрелого внеклеточного остеоидного матрикса. Остеокласты (АЧП  $5,0 \pm 2,0$ /п.з.) формируют многочисленные лакуны резорбции (рисунок 4.19).

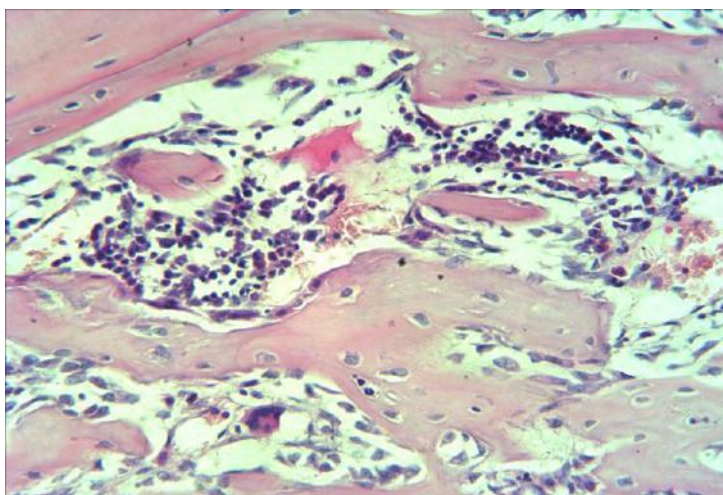


Рисунок 4.19 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (эндостальная костная мозоль), 7 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 300



Таким образом, при морфологическом изучении уже на 7-е сутки заметно различие в репаративных процессах у крыс опытной и контрольной групп. В тканях интермедиарной зоны у крыс опытной группы больше волокнистого матрикса и остеогенных клеток. В периостальной зоне более развита грануляционная ткань. А в эндостальной зоне более интенсивно, чем у животных контрольной группы, идут процессы резорбции.

*Четырнадцатые сутки после вмешательства, контрольная группа.*

На рентгенограммах крыс контрольной группы по-прежнему признаков костной мозоли не видно (рисунок 4.20). Послеоперационные раны зажили без признаков воспаления.

На 14 сутки в интермедиарной зоне перелома на фоне остатков редуцирующейся грануляционной ткани появляется волокнистый матрикс (ООП коллагена I типа составляет  $9,24 \pm 2,14\%$ ) с группами остеобластов, АЧП которых равно  $93,0 \pm 8,0/\text{п.з.}$  (рисунок 4.21). Остеокласты (АЧП =  $3,0 \pm 1,0/\text{п.з.}$ ) активно участвуют в резорбции костных отломков.

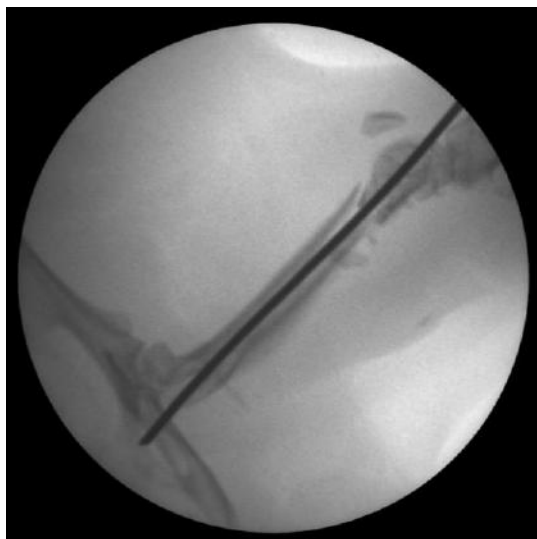


Рисунок. 4.20 - Рентгенограмма бедра крысы контрольной группы, 14 сутки

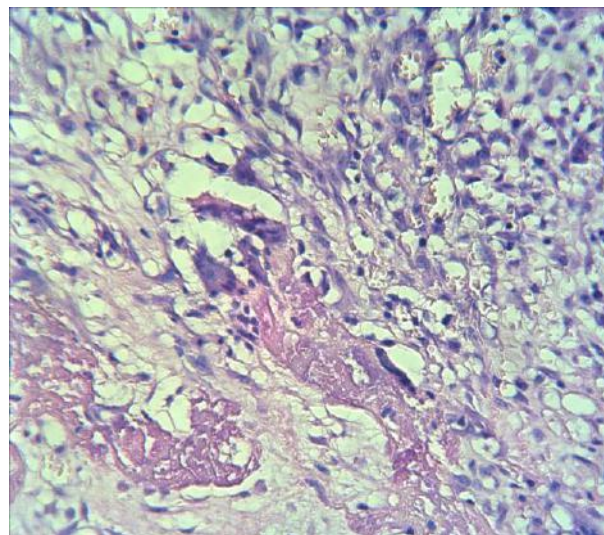


Рисунок 4.21 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (интермедиарная костная мозоль), 14 сутки. Окраска гематоксилин-эозин.

Периостальная костная мозоль деградирует за счёт лизиса хондроцитов (АЧП  $44,0 \pm 5,0$ /п.з.) и формирования очагов резорбции с замещением хряща на волокнистую соединительную ткань. Небольшие тяжи хряща периостальной костной мозоли проникают в интермедиарную зону, образуя, таким образом, хрящевой компонент интермедиарной костной мозоли (рисунок 4.22).

Эндостальная костная мозоль представлена деградирующим хрящом и формирующимися костными балками, которые состоят преимущественно из остеобластов (АЧП =  $79,0 \pm 6,0$ /п.з.) и незрелого внеклеточного остеидного матрикса (ООП коллагена I типа составляет  $3,33 \pm 1,01\%$ ). Остеокласты формируют многочисленные лакуны резорбции. Эндостальная костная мозоль глубоко заполняет весь просвет костномозгового канала и переходит в интермедиарную мозоль (рисунок 4.23).

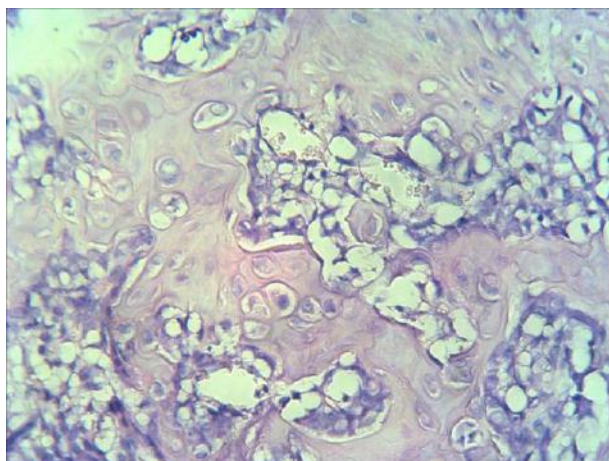


Рисунок 4.22 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (периостальная костная мозоль на границе с интермедиарной), 14 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 300

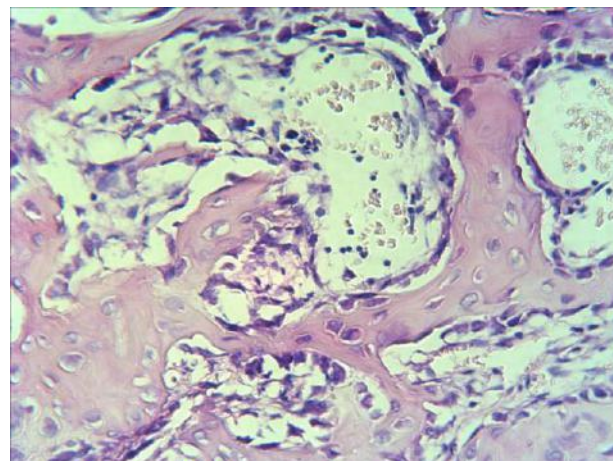


Рисунок 4.23 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (эндостальная костная мозоль), 14 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.300

*Четырнадцатые сутки после вмешательства, опытная группа*

При рентгенологическом исследовании области переломов животных опытной группы можно наблюдать признаки формирующейся костной мозоли (рисунок 4.24). Даже при имеющейся у некоторых крыс деформации оси бедра в условиях остеосинтеза (которая была сразу после операции), происходит формирование костной мозоли (рисунок 4.25). Следует отметить, что к этому сроку все животные нагружали оперированную конечность.

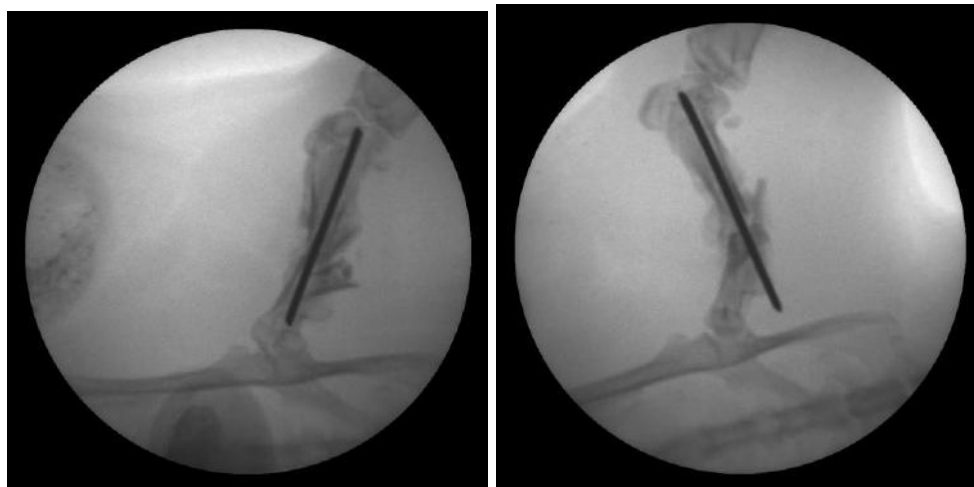


Рисунок 4.24 - Рентгенограмма бедра крысы опытной группы, 14 сутки

Рисунок 4.25 - Рентгенограмма бедра крысы опытной группы, 14 сутки

На 14 сутки в опытной группе интермедиарная костная мозоль представлена остатками деградирующего хряща и очагами формирования пластинчатой кости, состоящими преимущественно из остеобластов ( $AЧП = 108,0 \pm 9,0 / \text{п.з.}$ ), а также значительного числа остеоцитов ( $AЧП = 91,0 \pm 6,0 / \text{п.з.}$ ) и незрелого внеклеточного остеидного матрикса (рисунок 4.26). 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. Периостальная костная мозоль, так же как и периферические отделы интермедиарной, представлена остатками деградирующего хряща и очагами формирования незрелой пластинчатой кости (рисунок 4.27).

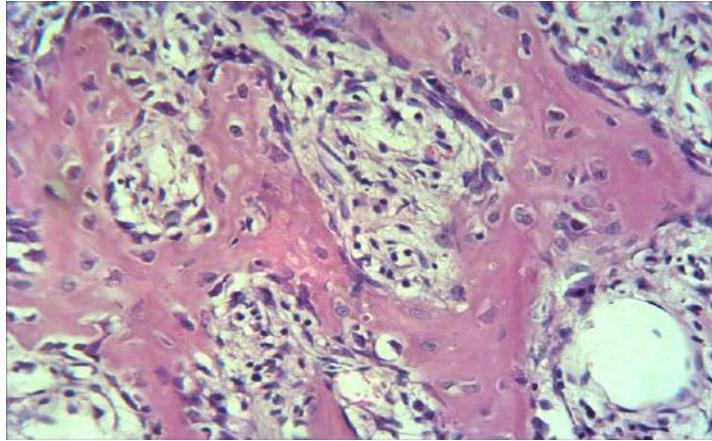


Рисунок 4.26 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (интермедиарная костная мозоль), 14 сутки. Окраска гематоксилин-эозин.

Ув.300

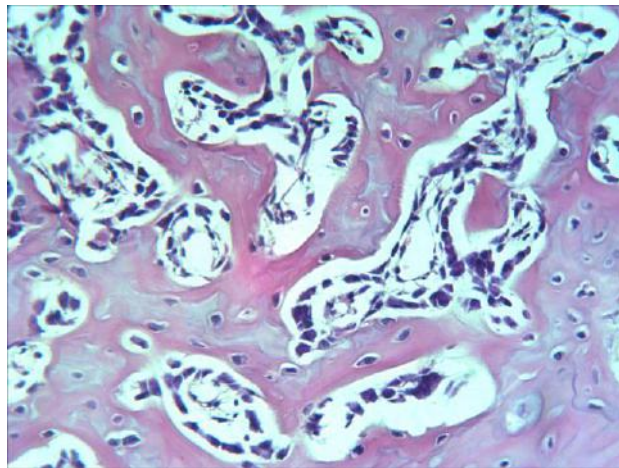


Рисунок 4.27 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (периостальная костная мозоль), 14 сутки. Окраска гематоксилин-эозин.

Ув. 300

Эндостальная костная мозоль представлена сформированными костными балками, состоящими из остеобластов (АЧП =  $95,0 \pm 7,0$ /п.з.) и остеоцитов (АЧП  $55,0 \pm 4,0$ /п.з.), рисунок 4.28. ООП коллагена I типа внеклеточного остеοидного матрикса составляет  $6,97 \pm 1,52\%$ , что говорит о зрелости матрикса. При этом новообразованные балки эндостальной мозоли активно разрушаются многочисленными остеокластами (АЧП =  $7,0 \pm 2,0$ /п.з.), за счёт формирования лакун резорбции (рисунок 4.29).



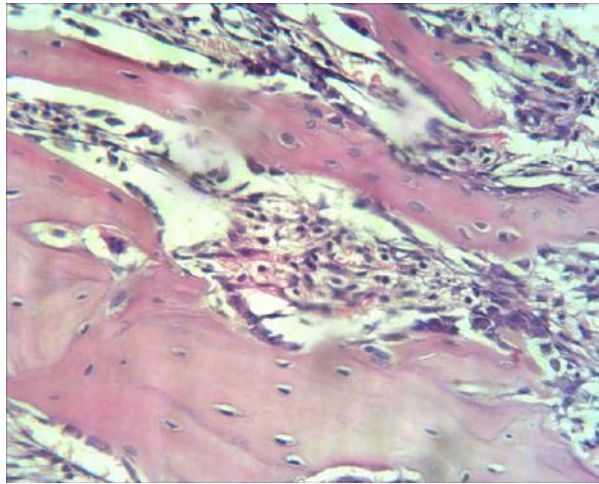


Рисунок 4.28 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (эндостальная костная мозоль), 14 сутки. Окраска гематоксилин-эозин.

Ув.300

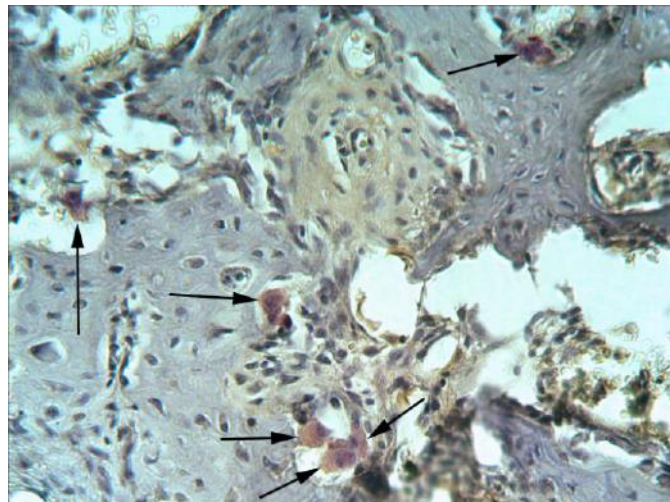


Рисунок 4.29 - Крыса. Опытная группа, 14 сутки, эндостальная зона перелома (мозоль), иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии CD68 (коричневого цвета) –маркера макрофагов и в т.ч. остеокластов (указаны стрелками). Ув. 300

*Двадцать первые сутки после вмешательства, контрольная группа.*

На рентгенологическом контроле в контрольной группе видны признаки формирующейся хрящевой мозоли (рисунок 4.30).

При гистологическом исследовании интермедиарная костная мозоль по-прежнему представлена очагами редуцирующейся грануляционной ткани и широкими участками волокнистого матрикса (ООП коллагена I типа составляет

11,25±2,12%, рисунок 4.31) с группами пролиферирующих остеогенных клеток (АЧП= 120,0±4,0/п.з.), как представлено на рисунке 4.32.



Рисунок 4.30 - Рентгенограмма бедра крысы контрольной группы, 21 сутки

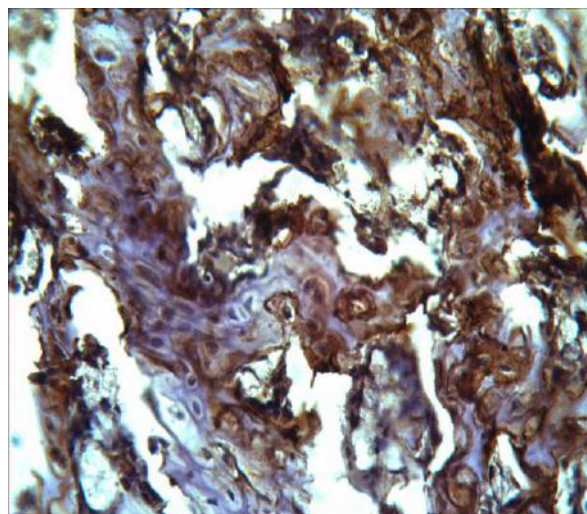


Рисунок 4.31 - Крыса. Контрольная группа, 21 сутки, интермедиарная зона перелома (мозоль), иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии коллагена I типа (коричневого цвета). Ув. 300

Периостальная костная мозоль, так же как и периферические отделы интермедиарной, представлена остатками деградирующего хряща (АЧП хондробластов и хондроцитов равно 65,0±7,0/п.з.) и очагами формирования незрелой ретикулофиброзной кости, АЧП остеобластов и остеоцитов которой составляет 140,0±11,0/п.з. (рисунок 4.33). При этом хрящ дистальных отделов периостальной мозоли практически полностью замещён трабекулами пластинчатой кости.

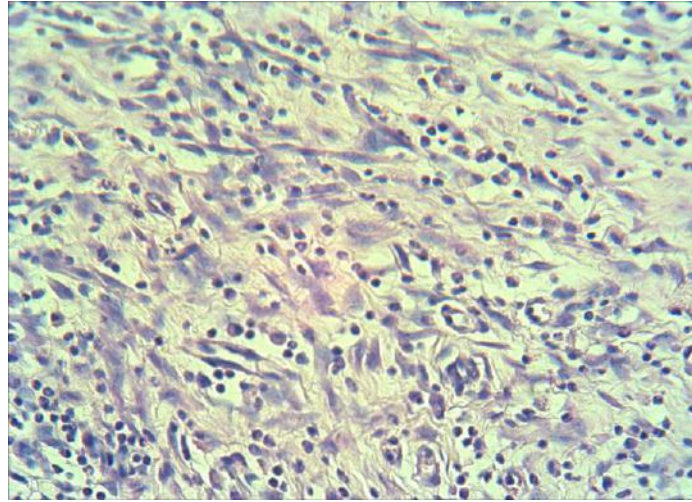


Рисунок 4.32 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (интермедиарная костная мозоль), 21 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 300

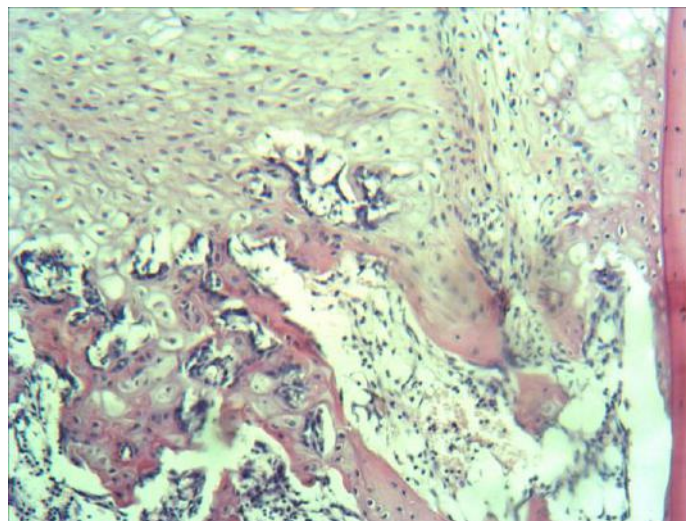


Рисунок 4.33 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (периостальная костная мозоль), 21 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.150

Широкую эндостальную костную мозоль формируют костные балки, состоящие из остеобластов ( $AЧП = 83,0 \pm 7,0 / \text{п.з.}$ ) небольшого числа остеоцитов ( $AЧП = 9,0 \pm 2,0 / \text{п.з.}$ ), замурованных в остеοидный матрикс, ООП коллагена I типа в котором составляет  $8,47 \pm 1,63\%$  (рисунок 4.34).



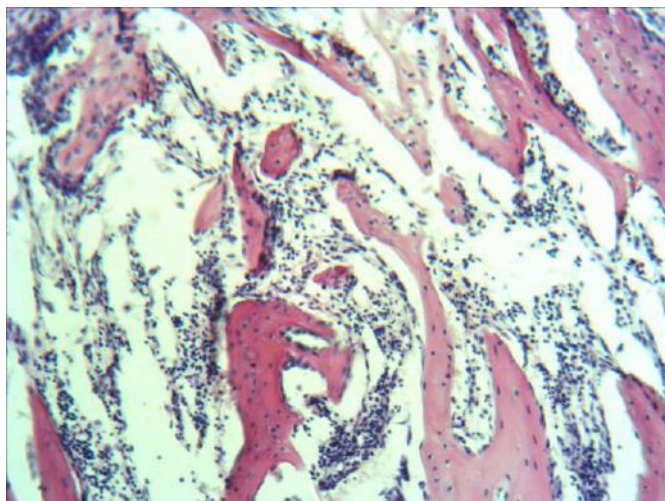


Рисунок 4.34 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (эндостальная костная мозоль), 21 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 150

*Двадцать первые сутки после вмешательства, опытная группа.*

На рентгенограммах животных опытной группы уже видны признаки костной мозоли (рисунок 4.35). Мелкие отломки перелома включены в костную мозоль.

На 21 сутки у животных опытной группы вся площадь (периферические и центральные отделы) интермедиарной костной мозоли представлена остатками деградирующего хряща и очагами формирования ретикулофиброзной кости. Последняя состоит преимущественно из остеобластов (АЧП =  $155,0 \pm 12,0$ /п.з., рис.4.36) и незрелого внеклеточного остеидного матрикса (ООП коллагена I типа =  $20,7 \pm 3,71\%$ ), как видно из рисунка 4.25.



Рисунок 4.35 - Рентгенограмма бедра крысы опытной группы, 21 сутки

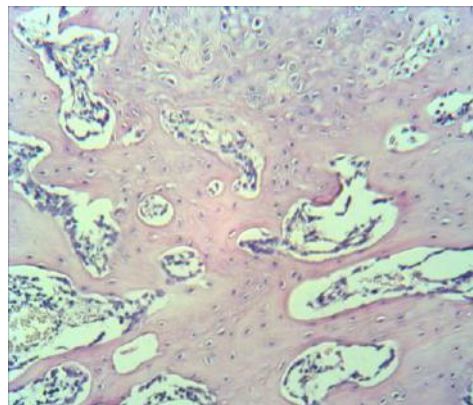


Рисунок 4.36 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (интермедиарная костная мозоль), 21 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 150



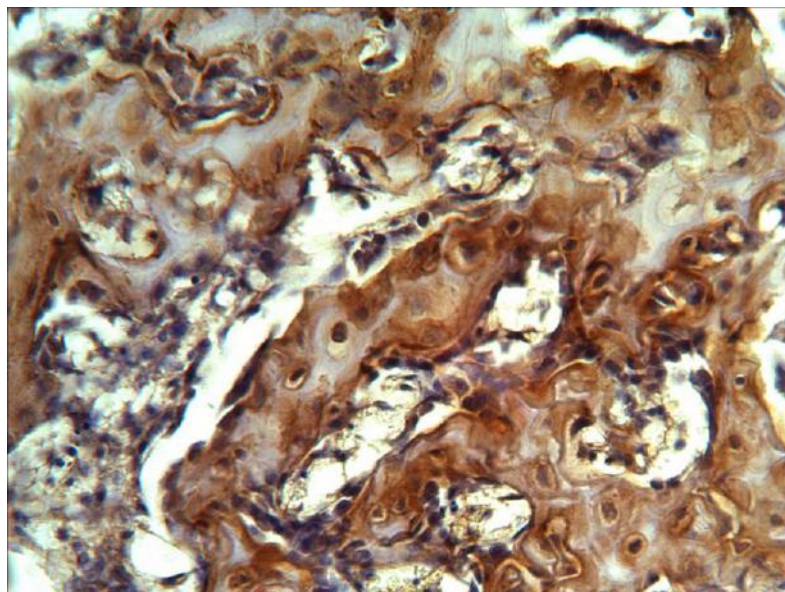


Рисунок 4.37 - Крыса. Опытная группа, 21 сутки, интермедиарная зона перелома (мозоль), иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии коллагена I типа (коричневого цвета). Ув. 300

Периостальная костная мозоль представлена широкими полями формирующейся ретикулофиброзной кости и лишь небольшими очагами деградирующего хряща, в котором АЧП хондроцитов равна  $4,0 \pm 1,0$ /п.з. (рисунок 4.38).

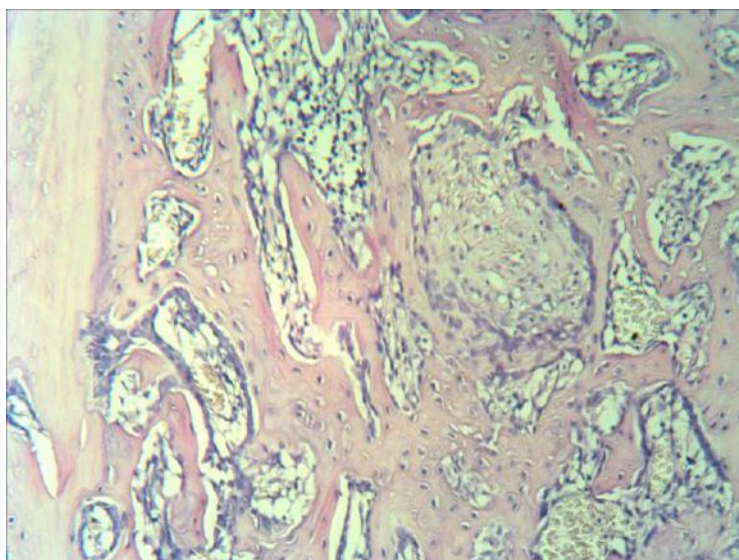


Рисунок 4.38 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (периостальная костная мозоль), 21 сутки. Окраска гематоксилин-эозин.

Ув. 150

Эндостальная костная мозоль представлена узкой полоской грубоволокнистой кости (ООП коллагена I типа  $19,24 \pm 3,25\%$ ), сформированной

костными балками, на границе с интермедиарной зоной. При этом новообразованные балки эндостальной мозоли активно разрушаются многочисленными остеокластами ( $AЧП = 5,0 \pm 2,0/п.з.$ ), за счёт формирования лакун резорбции (рисунок 4.39).

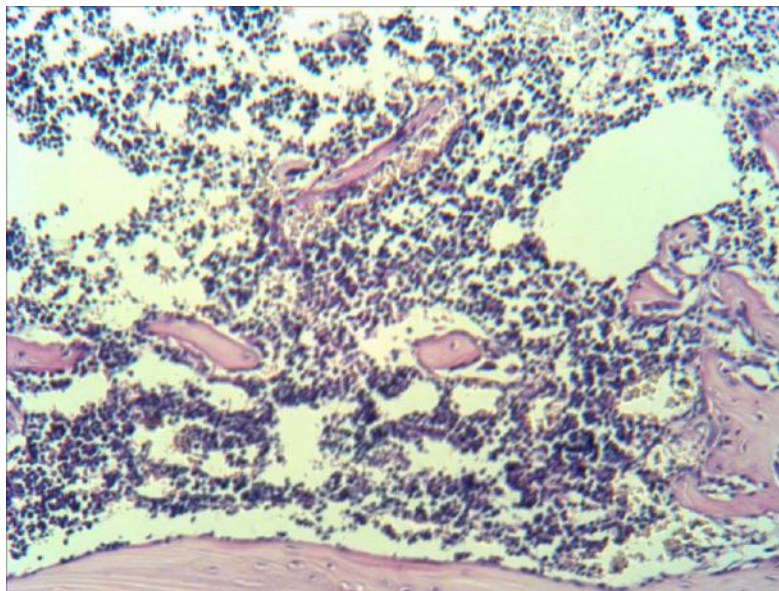


Рисунок 4.39 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (эндостальная костная мозоль на границе с интермедиарной), 21 сутки.

Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 150

*Двадцать восьмые сутки (4 недели) после вмешательства, контрольная группа.*

Только на 28 сутки в контрольной группе на рентгенограммах становятся видны признаки костной мозоли (рисунок 4.40). На гистологических препаратах интермедиарная костная мозоль представлена широкими полями деградирующего хряща ( $AЧП$  хондроцитов равна  $43,0 \pm 6,0/п.з.$ ) в центральном отделе и узкими очагами формирования ретикулофиброзной кости на периферии. Последняя состоит преимущественно из остеобластов и незрелого внеклеточного остеидного матрикса, с ООП коллагена I типа  $16,23 \pm 2,21\%$  (рисунок 4.41).

Периостальная костная мозоль представлена полями формирующейся грубоволокнистой кости с преобладанием остеобластов ( $AЧП = 91,0 \pm 8,0/п.з.$ ) и зрелого хряща с признаками деградации (рисунок 4.42). Очаги ещё сохранённого



хряща локализованы преимущественно в поверхностных отделах и центре периостальной мозоли толщиной  $2,11 \pm 0,15$  мм, переходя в хрящ центрального отдела интермедиарной костной мозоли.

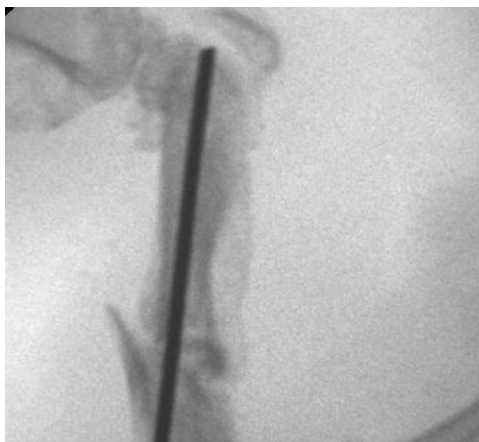


Рисунок 4.40 - Рентгенограмма бедра крысы контрольной группы, 28 суток

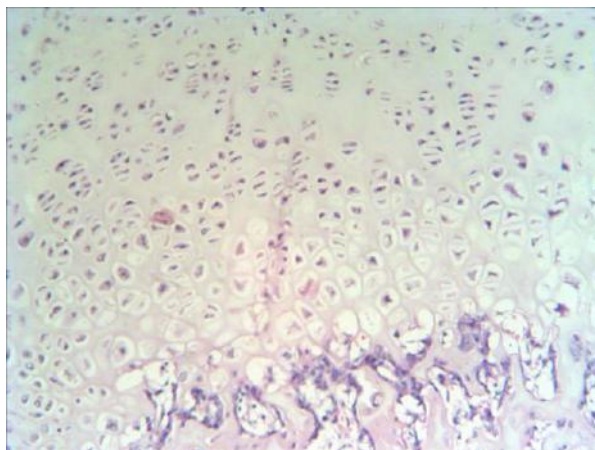


Рисунок 4.41 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (интермедиарная костная мозоль), 28 суток. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 150

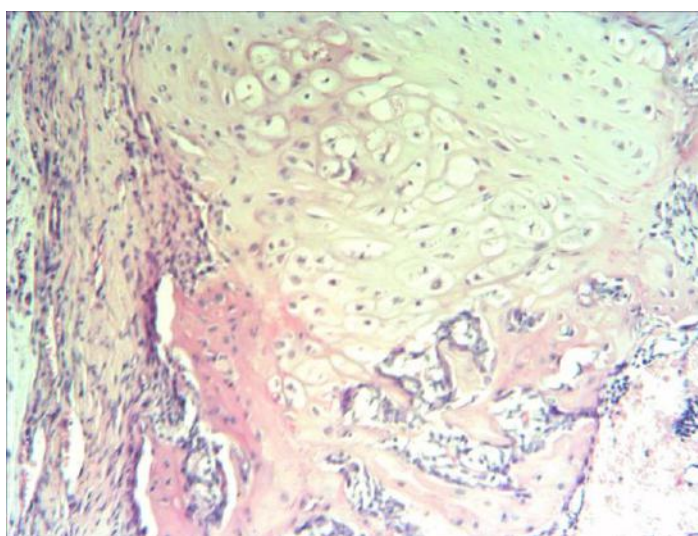


Рисунок 4.42 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (периостальная костная мозоль), 28 суток.  
Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 150

Эндостальная костная мозоль представлена сформированными костными балками ретикулофиброзной кости (АЧП остеобластов и остеоцитов составляет

1110,0±12,0/п.з.), подвергающимся резорбции остеокластами с АЧП равной 10,0±3,0/п.з. (рисунок 4.43) и глубоко пронизывающими костномозговой канал в дистальном направлении (рисунок 4.44).

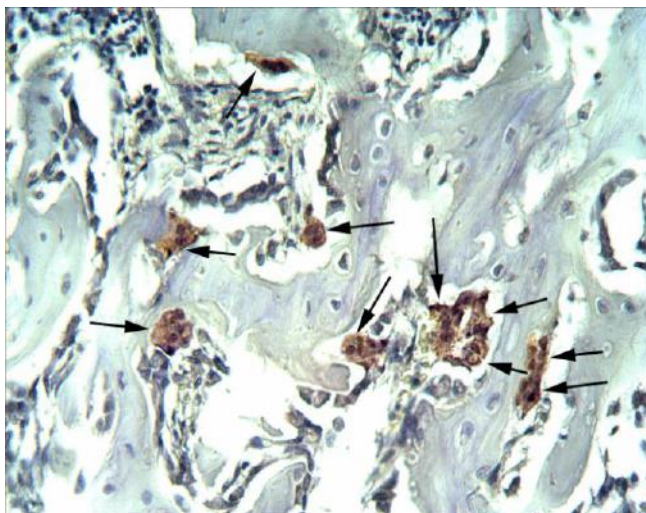


Рисунок 4.43 - Крыса. Контрольная группа, 28 суток, интермедиарная зона перелома (мозоль), иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии CD68 (коричневого цвета) – маркера макрофагов и в т.ч. остеокластов (указаны стрелками). Ув. 300

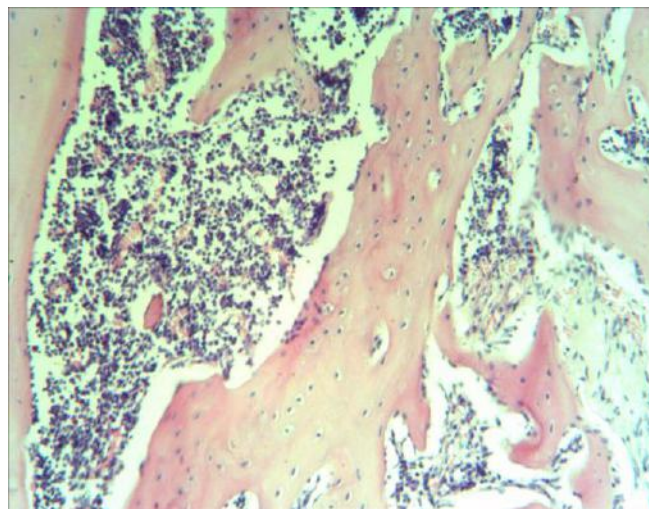


Рисунок 4.44 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (эндостальная костная мозоль), 28 суток. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 150

*Двадцать восьмые сутки (4 недели) после вмешательства, опытная группа.*

На рентгенограммах опытной группы четко прослеживается костная мозоль (рисунок 4.45). Вся площадь интермедиарной костной мозоли представлена формирующимися балками незрелой грубоволокнистой кости, состоящей из остеобластов (АЧП = 66,0±5,0/п.з.) и остеоцитов (АЧП = 108,0±9,0/п.з.), замурованных в остеонидный матрикс, ООП коллагена I типа в котором составляет 29,85±4,01% (рисунок 4.46). И только в центральных отделах сохраняются очаги деградирующего гиалинового хряща.



Рисунок 4.40 - Рентгенограмма бедра крысы опытной группы, 28 суток

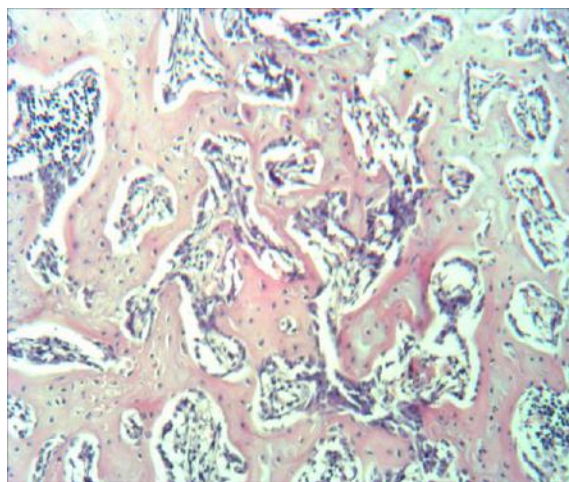


Рисунок 4.46 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (интермедиарная костная мозоль), 28 суток. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 150

Периостальная костная мозоль истончена и представлена узкими полями балок ретикулофиброзной кости, активно подвергающимся резорбции остеокластами ( $AЧП = 5,0 \pm 2,0 / п.з.$ ) и лишь небольшим участком деградирующего хряща на границе дистального и проксимального костных отломков. Здесь костная мозоль остается утолщённой до  $1,65 \pm 0,12$  мм (рисунок 4.47).

Эндостальная костная мозоль представлена немногочисленными костными балками, которые подвергаются резорбции ( $AЧП$  остеокластов снижается до  $3,0 \pm 1,0 / п.з.$ ), только на границе с интермедиарной зоной (рисунок 4.48).

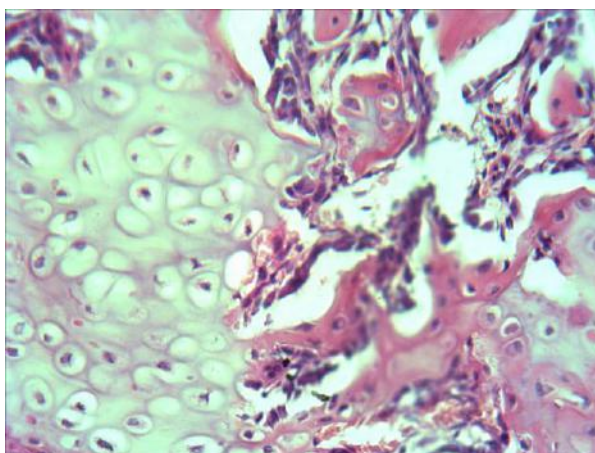


Рисунок 4.47 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (периостальная костная мозоль), 28 суток. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.300



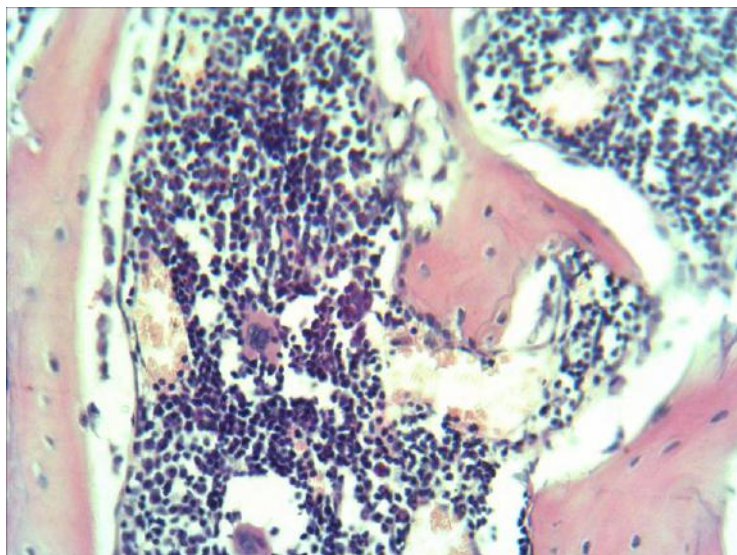


Рисунок 4.48 - Крыса. Опытная группа. Область перелома (эндостальная костная мозоль), 28 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 300

*Сорок четвёртые сутки после вмешательства, контрольная группа.*

На этом сроке у животных контрольной группе заметны рентгенологические признаки костной мозоли (рисунок 4.49).

При гистологическом исследовании интермедиарная костная мозоль состоит из небольших очагов деградирующего хряща (АЧП хондробластов и хондроцитов составляет  $40,0 \pm 5,0$ /п.з., рисунок 4.50) и формирующихся балок ретикулофиброзной кости. Они, в свою очередь, состоят из остеобластов (АЧП= $85,0 \pm 8,0$ /п.з.) и остеоцитов (АЧП =  $105,0 \pm 11,0$ /п.з.), замурованных в остеонидный матрикс, с ООП коллагена I типа равной  $21,23 \pm 4,13\%$  (рисунок 4.51).

Периостальная костная мозоль истончена до  $0,27 \pm 0,08$  мм и представлена узкими полями немногочисленных балок пластинчатой кости, активно подвергающихся резорбции остеокластами (АЧП =  $4,0 \pm 1,0$ /п.з.). В центре консолидированного перелома обнаруживается небольшой участок деградирующего хряща. Эндостальная костная мозоль представлена подвергающимися резорбции многочисленными костными широкими балками пластинчатой кости, которые глубоко пронизывают костномозговой канал в дистальном направлении (рисунок 4.52).



Рисунок 4.49 - Рентгенограмма бедра крысы контрольной группы, 44 сутки

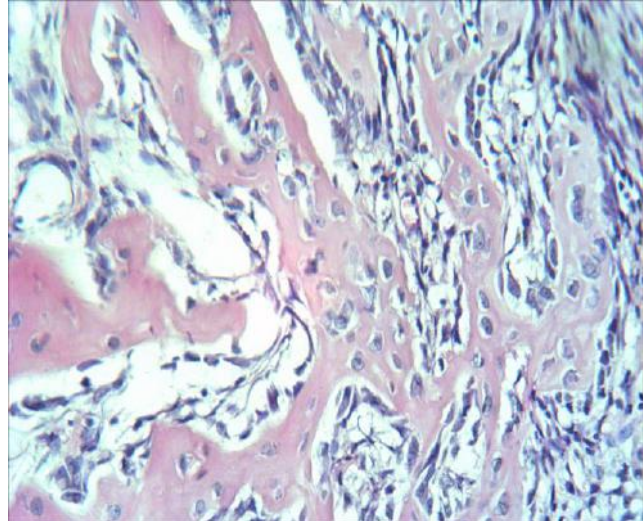


Рисунок 4.50 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (интермедиарная костная мозоль), 44 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 300

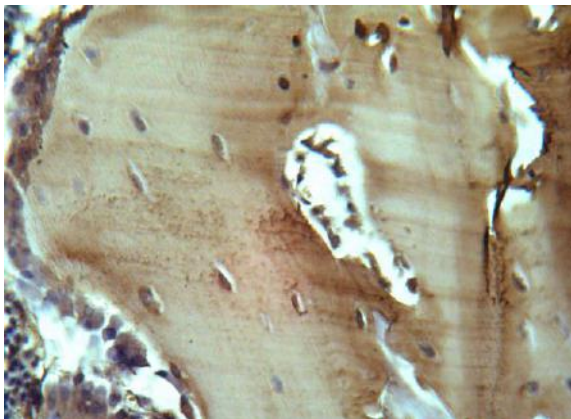


Рисунок 4.51 - Крыса. Контрольная группа, 44 сутки, периостальная зона перелома

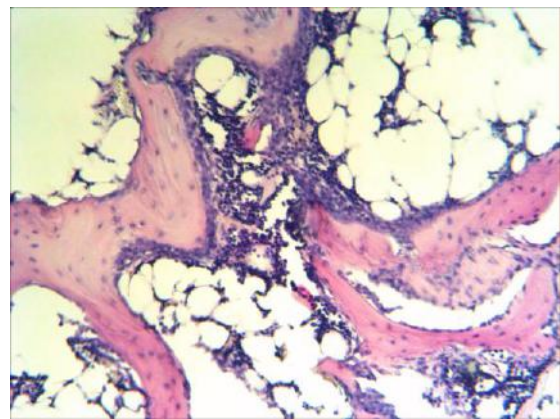


Рисунок 4.52 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (эндостальная костная мозоль), 44 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 150

*Сорок четвёртые сутки после вмешательства, опытная группа.*

На 44 сутки в опытной группе намечается ремоделирование интермедиарной костной мозоли в диафиз трубчатой кости. Признаки этого процесса отмечаются на контрольных рентгенограммах (рисунки 4.53, 4.54).

При гистологическом исследовании выявлено, что 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 (рисунок 4.55). Экспрессия коллагена I типа (ООП  $42,43 \pm 2,21\%$ ) на этом сроке возрастает на четверть и, по-прежнему, двукратно больше таковой группы контроля (ООП контрольной группы  $21,23 \pm 1,94\%$ , рисунок 4.56).



Рисунок 4.53 - Рентгенограмма крысы опытной группы, «общий план», 44 сутки

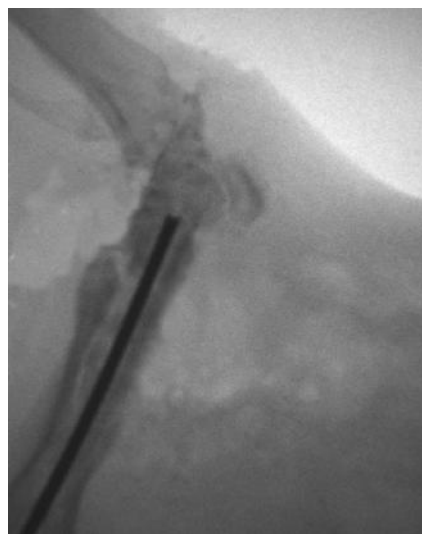


Рисунок 4.54 - Рентгенограмма крысы опытной группы, 44 сутки

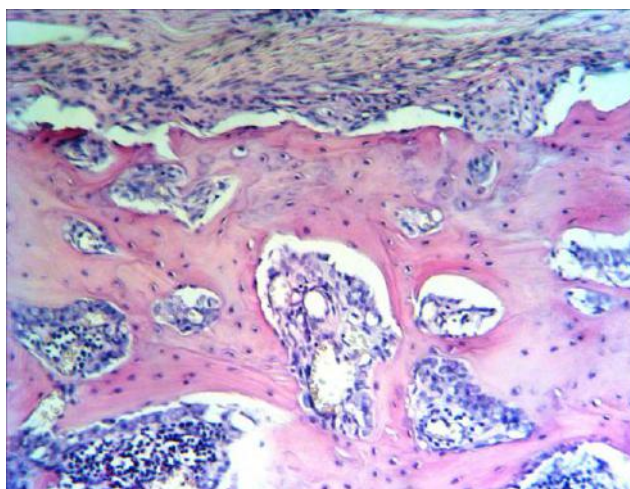


Рисунок 4.55 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (интермедиарная костная мозоль), 44 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.150



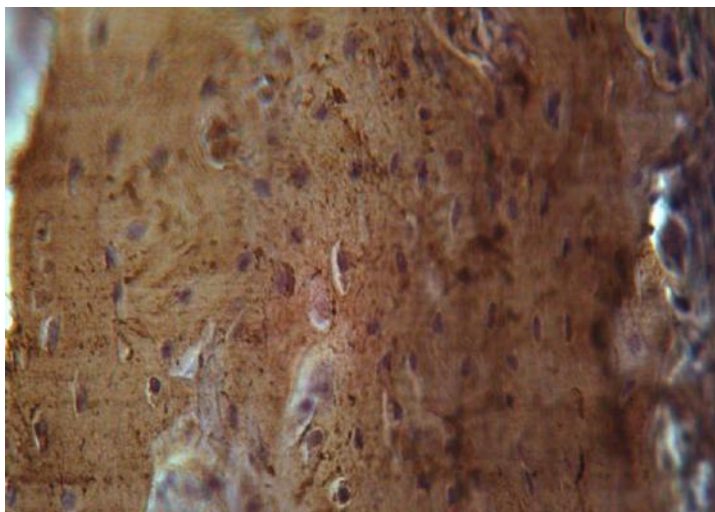


Рисунок 4.56 - Крыса. Опытная группа, 44 сутки, периостальная зона перелома (мозоль), иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии коллагена I типа (коричневого цвета), Ув. 500

Периостальная костная мозоль толщиной  $0,102 \pm 0,05$  мм, сохранившись небольшим участком на границе с интермедиарной костной мозолью, на остальном протяжении преобразована в надкостницу. Она состоит из хорошо различимых, внутреннего (остеогенного) и наружного (фиброзного) слоев с АЧП фибробластов в фиброзном слое  $78,0 \pm 6,0$ /п.з.

Эндостальная костная мозоль представлена немногочисленными узкими костными балками пластинчатой кости лишь на границе с интермедиарной зоной, преимущественно у эндоста (рисунок 4.57).

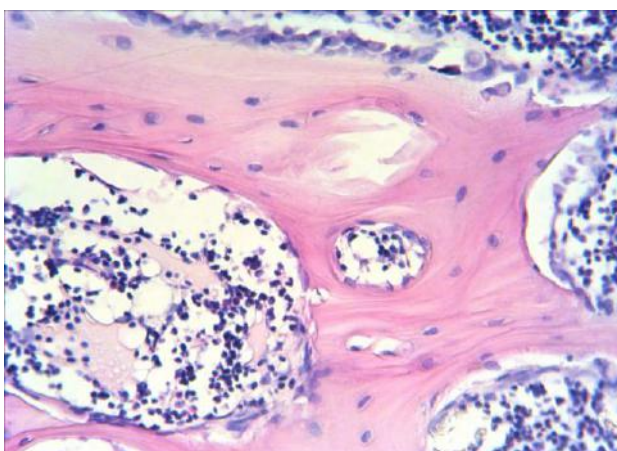


Рисунок 4.57 - Крыса. Опытная группа. Область перелома бедренной кости (эндостальная костная мозоль), 44 сутки.

Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 300

*Шестьдесят первые сутки после вмешательства, контрольная группа.*

На контрольных рентгенограммах заметна консолидация перелома (рисунок 4.58). При гистологическом изучении интермедиарная костная мозоль представлена разросшейся ретикулофиброзной костной тканью. В некоторых местах ещё сохраняются мелкие очаги деградирующего гиалинового хряща (АЧП хондроцитов составляет  $14,0 \pm 3,0$ /п.з.) и немногочисленные костномозговые полости без признаков формирования костномозгового канала (рисунок 4.59).

Периостальная костная мозоль, сохранившись небольшим участком на границе с интермедиарной костной мозолью, на остальном протяжении преобразована в надкостницу. Она состоит из хорошо различимых внутреннего (остеогенного) и наружного (фиброзного) слоев с АЧП фибробластов в фиброзном слое  $68,0 \pm 7,0$ /п.з.



Рисунок 4.58 - Рентгенограмма бедра крысы контрольной группы, 61 сутки

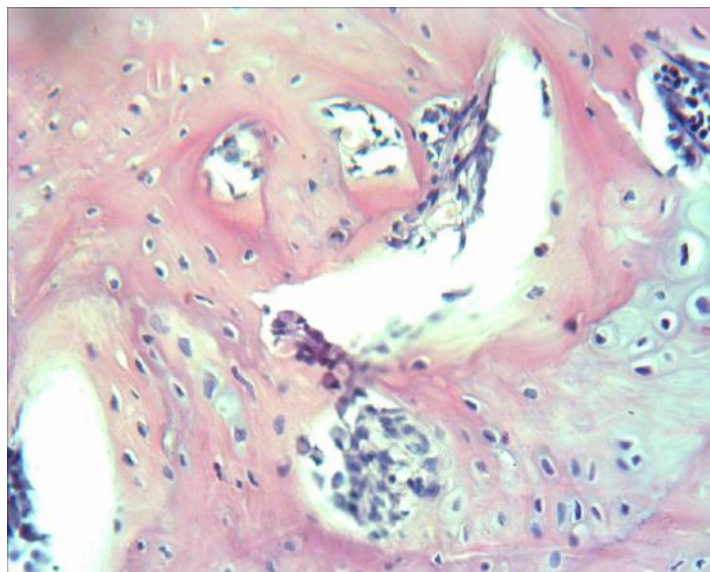


Рисунок 4.59 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (интермедиарная костная мозоль), 61 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 300

Эндостальная костная мозоль представлена немногочисленными, но широкими костными балками грубоволокнистой кости, расположенных преимущественно на границе с интермедиарной зоной и рядом с эндостом (рисунок 4.60).

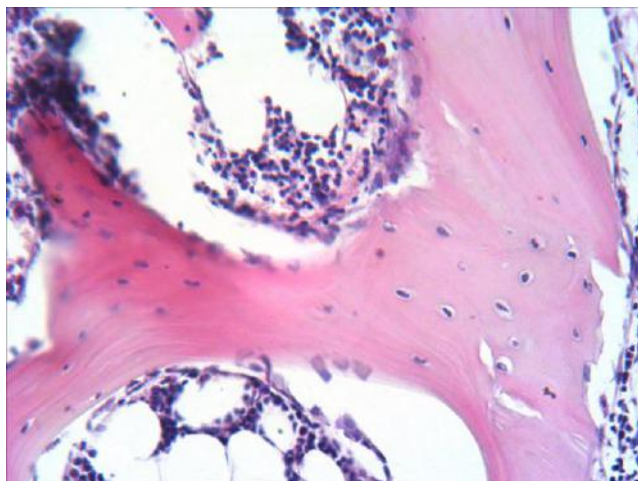


Рисунок 4.60 - Крыса. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости (эндостальная костная мозоль), 61 сутки.

Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 300

*Шестьдесят первые сутки после вмешательства, опытная группа.*

На 61 сутки у животных опытной группы наблюдается полная консолидация перелома (рисунок 4.61). При гистологическом исследовании консолидация подтверждается полноценной перестройкой костной мозоли в диафиз трубчатой кости с органотипичным строением периоста, компактного вещества и эндоста (рисунок 4.62).

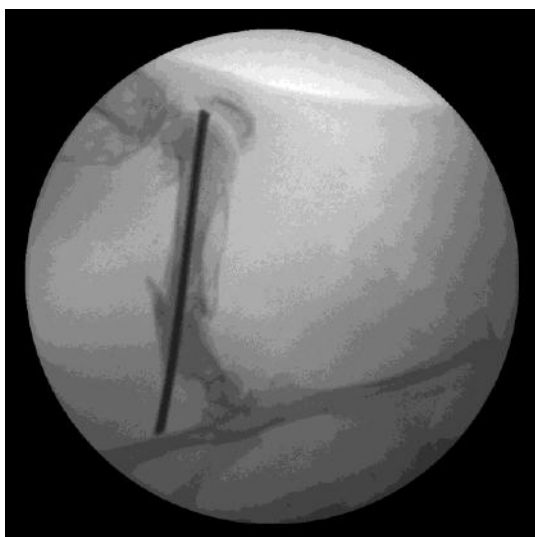


Рисунок 4.61 - Рентгенограмма бедра крысы опытной группы, 61 сутки

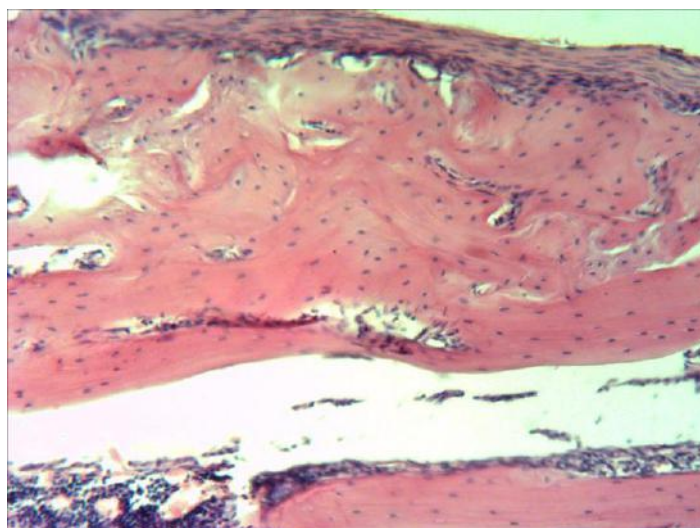


Рисунок 4.62 - Крыса. Опытная группа. Область консолидированного перелома бедренной кости, 61 сутки. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 150

Губчатое вещество восстановленного костномозгового канала на месте бывшей интермедиарной костной мозоли отличается от губчатого вещества диафиза кости вне зоны перелома только большим числом и большей толщиной костных балок (АЧП остеобластов и остеоцитов равна  $42,0 \pm 5,0$ /п.з.). В тоже время костные балки губчатого вещества эндоста и компактная кость диафиза в зоне зажившего перелома всё ещё имеют преимущественно строение ретикулофиброзной костной ткани. Во всём остальном гистологическое строение сформированных в результате репаративного гистогенеза тканей консолидированного участка перелома не отличается от тканей диафиза кости за пределами данной зоны.

Сравнительные данные о содержании коллагена I типа в области интермедиарной костной мозоли приведены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 - Относительная объёмная плотность коллагена I типа в матриксе, %

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

На всех сроках наблюдается достоверное различие в относительном содержании коллагена,  $p \leq 0,05$ .

Сравнительные данные о численности остеогенных клеток в области костной мозоли представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3 - Абсолютная численная плотность остеогенных клеток 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

При анализе видно, что на ранних сроках (3 и 7 сутки после перелома) наблюдалась значительная разница между опытной и контрольной группами в содержании остеобластов и остеоцитов. 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.

\* \* \*

Таким образом, при анализе процессов регенерации бедренной кости после открытого перелома в условиях остеосинтеза, выявлено следующее. При клинических наблюдениях у двух крыс из группы контроля произошло нагноение ран. В опытной группе раны зажили у всех животных. Статистически эти различия в заживлении недостоверны. Однако, стоит упомянуть о работах А.Л. Martí-Carvajal, в которых утверждается об эффективности ФРФ при лечении длительно незаживающих ран. У остальных животных обеих групп наступила консолидация переломов.



При гистологическом изучении обнаружено, что применение метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, лимитировало выраженность воспалительного процесса, сокращая фазу ранних посттравматических изменений. В обеих сравниваемых группах сращение отломков кости проходило хрящевую стадию, но в опытной группе, наряду с формированием более массивной хрящевой манжетки уже к 3-м суткам, наблюдалась и ранняя резорбцию хряща - на 14 сутки. Благодаря своевременной и надежной фиксации отломков периостальной мозолью в опытной группе интермедиарная мозоль начинала формироваться на 7 сутки (в контрольной группе – на 14 сутки). У животных опытной группы уже на 3 сутки наблюдалась значительная активация неоангиогенеза (АЧП эндотелиоцитов  $25,0 \pm 3,0$ /п.з., в контрольной группе данный показатель равен  $7,0 \pm 2,0$ /п.з.). Это обеспечило 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.

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 целом, консолидация перелома диафиза бедренной кости при использовании метаболитов *Bacillus subtilis* 804 происходила быстрее по

сравнению с контрольной группой. Мы считаем, что это обусловлено мощным ангиогенным воздействием входящего в его состав ФРФ, а также влиянием на пролиферативную активность хондрогенных и остеогенных элементов.

Глава 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТАБОЛИТОВ *VACILLUS SUBTILIS* 804, СОДЕРЖАЩИХ ФАКТОР РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ НА РЕПАРАТИВНЫЙ ГИСТОГЕНЕЗ ПРИ ЛЕЧЕНИИ РАН С ДЕФЕКТОМ МЯГКИХ ТКАНЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Мы выполнили моделирование раневого процесса скальпированных ран с дефектом мягких тканей области спины крыс и заживления их после кожной пластики. Исследование было выполнено с использованием 80 белых крыс-самцов линии «Wistar» массой 185 – 215 г. В межлопаточной области у крыс под тиопенталовым наркозом тщательно выбривали кожу и обрабатывали 70 % этиловым спиртом. Восемидесяти крысам были нанесены глубокие скальпированные раны средней площадью 2,25 см<sup>2</sup> (рисунок 5.1).

Раны ежедневно промывали 1% раствором йодопирона, до формирования грануляций (рисунок 5.2). На 10 сутки под тиопенталовым наркозом выполнялась аутодермопластика расщеплённым кожным трансплантатом (рисунок 5.3). 60 крысам при проведении кожной пластики непосредственно перед укладкой трансплантата рану орошали 0,1 мл метаболитов *Bacillus subtilis* 804.



Рисунок 5.1 - Крыса. Модель раны с дефектом мягких тканей



Рисунок 5.2 - Крыса. Рана на 10 сутки после травмы





Рисунок 5.3 - Крыса. Вид раны непосредственно после укладки трансплантата

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. Манипуляции производились по методикам, описанным в главе 2.

*Наблюдения за течением раневого процесса.*

Обращала на себя внимание более быстрая остановка капиллярного кровотечения из «донорских» ран в опытных группах №1 и №2 по сравнению с остальными двумя группами.

*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.

*На вторые сутки* после аутодермопластики у животных опытных групп №1 и №2 трансплантаты были розового цвета, отделяемого из ран не отмечено. В опытной группе №3 у крысы №9 кожный лоскут был синюшного цвета, отёк области раны был более выражен, чем у других животных. В контрольной группе у двух животных кожные лоскуты приобрели темно-коричневый цвет (крысы № 4 и 7). Из ран обильно выделялась серозно-гнойная жидкость. Вокруг ран имелись выраженный отек и гиперемия. Через день произошёл некроз трансплантатов (рисунок 5.4) . У остальных животных контрольной группы кожные лоскуты были бледно-серого цвета.

*На четвёртые сутки* в опытных группах №1 и №2 воспалительные явления в области ран пошли на убыль – отёк спал, лоскуты были розового цвета,

пальпация области ран негативных реакций у животных не вызывала (рисунок 5.5). В опытной группе №3 у крысы №9 произошёл лизис трансплантата, у крысы № 4 – лоскут потемнел, из раны появилось обильное гнойное отделяемое. В дальнейшем этот лоскут также подвергся некрозу. У животных группы контроля воспалительные явления уменьшились.

В последующем лизис трансплантата произошёл ещё у трёх животных – в опытной группе №3 – крыса №15 на десятые сутки, и в контрольной группе – крысы № 12 и 13 – на девятые сутки. У остальных животных отторжения трансплантата не произошло, наблюдалась эпителизация раны.



Рисунок 5.4 - Крыса. Лизис трансплантата на 4 сутки после кожной пластики, контрольная группа



Рисунок 5.5 - Крыса. Вид раны на 3 сутки после пластики, опытная группа №1

*На пятые – седьмые сутки* в опытных группах наблюдалась положительная динамика, осложнений не было.

*В контрольной группе* у трёх животных наблюдалась гибель кожных трансплантатов (рисунок 5.3) (на пятые сутки - крыса №5, седьмые сутки – крысы №16, 19). На седьмые сутки по пять крыс из каждой группы были выведены из опыта.

*Седьмые сутки после пересадки кожи, контрольная группа.* При гистологическом исследовании выявлено, что в процессе приживления кожных лоскутов на месте глубоких гранулирующих раневых дефектов кожи в контрольной группе животных на седьмые сутки после пересадки 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 5.7).

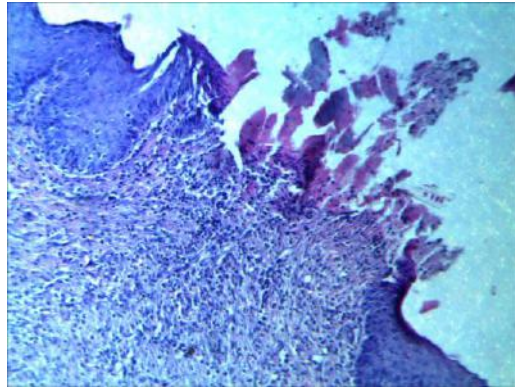
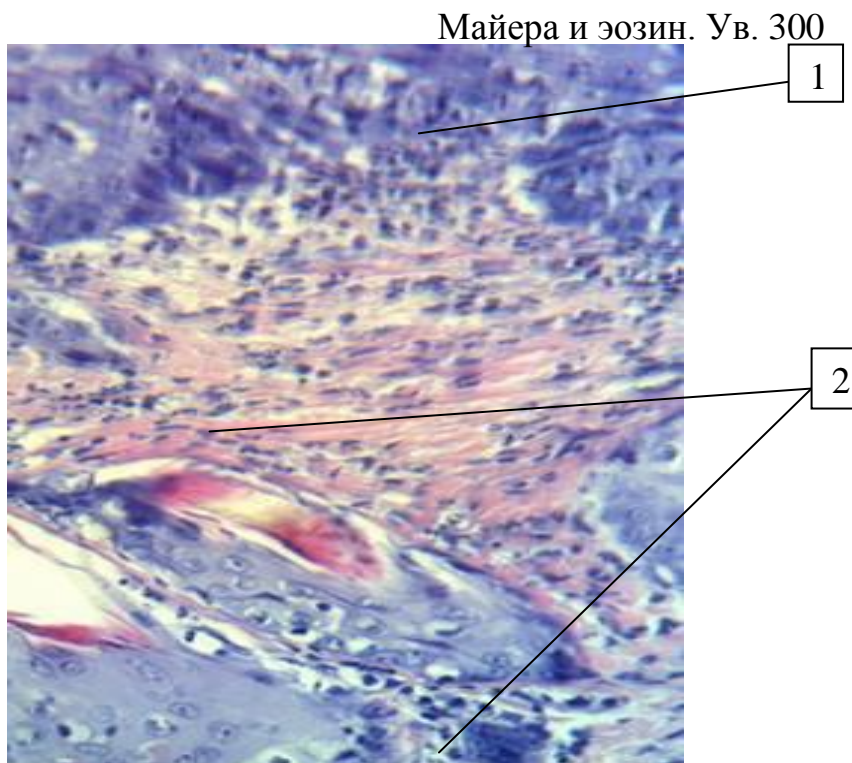


Рисунок 5.6 - Лизис трансплантата. Крыса. Контрольная группа. Седьмые сутки после аутодермопластики. Окраска: гематоксилин



Майера и эозин. Ув. 300

Рисунок 5.7 - Аутодермотрансплантат. Контрольная группа. Крыса. Седьмые сутки после пересадки на гранулирующую раневую поверхность.

Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 300.

1 – гидропическая дистрофия; 2 – лейкоцитарная инфильтрация



Трансплантат с подлежащим ложем связан рыхлой прослойкой незрелой грануляционной ткани (рисунок 5.8). В последней увеличено число эозинофилов. Краевая эпителизация от трансплантата отсутствует. Пересаженный лоскут кожи окружён грануляционной тканью с признаками выраженной полиморфноядерной инфильтрации (рисунок 5.9).

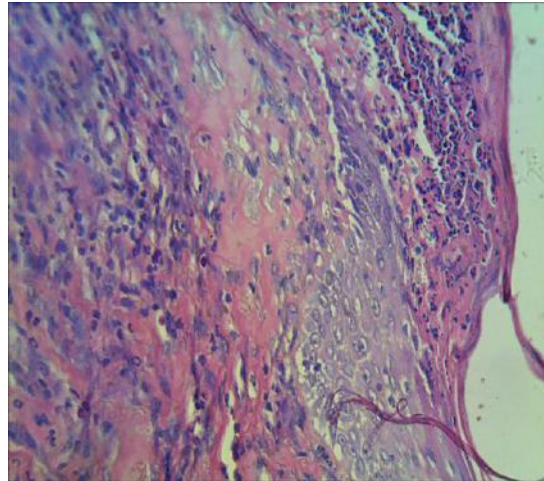


Рисунок 5.8 - Незрелая соединительная ткань под трансплантатом. Увеличено количество эозинофилов. Крыса. Контрольная группа. Седьмые сутки после аутодермопластики. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 300

*Седьмые сутки после аутодермопластики, опытные группы.*

В опытной группе № 3 изменения, обнаруженные при гистоморфологическом исследовании ран на седьмые сутки после аутодермопластики, сходны с контрольной группой. В некоторых участках ран видны деструктивные процессы (рисунок 5.10).

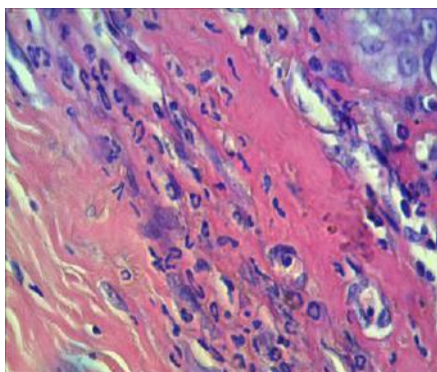


Рисунок 5.9 - Полиморфноядерная инфильтрация в ране. Крыса. Контрольная группа. Седьмые сутки после аутодермопластики. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 300

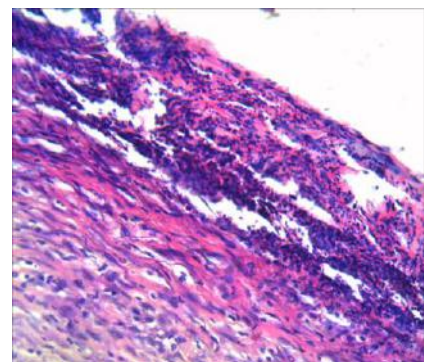


Рисунок 5.10 - Крыса. Опытная группа №3. Деструктивный процесс в ране. Седьмые сутки после аутодермопластики. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 300

В опытных группах №1 и №2 результаты гистологического исследования также весьма сходны. Ткань трансплантата большей частью интактна (рисунок 5.11), эпидермис многослойный с признаками нормальной кератинизации, кровеносные сосуды полнокровны. Местами в глубоких отделах преимущественного сетчатого слоя дермы на фоне слабо выраженного очагового отёка наблюдаются единичные лимфоциты и эозинофилы (рисунок 5.12). Эпителиальные клетки дериватов пролиферируют, восстанавливая органотипичность ткани пересаженного участка кожи.

Пересаженный участок кожи на всём протяжении хорошо прикреплен к подлежащему ложу (рисунок 5.13), 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.

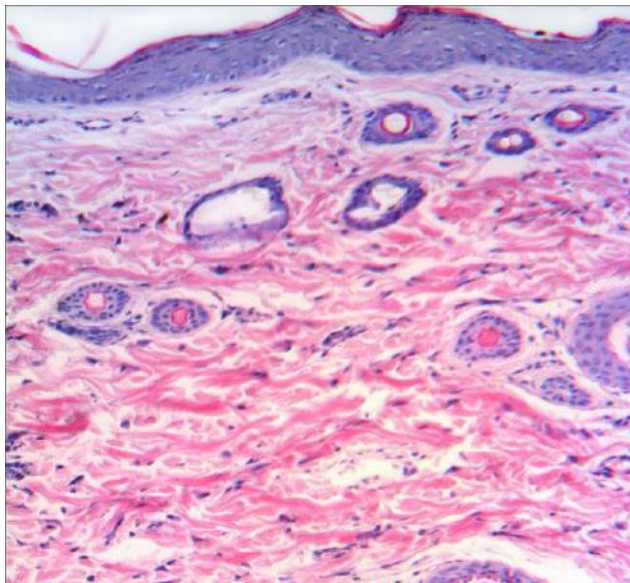


Рисунок 5.11 - Аутоотрансплантат. Седьмые сутки после кожной пластики. Крыса. Опытная группа №1. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 300

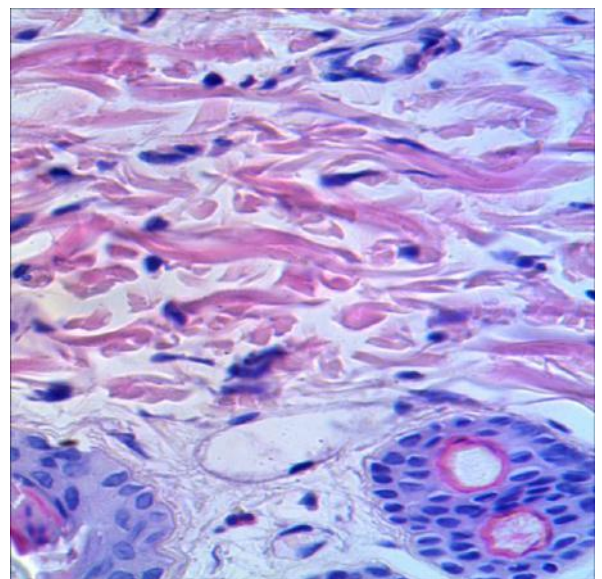


Рисунок 5.12 - Аутодермотрансплантат. Седьмые сутки после кожной пластики. Крыса. Опытная группа №2. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 600

Выражена краевая эпителизация от трансплантата на зрелую грануляционную ткань (рисунок 5.14), в которой наблюдается незначительная лимфо-макрофагальная инфильтрация с примесью эозинофилов.

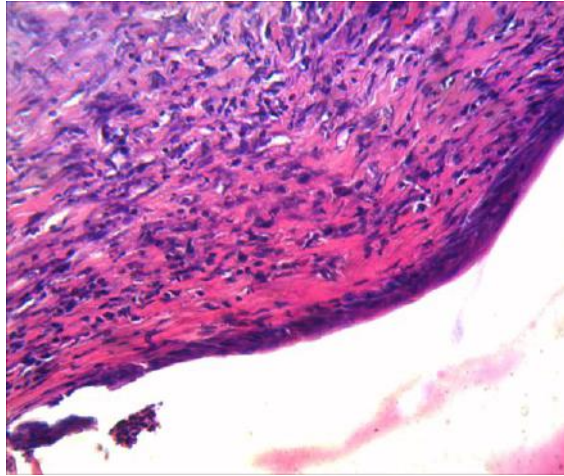


Рисунок 5.13 - Аутотрансплантат. Седьмые сутки после пересадки на гранулирующую раневую поверхность. Крыса. Опытная группа №2.

Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 300

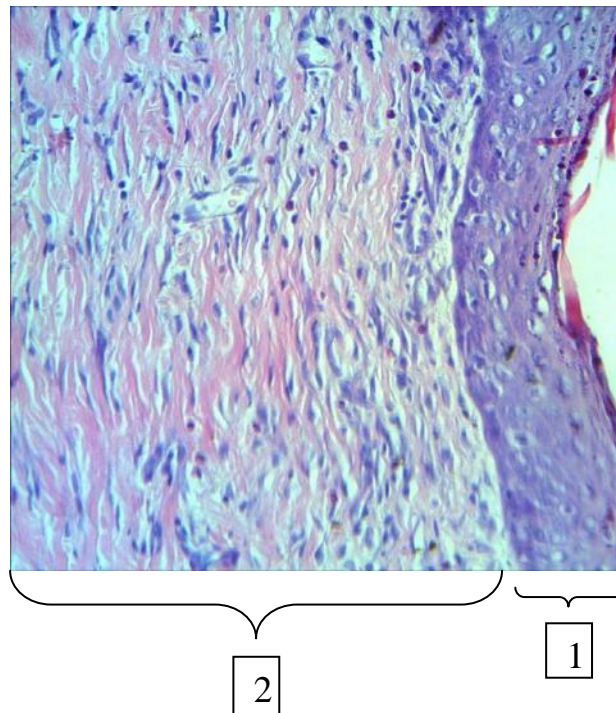


Рисунок 5.14 - Краевая эпителизация с аутотрансплантата. Седьмые сутки после кожной пластики. Крыса. Опытная группа №1. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 300.

1 – краевая эпителизация; 2 – грануляционная ткань

В результате значительной редукции сосудов и разрастания толстых волокон фибриллярного матрикса на месте грануляций формируется плотная неоформленная соединительная ткань, уже отчасти напоминающая дерму.



В грануляционной ткани всё ещё происходит пролиферация адвентициальных клеток (рисунок 5.15), что видимо, продиктовано остающейся потребностью трансплантата в реваскуляризации и кровоснабжении из реципиентного ложа. Воспалительный процесс на границе трансплантата и раневой поверхности почти отсутствует, остаётся только слабо выраженный полиморфно-клеточный инфильтрат, включающий лимфоциты, макрофаги и эозинофилы, при полном отсутствии нейтрофилов.

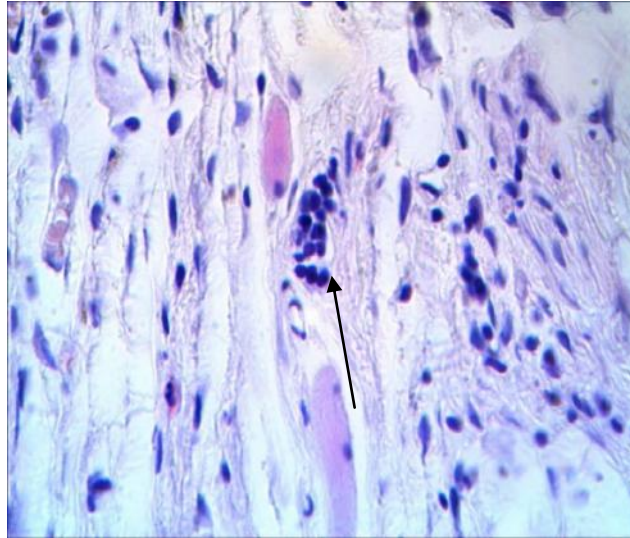


Рисунок 5.15 - Пролиферация адвентициальных клеток в грануляционной ткани под аутодермотрансплантатом. Седьмые сутки после кожной пластики.

Крыса. Опытная группа №2. Окраска: гематоксилин Майера и эозин.

Ув.600. Указаны пролиферирующие адвентициальные клетки

Таким образом, уже на седьмые сутки в опытных группах №1 и №2 наблюдается полноценное приживление аутодермотрансплантата к подлежащему раневому ложу, из которого произошла адекватная реваскуляризация дермы. Причём различий в степени приживления трансплантата между опытными группами №1 и №2 нет. В результате реактивные изменения переживающего трансплантата (отёк, выраженная десквамация эпидермиса и прогрессирующее уменьшение его слоёв, а также воспалительная инфильтрация), не выражены или отсутствуют. Восстановление функциональной активности трансплантируемого участка кожи у животных этих групп на седьмые сутки после аутодермопластики, в отличие от группы контроля и опытной группы №3, доказывает выраженная

пролиферация эпителиоцитов краевых зон трансплантата и, соответственно, интенсивный процесс краевой реэпителизации с пересаженного лоскута кожи на окружающую его грануляционную ткань. Последняя сразу же начинает питать нарастающий на неё эпителий (без необходимости в предварительной реваскуляризации дермы) и способствует ещё более полноценному и ускоренному приживлению трансплантата. Грануляционная ткань под трансплантатом в опытных группах №1 и №2 быстро редуцируется, происходит её дифференцировка по типу гиподермы. Это характерно для данного слоя кожи и подтверждает органотипичность изменений в тканях раневого ложа под аутодермотрансплантатом. В совокупности с пролиферацией и восстановлением дериватов трансплантата, данный факт свидетельствует о воссоздании типичной тканевой картины.

*Десятые сутки после аутодермопластики, контрольная группа.*

На десятые сутки после пересадки кожи в толще аутодермотрансплантата сохраняется слабовыраженная диффузная лимфогистиоцитарная инфильтрация с примесью эозинофилов (рисунок 5.16), проникающая из подлежащего раневого ложа (рисунок 5.17).

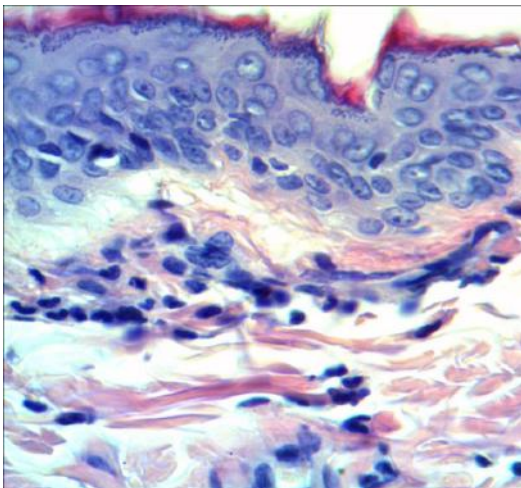


Рисунок 5.16 - Аутодермотрансплантат. Лимфогистиоцитарная инфильтрация. 10 сутки после кожной пластики. Крыса. Контрольная группа. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув.600

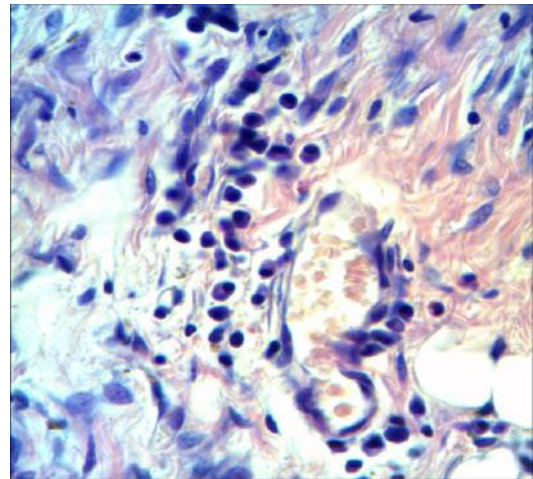


Рисунок 5.17 - Граница аутодермотрансплантата и подлежащего ложа. 10 сутки после кожной пластики. Крыса. Контрольная группа. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 600



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 ( $18,3 \pm 0,4$ %,  $p < 0,05$ ) (рисунок 5.18). В почти редуцированной грануляционной ткани под трансплантатом, иногда встречаются очаги расширенных полнокровных сосудов, питающих пересаженный участок кожи (рисунок 5.19).

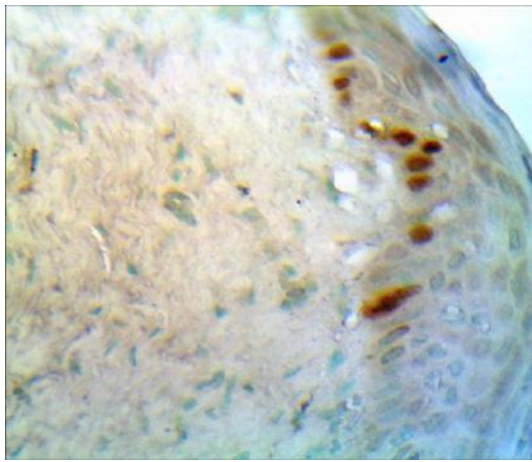


Рисунок 5.18 - Край ауто трансплантата. 10 сутки после кожной пластики. Крыса. Контрольная группа. Иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии белка Ki-67 в пролиферирующих клетках (ядра пролиферирующих клеток темно-коричневого цвета).

Ув.600

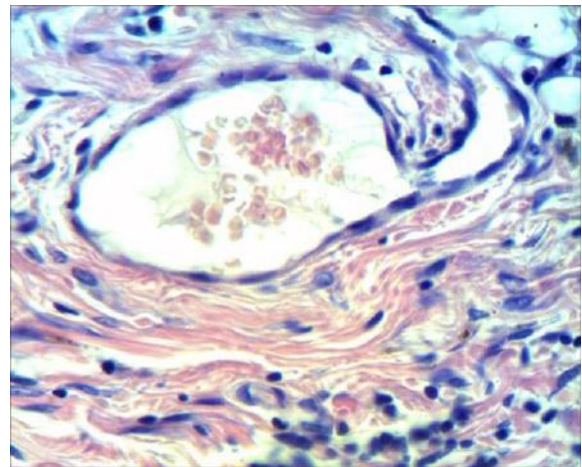


Рисунок 5.19 - Граница ауто трансплантата и подлежащего ложа. 10 сутки после кожной пластики. Крыса. Контрольная группа. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 300

*Десятые сутки после аутодермопластики, опытные группы.*

При клинических наблюдениях выявлено, что приживление трансплантатов произошло у всех животных (рисунок 5.20). В опытной группе №3 морфологические изменения аутодермотрансплантата сходны с группой контроля. В результате эпителизации с краёв образуется эпидермис, который пока

всё ещё рыхло связан с подлежащей тканью, а многослойное строение с признаками ороговения отмечается только в проксимальных отделах.



Рис. 5.20 - Рана на 10 сутки после пластики, крыса, опытная группа №1

Под эпидермисом располагается незрелая неоформленная рыхлая соединительная ткань с большим количеством фибробластов, внеклеточного матрикса, полнокровными и ещё многочисленными сосудами и сохраняющейся лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией. Всё еще продолжается фибриллогенез тонких волокон незрелого коллагена III типа (рисунок 5.21), волокна которого беспорядочно расположены в толще фибриллярного матрикса.

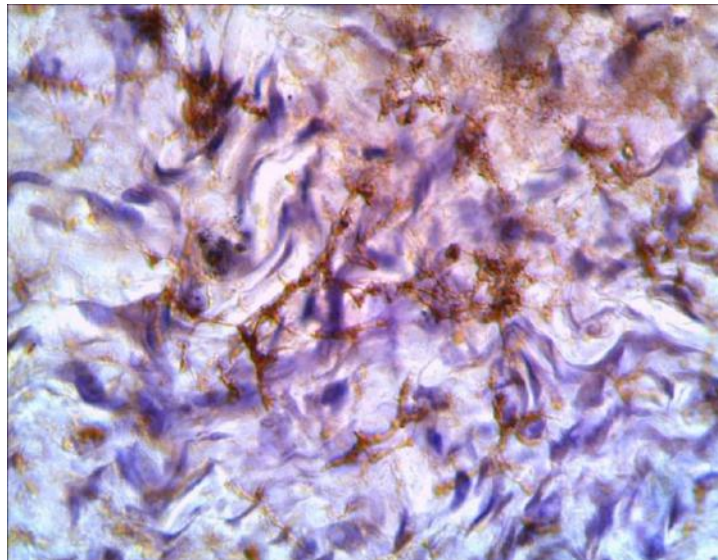


Рисунок 5.21 - Окружающая аутотрансплантат грануляционная ткань.

Крыса. Опытная группа №3. 10 сутки после кожной пластики.

Иммуногистохимическая реакция на выявление коллагена III типа. Ув. 600

В опытных группах №1 и №2 на десятые сутки после пластики сохраняется очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация только в краевых отделах на границе с участками реэпителизации (рисунок 5.22). В остальном строение трансплантата напоминает строение интактной кожи краёв раны (рисунок 5.23).

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). Подлежащая соединительная ткань с небольшим количеством сосудов (рисунок 5.24), волокнистый матрикс преобладает над аморфным, волокна расположены с заметным выравниванием параллельно фибробластам и базальной мембране эпидермиса, что определяется функциональной нагрузкой на вновь образованную ткань.

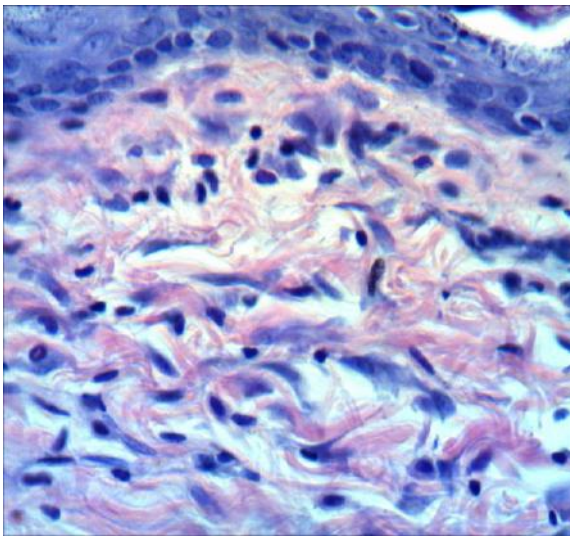


Рисунок 5.22 - Аутографт на границе с участками реэпителизации. 10 сутки после кожной пластики. Крыса. Опытная группа. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 600

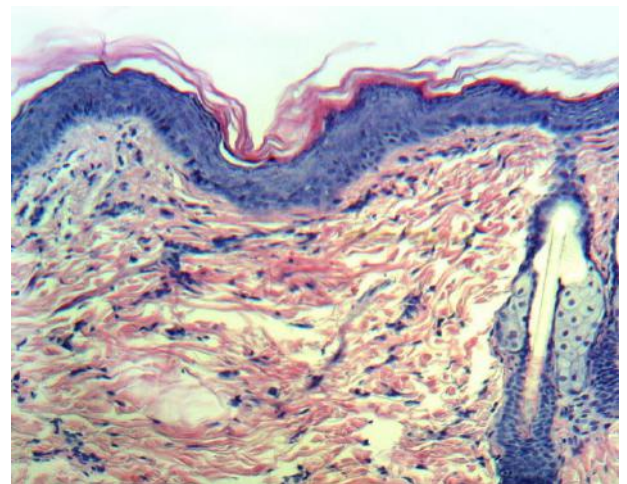


Рисунок 5.23 - Аутографт. 10 сутки после кожной пластики. Крыса. Опытная группа №1. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 150



Выражен синтез зрелого коллагена I типа (рисунок 5.25), почти отсутствующий у животных контрольной группы и опытной группы №3 на этом же сроке эксперимента. Сохраняется незначительный диффузный лимфо-гистиоцитарный инфильтрат (рисунок 5.26). Среди многочисленных фибробластов начинают появляться единичные фиброциты.

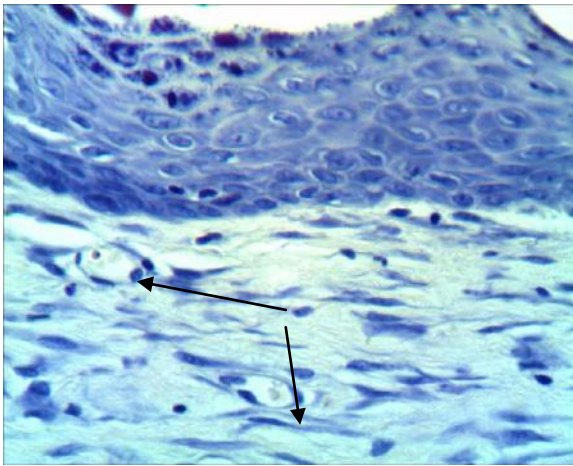


Рисунок 5.24 - Краевая эпителизация с ауто трансплантата. 10 сутки после кожной пластики. Крыса. Опытная группа №2. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 600. Стрелками указаны вновь образованные сосуды

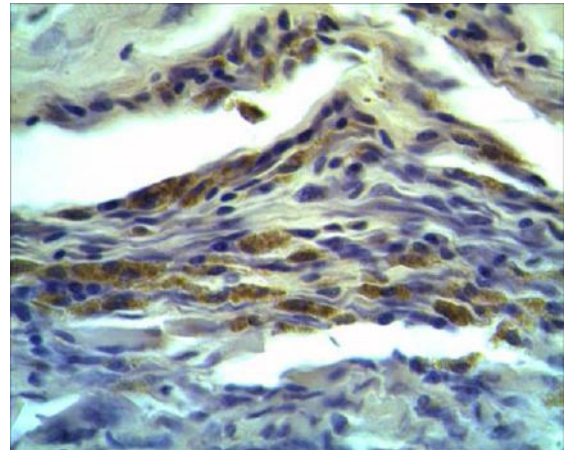


Рисунок 5.25 - Окружающая ауто трансплантат грануляционная ткань. Крыса. Опытная группа №2. 10 сутки после пересадки на гранулирующую раневую поверхность. Иммуногистохимическая реакция на выявление коллагена I типа. Ув. 300

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. Это, в свою очередь, свидетельствует о ещё меньшей интенсификации репаративных процессов в контрольной группе и в опытной группе №3.

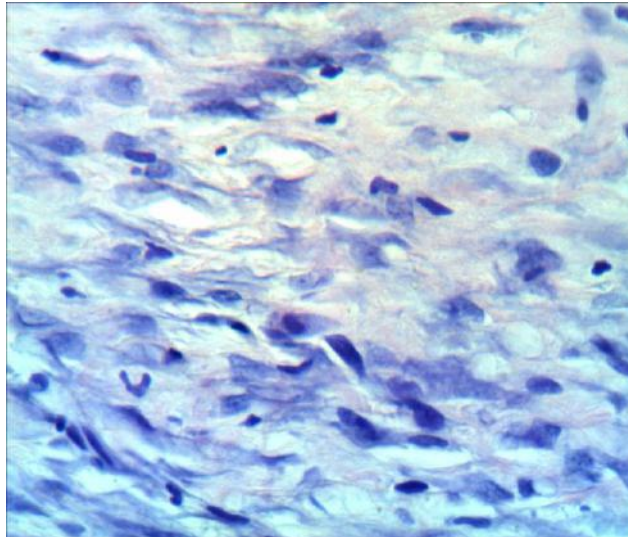


Рисунок 5.26 - Окружающая аутотрансплантат грануляционная ткань. Крыса. Опытная группа №1. 10 сутки после пересадки на гранулирующую раневую поверхность. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 600

*Двадцатые сутки после аутодермопластики, контрольная группа и опытная группа №3.*

В связи с тем, что динамика заживления ран у животных контрольной группы и опытной группы №3 весьма сходна, мы приводим результаты морфологических исследований животных этих групп в одном подразделе.

В прижившихся трансплантатах на двадцатые сутки после пересадки сохраняется слабая, но диффузная лимфо-гистиоцитарная воспалительная инфильтрация со склеротическими изменениями в дерме. В подлежащей к трансплантату ткани грануляции редуцированы, но сохраняется лимфогистиоцитарная реакция (рисунок 5.27) с многочисленными сидерофагами (рисунок 5.28), которые, дают основание предположить замедленную редукцию сосудов грануляционной ткани ложа трансплантата с длительным эритродиapedезом и экстракапиллярным лизисом эритроцитов.

Краевая эпителизация выражена слабо, эпителий с подлежащей тканью связан рыхло, легко травмируется и отслаивается (рисунок 5.29), в связи с чем, местами появляются открытые участки грануляций с выраженной воспалительной инфильтрацией и склерозом. Задержка эпителизации ведет к преждевременному склерозированию грануляционной ткани, что, в свою очередь, замедляет эпителизацию таких участков.

Под пластом вновь образованного эпителия зрелая грануляционная ткань с признаками редукции сосудов, фибриллогенеза и выраженной воспалительной реакции, что подтверждает асинхронность течения стадий репаративного процесса.

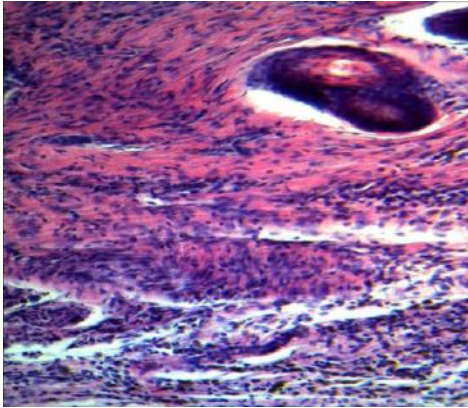


Рисунок 5.27 - Фрагмент

аутоотрансплантата с подлежащим ложем. Крыса. Контрольная группа. 20 сутки после кожной пластики. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 150

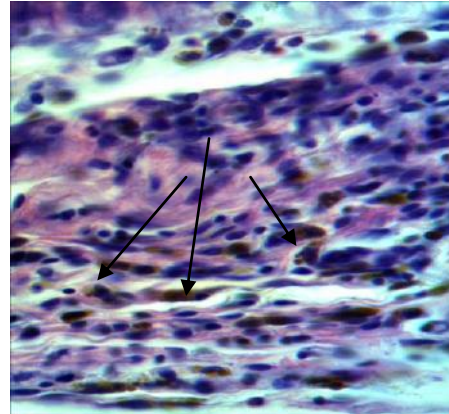


Рисунок 5.28 - Ложе

аутоотрансплантата. Крыса. Опытная группа №3. 20 сутки после кожной пластики. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 600. Стрелками указаны сидерофаги

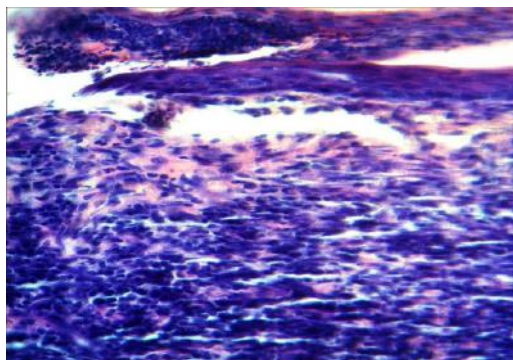


Рисунок 5.29 - Краевая эпителизация с аутоотрансплантата. Крыса. Контрольная группа. 20 сутки после кожной пластики. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув.150



*Двадцатые сутки после аутодермопластики, опытные группы №1 и №2.*

Аутодермотрансплантат (рисунок 5.30) по строению и гистоархитектонике идентичен интактной коже данной области и плотно фиксирован к подлежащему ложу, которое представлено так же органотипичной гиподермой с пролиферирующими дериватами.

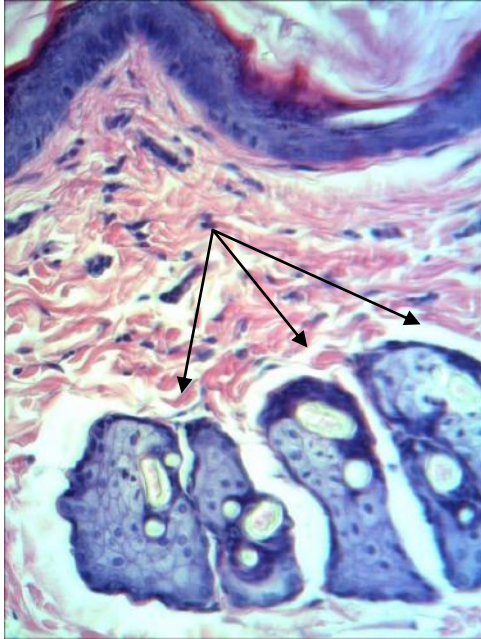


Рисунок 5.30 - Аутоотрансплантат. Крыса. Опытная группа №1. 20 суток после кожной пластики. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 300. Указаны пролиферирующие дериваты

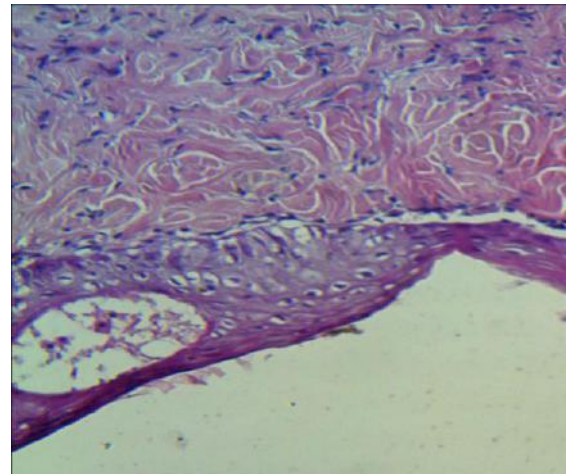


Рисунок 5.31 - Полная эпителизация раны. Крыса. Опытная группа №2. 20 суток после кожной пластики. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 300

Воспалительная инфильтрация отсутствует, грануляционная ткань полностью редуцирована. Встречная краевая эпителизация с трансплантата и с кожи краёв раны завершена, вновь образованный эпидермис, многослойный с признаками ороговения, покрывает плотную неоформленную соединительную ткань, ход волокон, которой параллелен базальной мембране эпидермиса (рисунок 5.31).

Таким образом, выявлено, что метаболиты *Bacillus subtilis* 804 в нативном виде и разведённые в 10 раз значительно ускоряют репаративный гистогенез при кожной пластике скальпированных ран.

У животных опытных групп №1 и №2, которым применялся нативный и разведённый в 10 раз препарат соответственно, у всех животных произошло приживание трансплантатов и эпителизация раны. У крыс опытной группы №3, раны которых орошались разведённым в 100 раз препаратом, гибель трансплантатов наблюдалась у трёх животных (15%). В контрольной группе некроз ауто трансплантатов произошёл у семи крыс (35%).

Морфологическая картина изменений аутодермотрансплантата и репаративного процесса в окружающих его тканях, заметная на десятые сутки в опытных группах №1 и №2, визуализируется и в условиях двух остальных групп, но только на двадцатые сутки эксперимента. При этом в контрольной группе и опытной группе №3 всё ещё сохраняется диффузный лимфогистиоцитарный инфильтрат, замедлено течение краевой реэпителизации от трансплантата, а так же выражен склеротический процесс. В результате этого на двадцатые сутки у животных группы контроля и опыта №3, несмотря на успешное приживание аутодермотрансплантата, 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. Несомненна роль тесного взаимодействия процессов эпителизации и роста грануляционной ткани: эпителий обладает способностью стимулировать рост соединительной ткани, а также вырабатывает коллагеназу, участвующую в перестройке рубца. Задержка же эпителизации в контрольной группе ведет к преждевременному склерозированию грануляционной ткани, что, в свою очередь, замедляет эпителизацию таких участков.

Мы можем сделать вывод, что использование препарата, как нативного, так и в разведении до 10 раз, достоверно улучшает приживание трансплантатов ( $p < 0,005$ ).



*Описание заживления «донорских» ран кожи после забора кожных трансплантатов.*

Динамика размеров «донорских» ран дана в таблице 5.1.1.

Таблица 5.1.1 - Средние размеры «донорских» ран, см<sup>2</sup>

Сутки после взятия трансплантатов	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Контрольная группа
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	0,77± 0,084 n=20	1,25± 0,080 n=20	1,48± 0,131 n=20
Десятые сутки	0,30± 0,063 n=15	0,31± 0,053 n=15	0,78± 0,062 n=15	1,07± 0,069 n=15
Двенадцатые сутки	Все раны эпителизируются n=10	Все раны эпителизируются n=10	0,34± 0,078 n=10	0,46± 0,090 n=10

При статистическом анализе данных видно, что достоверных различий между размерами ран сразу после аутодермопластики нет ( $p > 0,1$ ).

На третьи сутки после забора трансплантата различия в размере ран между опытными группами 1 и 2 также незначительны ( $p > 0,1$ ). В опытной группе №3 и в контрольной группе «донорские» раны достоверно больше, чем в первых двух опытных группах ( $p \leq 0,05$ ). Различий между опытной группой №3 и контролем не выявлено ( $p > 0,1$ ).

*Седьмые сутки после забора трансплантата.*

На седьмые сутки разница в динамике заживления «донорских» ран становится более отчетливой и стабильной. В опытных группах №1 и №2 заживление идет идентично, до полной эпителизации на двенадцатые сутки (рисунок 5.32). Площадь ран достоверно больше в опытной группе №3 ( $p \leq 0,05$ ), также появляется различие между этой группой ( $1,25 \pm 0,080$  см<sup>2</sup>) и контрольной группой ( $1,48 \pm 0,131$  см<sup>2</sup>),  $p \leq 0,05$ .

При морфологическом исследовании у животных группы контроля и опытной группы №3 на седьмые сутки после забора кожных лоскутов в краях и дне донорских ран наблюдается умеренный отёк и лимфо-лейкоцитарная инфильтрация с преобладанием эозинофилов. Выражен процесс новообразования сосудов грануляционной ткани. Отмечается интенсивная пролиферация фибробластов и фибриллогенез, краевая эпителизация не выражена, раневой дефект под струпом (рисунок 5.33).



Рисунок 5.32 - Донорская рана на 7 сутки после взятия трансплантата. Крыса. Опытная группа №1

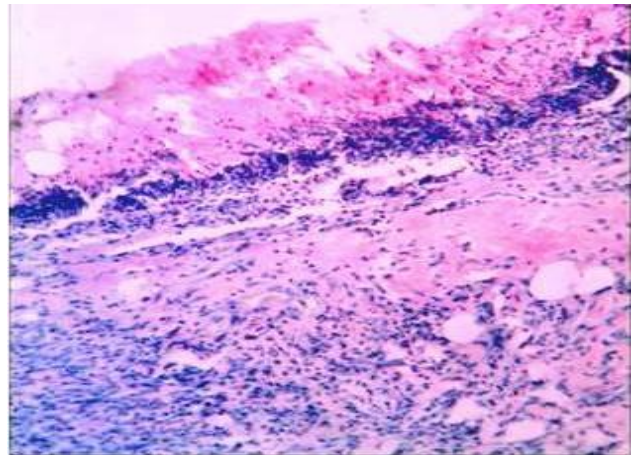


Рисунок 5.33 - Край донорской раны на 7 сутки после взятия трансплантата. Крыса. Контрольная группа. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 150

Морфологическое изучение материала опытных групп №1 и №2 на седьмые сутки после забора трансплантата показало отсутствие отёка и лейкоцитарного инфильтрата в «донорской» ране. Тонкий слой эпителия закрывает большую часть раневого дефекта, наполняя с краёв на зрелую грануляционную ткань, в которой уже начинается редукция сосудов. Слабо выражена пролиферация фибробластов, появляются фиброциты, продолжается процесс увеличения фибриллярного матрикса (рисунок 5.34).

*Десятые сутки после взятия трансплантата.*

На десятые сутки размеры ран достоверно меньше в опытных группах №1 и №2, чем в опытной группе №3 ( $p \leq 0,05$ ). В группе контроля раны достоверно больше ( $1,07 \pm 0,069 \text{ см}^2$ ), чем в опытной группе №3 ( $0,78 \pm 0,062 \text{ см}^2$ ),  $p \leq 0,05$ .

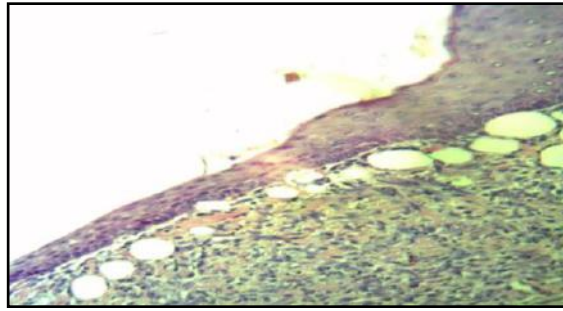


Рисунок 5.34 - Донорская рана кожи на 7 сутки после взятия трансплантата. Крыса. Опытная группа №2. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 150

Морфологическая картина репаративного процесса в донорских ранах у животных группы контроля и опытной группы №3, наблюдаемая на десятые сутки, сходна с изменениями, которые были в опытных группах №1 и №2 на седьмые сутки после взятия трансплантата (рисунок 5.35).

К десятым суткам после взятия трансплантата в опытных группах №1 и №2 грануляционная ткань в донорских ранах редуцируется, частично сохраняясь только в субэпидермальных отделах.

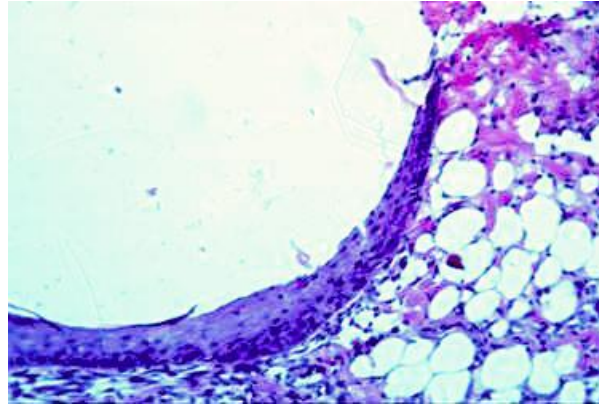


Рисунок 5.35 - Донорская рана кожи на 10 сутки после взятия трансплантата. Крыса. Опытная группа №3. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 150

Последний факт, вероятно, обусловлен повышенной потребностью ещё молодого и пролиферирующего эпителия в адекватном кровоснабжении. Тонкие коллагеновые волокна исчезают, одновременно образуются толстые волокна и пучки, направленность которых определяется функциональной нагрузкой на данный участок кожи. Уменьшается общее число клеток по отношению к

фибрилярному матриксу, фиброциты преобладают над фибробластами. Эпидермис приобретает толщину, близкую к интактной коже, с признаками поверхностной кератинизации, но ещё без формирования сосочков.

*На двенадцатые сутки* раны в первых двух опытных группах эпителизированы, различия между этими группами, опытной группой №3 и группой контроля аналогичны наблюдаемым на десятые сутки.

Эпителизация ран у всех животных в опытной группе №3 произошла к 15 суткам, в контрольной группе – к 16 суткам.

*Двадцатые сутки после взятия трансплантата.*

На двадцатые сутки операции в донорских ранах у животных группы контроля и опытной группы №3 морфологическая картина репаративного процесса схожа с таковой в опытных группах №1 и №2, но на десятые сутки после взятия трансплантата. Отличия состоят лишь в том, что в контрольной группе и опытной группе №3 на двадцатые сутки, по сравнению с опытными группами №1 и №2 на десятые сутки чуть более выражена редукция сосудов субэпидермального слоя соединительной ткани, несомненно, за счёт большего (на 10 суток) времени заживления. Эпидермис ещё не формирует сосочковых инвагинаций в образующейся дерме и сохраняется высокая общая клеточность соединительной ткани (рисунок 5.36).

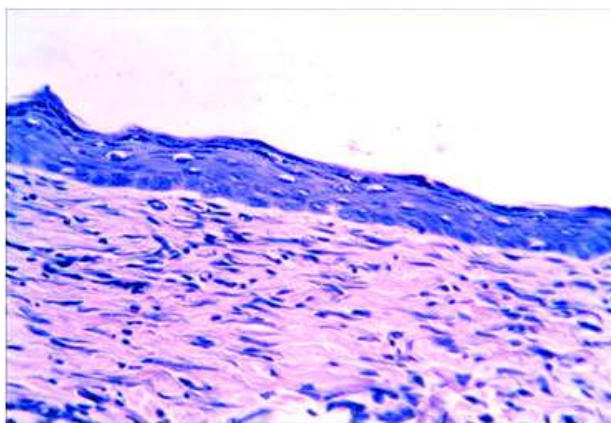


Рисунок 5.36 - Зажившая донорская рана кожи крысы на 20 сутки после взятия трансплантата. Крыса. Контрольная группа. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 300

В опытных группах №1 и №2 донорский скальпированный раневой дефект имеет признаки полного заживления и представлен участком вновь образованной ткани полностью соответствующей нормальной коже: эпидермис дифференцирован на все функциональные слои с признаками полноценной кератинизации и образованием погружённых в дерму сосочковых инвагинаций (рисунок 5.37). Дерма дифференцирована на сосочковый и сетчатый слои, сосуды грануляционной ткани полностью редуцированы, на стадии завершения находится процесс ремоделирования фибриллярного матрикса. Тонкие коллагеновые волокна отсутствуют, вновь образованные толстые волокна и их пучки приобретают строго определённую направленность, почти до нормальных величин снижена общая клеточность и дифференцирован адекватный слой гиподермы.

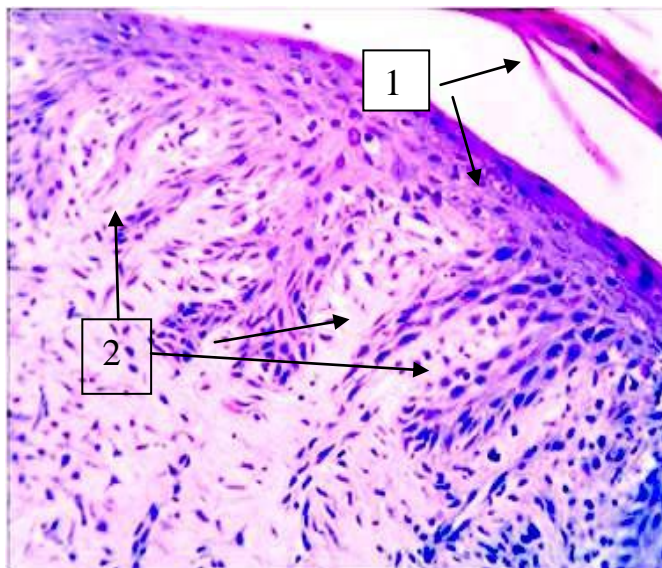


Рисунок 5.37 - Зажившая донорская рана кожи крысы на 20 сутки после операции. Крыса. Опытная группа №2. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Ув. 300.

1 – эпителий с признаками полноценной кератинизации; 2 – сосочковые инвагинации

Таким образом, заживление «донорских» ран при использовании препарата происходит достоверно быстрее, чем при использовании физиологического раствора в контрольной группе. Достоверных различий при нанесении на раны

нативного и разведённого в 10 раз препарата не выявлено. Однако, при разведении препарата в 100 раз, заживление «донорских» ран происходит медленнее. Но даже разведённый в 100 раз препарат достоверно оказывает стимулирующее влияние на динамику заживления «донорских» ран

При гистологическом изучении процесса заживления «донорских» ран нами выявлено, что применение метаболитов *Bacillus subtilis* 804 в нативном виде и разведённых в 10 раз уже через три недели после кожной пластики приводит к формированию полностью дифференцированного на все функциональные слои эпидермиса с признаками полноценной кератинизации и образованием погружённых в дерму сосочковых инвагинаций. Дерма дифференцирована на сосочковый и сетчатый слои, сосуды грануляционной ткани полностью редуцированы, на стадии завершения находится процесс ремоделирования фибриллярного матрикса.

\*\*\*

При экспериментальном лечении ран с дефектом мягких тканей установлено, что применение метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, достоверно улучшает результаты свободной кожной пластики.

При использовании как нативных, так и разведённых в 10 раз метаболитов *Bacillus subtilis* 804, у всех животных произошло приживление трансплантатов и эпителизация ран. Даже после разведения препарата в 100 раз результаты кожной пластики были лучше, чем в контрольной группе при нанесении 0,9% раствора натрия хлорида. У крыс опытной группы №3, раны которых орошались разведённым в 100 раз препаратом, гибель трансплантатов наблюдалась у 15 % животных. В контрольной группе некроз ауто трансплантатов произошёл в 35 % случаев.

При гистологическом исследовании выявлено, что метаболиты *Bacillus subtilis* 804 в нативном виде и разведённый в 10 раз значительно ускоряет репаративный гистогенез при кожной пластике скальпированных ран.



Морфологическая картина изменений аутодермотрансплантата и репаративного процесса в окружающих его тканях, заметная на десятые сутки в опытных группах №1 (нативный препарат) и №2 (разведённый в 10 раз препарат), визуализируется и в условиях двух остальных групп (получавших разведённый в 100 раз препарат и 0,9% раствор натрия хлорида), но только на двадцатые сутки эксперимента. В результате этого на двадцатые сутки у животных группы контроля и опыта №3, несмотря на успешное приживание 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.

Метаболиты *Bacillus subtilis* 804, содержащие фактор роста фибробластов, стимулируют реваскуляризацию, клеточную пролиферацию фибробластов и эпителиоцитов кожи и восстанавливают органотипическое строение кожного покрова; при этом происходит усиление синтеза зрелого коллагена I типа и снижается активность склеротических процессов.

Установлено, что метаболиты *Bacillus subtilis* 804 в нативном виде и разведённый в 10 раз значительно ускоряет эпителизацию «донорских» ран. Эти раны у животных в опытных группах №1 и №2 заживали быстрее, чем в опытной группе №3, где применялся разведённый в 100 раз препарат, и быстрее, чем в группе контроля, примерно на пять суток. При этом применение метаболитов *Bacillus subtilis* 804 в нативном виде и разведённых в 10 раз уже через три недели после кожной пластики приводит к формированию полностью дифференцированного на все функциональные слои эпидермиса с признаками полноценной кератинизации и образованием погружённых в дерму сосочковых инвагинаций.



Глава 6. ИЗУЧЕНИЕ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ  
МЕТАБОЛИТОВ *BACILLUS SUBTILIS* 804,  
СОДЕРЖАЩИХ ФАКТОР РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ

**6.1. Изучение хронической токсичности метаболитов *Bacillus subtilis*  
804, содержащих фактор роста фибробластов**

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., по 25 самцов и 25 самок каждого вида животных. Крысам препарат вводился внутримышечно, а мышам – подкожно. Эксперименты проводились согласно методикам, описанным в главе «Материалы и методы».

**6.1.1. Изучение хронической токсичности в эксперименте на крысах**

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. Волосной и кожный покров не изменялся. Потребление корма (таблица 6.1.1.1) 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. Статистически достоверных различий в потреблении корма между группами на разных сроках наблюдения не выявлено ( $p > 0,1$ ). Во всех группах наблюдался прирост массы тела (таблица 6.1.1.2).

Таблица 6.1.1.1 - Потребление корма крысами при исследовании хронической токсичности (грамм корма/килограмм веса животного в сутки)

День наблюдения	Опытная группа	Контрольная группа	Интактные крысы
0 (до инъекции)	106,7±4,7 (n=30)	108,8±5,7 (n=10)	108,9± 3,5 (n=10)
7	108,1±3,7 (n=30)	103,0±3,1 (n=10)	111,0± 3,0 (n=10)
14	107,9±4,2 (n=30)	107,6±3,6 (n=10)	109,7± 4,2 (n=10)
21	107,4±4,1 (n=30)	108,0±4,0 (n=10)	109,4± 4,3 (n=10)
28	106,8±4,3 (n=30)	106,6±5,1 (n=10)	107,0± 3,0 (n=10)
35	107,0±4,4 (n=30)	108,8±5,7 (n=10)	107,9± 2,9 (n=10)
42	106,7±4,7 (n=30)	108,7±4,5 (n=10)	109,0± 4,8 (n=10)
49	107,5±4,3 (n=30)	107,8±4,7 (n=10)	106,4± 4,6 (n=10)
56	107,0±3,8 (n=30)	107,9±4,1 (n=10)	107,2± 3,9 (n=10)
63	108,6±4,2 (n=30)	106,5±4,6 (n=10)	107,6± 4,8 (n=10)
70	107,8±4,4 (n=30)	105,4±3,5 (n=10)	105,7± 4,9 (n=10)
77	107,4±4,4 (n=30)	107,3±4,3 (n=10)	107,9± 5,5 (n=10)
84	107,9±5,0 (n=30)	104,3±4,0 (n=10)	109,2± 4,6 (n=10)
91	106,8±4,5 (n=30)	108,2±4,8 (n=10)	108,1± 4,5 (n=10)
98	107,6±4,4 (n=30)	107,2±5,3 (n=10)	108,0± 4,3 (n=10)
105	108,7±4,1 (n=30)	107,2±4,1 (n=10)	108,1± 4,5 (n=10)
112	105,7±4,5 (n=30)	107,2±5,2 (n=10)	110,5± 3,4 (n=10)
119	107,8±3,7 (n=15)	107,3±4,1 (n=5)	110,3± 4,9 (n=5)
126	108,9±3,7 (n=15)	106,5±4,1 (n=5)	106,5± 3,8 (n=5)
133	109,0±4,6 (n=15)	108,4±4,1 (n=5)	104,7± 3,8 (n=5)
140	106,2±3,9 (n=15)	104,3±4,5 (n=5)	109,1± 5,0 (n=5)

Таблица 6.1.1.2 - Средние показатели массы тела крыс при исследовании хронической токсичности (граммы)

День наблюдения	Опытная группа	Контрольная группа	Интактные крысы
0 (до инъекции)	192,0± 5,9 (n=30)	190,8± 5,1 (n=10)	191,8± 7,4 (n=10)
7	200,8± 6,1 (n=30)	199,4± 5,6 (n=10)	200,1± 8,4 (n=10)
14	208,7± 6,4 (n=30)	207,5± 6,2 (n=10)	209,5± 8,6 (n=10)
21	217,0± 6,6 (n=30)	215,8± 5,9 (n=10)	218,0± 7,9 (n=10)
28	225,4± 6,9 (n=30)	224,4± 5,2 (n=10)	226,3± 7,6 (n=10)
35	234,0± 7,1 (n=30)	233,8± 5,1 (n=10)	234,9± 7,7 (n=10)
42	242,3± 7,7 (n=30)	243,1± 5,2 (n=10)	243,7± 7,5 (n=10)
49	250,7± 8,2 (n=30)	251,3± 5,9 (n=10)	252,6± 7,8 (n=10)
56	259,4± 8,6 (n=30)	260,4± 6,3 (n=10)	261,4± 8,6 (n=10)
63	267,9± 8,8 (n=30)	268,8± 6,0 (n=10)	270,5± 9,4 (n=10)
70	275,9± 8,5 (n=30)	278,3± 6,1 (n=10)	278,6± 10,2 (n=10)
77	284,9± 8,7 (n=30)	286,3± 6,2 (n=10)	285,9± 10,9 (n=10)
84	293,7± 9,2 (n=30)	294,5± 6,8 (n=10)	294,2± 10,2 (n=10)
91	302,2± 9,3 (n=30)	303,3± 7,4 (n=10)	303,4± 10,2 (n=10)
98	308,4± 9,4 (n=30)	309,2± 7,4 (n=10)	309,0± 10,1 (n=10)
105	314,5± 9,6 (n=30)	315,4± 7,8 (n=10)	315,0± 10,1 (n=10)
112	317,0± 9,8 (n=30)	318,2± 8,0 (n=10)	317,4± 10,4 (n=10)
119	317,1± 10,4 (n=15)	319,0± 8,0 (n=5)	323,9± 11,1 (n=5)
126	319,6± 10,6 (n=15)	322,1± 7,9 (n=5)	326,8± 11,4 (n=5)
133	322,0± 10,7 (n=15)	324,6± 8,3 (n=5)	329,1± 11,6 (n=5)
140	324,7± 10,5 (n=15)	327,8± 8,3 (n=5)	331,7± 11,6 (n=5)

При анализе показателей веса крыс выявлен устойчивый прирост массы тела. Статистически достоверных различий между опытной и контрольной группами не выявлено ( $p > 0,1$ ).

Клинические анализы крови выполнялись в день опыта (до введения препарата), затем на 28-й, 56-й, 84-й и 112-й дни после начала эксперимента и спустя месяц (140-й день опыта) после отмены препарата. Результаты анализов крови лабораторных крыс показаны в таблицах 6.1.1.3, 6.1.1.4. Статистически значимых различий между показателями опытной и контрольной групп, а также между значениями показателей крови интактных крыс, содержащихся в идентичных условиях, не выявлено ( $p>0,1$ ).

Таблица 6.1.1.3 - Гематологические показатели интактных крыс

Показатели	0 день n=10	28-е сутки n=10	56-е сутки n=10	84-е сутки n=10	112-е сутки n=10	140-е сутки n=5
Эритроциты, *10 <sup>12</sup> /л	8,6± 0,7	8,5± 0,9	8,4± 0,7	8,4± 0,6	8,1± 0,8	7,7± 0,7
Лейкоциты, *10 <sup>9</sup> /л	10,9± 1,7	11,1± 1,3	10,9± 1,8	10,7± 1,8	10,8± 1,7	11,6± 2,1
Гемоглобин, г/л	145,4± 11,9	139,8± 14,0	147,9± 13,1	148,1± 12,3	140,5± 13,7	149,4± 9,9
Гематокрит, %	46,0± 2,5	44,8± 2,6	45,3± 2,0	43,9± 2,4	44,4± 3,4	44,0± 1,9
Нейтрофилы %	23,9± 3,8	27,9± 4,1	25,6± 4,2	26,5± 4,1	25,4± 3,0	23,0± 2,9
Лимфоциты, %	73,3± 3,8	69,2± 4,1	72,0± 3,8	71,1± 3,9	71,2± 3,5	73,6± 2,7
Моноциты, %	2,3± 0,9	1,9± 1,3	1,7± 0,9	1,6± 0,7	2,2± 0,9	2,2± 0,8
Эозинофилы, %	0,5± 0,5	1,0± 0,8	0,7± 0,5	0,8± 0,6	1,2± 0,6	1,2± 0,8

Таблица 6.1.1.4 - Гематологические показатели 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=30	Контр. n=10	Опыт n=30	Контр. n=10	Опыт n=30	Контр. n=10	Опыт n=30	Контр. n=10	Опыт n=15	Контр. n=5
Эритроциты, *10 <sup>12</sup> /л	8,4± 0,7	7,9± 0,7	8,5± 0,6	8,4± 0,6	8,3± 0,6	8,5± 0,6	8,5± 0,7	8,2± 0,8	8,4± 0,8	8,2± 0,6	8,3± 0,8	8,1± 0,8
Лейкоциты, *10 <sup>9</sup> /л	10,5± 1,7	10,7± 1,6	11,2± 1,6	10,9± 1,9	11,2± 1,9	11,7± 1,4	11,1± 1,5	11,6± 1,5	11,0± 1,9	10,8± 2,0	11,7± 1,7	10,9± 2,5
Гемоглобин, г/л	140,9± 12,3	141,4± 15,0	147,6± 14,5	146,6± 15,0	144,4± 14,3	149,8± 15,0	147,7± 14,6	143,6± 16,6	145,7± 15,3	148,5± 12,8	144,9± 9,6	152,0± 6,9
Гематокрит, %	45,4± 2,7	45,0± 3,5	46,2± 2,5	45,3± 2,9	45,6± 2,7	44,3± 3,0	44,7± 2,8	44,6± 3,0	43,7± 2,6	44,1± 2,4	44,9± 2,8	45,9± 3,1
Нейтрофилы %	24,8± 3,3	25,3± 2,9	26,4± 3,7	24,4± 4,0	25,4± 3,9	26,2± 4,5	25,7± 3,7	28,2± 3,2	26,2± 3,8	26,4± 4,0	26,3± 4,0	23,6± 2,4
Лимфоциты, %	72,0± 3,0	71,3± 3,4	70,6± 3,6	72,4± 4,4	71,7± 3,9	71,2± 4,0	71,2± 3,6	69,1± 3,1	71,0± 3,6	71,5± 3,7	70,9± 3,3	73,2± 1,9
Моноциты, %	2,3± 1,1	2,2± 0,9	2,0± 1,3	2,5± 1,0	1,9± 1,3	1,7± 1,2	2,2± 1,1	1,8± 1,3	1,8± 1,1	1,4± 0,8	2,1± 1,1	2,0± 1,0
Эозинофилы, %	0,9± 0,7	1,2± 0,6	0,9± 0,7	0,7± 0,7	1,0± 0,7	0,9± 0,7	0,9± 0,7	0,9± 0,9	1,1± 0,7	0,7± 0,5	0,7± 0,7	1,2± 0,8

*Биохимические показатели крыс при исследовании хронической токсичности.* Средние биохимические показатели крови крыс показаны в таблицах 6.1.1.5, 6.1.1.6.

Таблица 6.1.1.5 - Средние значения показателей биохимии сыворотки крови интактных крыс

Показатели	0 день n=10	28-е сутки n=10	56-е сутки n=10	84-е сутки n=10	112-е сутки n=10	140-е сутки n=5
АСТ, мккат/л	0,22± 0,03	0,23± 0,04	0,22± 0,02	0,23± 0,02	0,22± 0,03	0,22± 0,02
АЛТ, мккат/л	0,13± 0,01	0,13± 0,01	0,13± 0,01	0,13± 0,01	0,13± 0,01	0,13± 0,01
ЩФ, мккат/л	1,51± 0,09	1,56± 0,11	1,56± 0,16	1,53± 0,09	1,54± 0,08	1,50± 0,07
Креатинин, мкмоль/л	36,65± 2,33	38,89± 2,55	38,82± 2,17	38,88± 1,55	38,02± 2,82	37,22± 3,02
Мочевина, ммоль/л	8,71± 1,18	8,55± 1,80	9,05± 1,70	8,41± 1,51	8,76± 1,47	8,62± 1,74
Холестерин, ммоль/л	2,00± 0,06	2,00± 0,07	2,01± 0,05	2,00± 0,05	1,99± 0,05	2,01± 0,07
Триглицериды, ммоль/л	0,73± 0,03	0,69± 0,04	0,73± 0,03	0,72± 0,05	0,70± 0,05	0,75± 0,03
Билирубин, мкмоль/л	1,22± 0,19	1,19± 0,17	1,13± 0,19	1,09± 0,20	1,19± 0,22	1,33± 0,18
Глюкоза, ммоль/л	4,61± 1,39	3,96± 0,92	4,48± 1,26	4,34± 1,16	5,06± 1,02	4,71± 0,86

Изменения в биохимических показателях сыворотки крови зафиксированы только к 112 дню эксперимента. Отмечено увеличение концентрации аланинаминотрансферазы. На 112-е сутки среднее значение АлАТ у интактных крыс составило 0,13±0,01 мккат/л, у животных контрольной группы - 0,14±0,01 мккат/л ( $p>0,1$ ), в то время как у крыс опытной группы - 0,18±0,03 мккат/л ( $p\leq 0,05$  с обеими группами). На 140-е сутки значение АлАТ у интактных крыс составило 0,13±0,01 мккат/л, у животных контрольной группы - 0,13±0,01 мккат/л ( $p>0,1$ ), а у крыс опытной группы - 0,16±0,02 мккат/л ( $p\leq 0,05$ ). То есть через месяц после отмены препарата (140-е сутки опыта) концентрация АлАТ несколько снизилась, но отличалось от значений в контрольных группах.

Зафиксировано увеличение концентрации щелочной фосфатазы. На 112-е сутки среднее значение ЩФ у интактных крыс составило  $1,54 \pm 0,08$  мккат/л, у животных контрольной группы -  $1,59 \pm 0,09$  мккат/л ( $p > 0,1$ ), в то время как у крыс опытной группы -  $1,89 \pm 0,11$  мккат/л ( $p \leq 0,05$  с обеими группами). На 140-е сутки концентрация щелочной фосфатазы у интактных крыс составила  $1,50 \pm 0,07$  мккат/л, у животных контрольной группы -  $1,66 \pm 0,08$  мккат/л ( $p > 0,1$ ), а у крыс опытной группы -  $1,79 \pm 0,26$  мккат/л ( $p > 0,05$ ). То есть, спустя месяц после отмены препарата (140-е сутки опыта) концентрация ЩФ в сыворотке крови крыс опытной группы снизилась, а различия с контрольными группами уменьшились.

Также отмечено некоторое снижение концентрации триглицеридов в сыворотке крови крыс опытной группы. На 112-е сутки среднее значение концентрации триглицеридов у интактных крыс составило  $0,70 \pm 0,05$  ммоль/л, у животных контрольной группы -  $0,73 \pm 0,06$  ммоль/л ( $p > 0,1$ ), в то время как у крыс опытной группы -  $0,51 \pm 0,07$  ммоль/л ( $p \leq 0,05$  с обеими группами). На 140-е сутки концентрация триглицеридов сыворотки крови у интактных крыс составила  $0,75 \pm 0,03$  ммоль/л, у животных контрольной группы -  $0,71 \pm 0,05$  ммоль/л ( $p > 0,1$ ), а у крыс опытной группы -  $0,62 \pm 0,14$  ммоль/л ( $p > 0,1$  по сравнению с животными контрольной группы). То есть, спустя месяц после отмены препарата (140-е сутки опыта) концентрация триглицеридов в сыворотке крови крыс опытной группы увеличилась, а различия с контрольными группами статистически недостоверны.

Таким образом, некоторое увеличение показателей концентрации аланинаминотрансферазы и щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс опытной группы только на 112-е сутки опыта свидетельствует о незначительных повреждениях специализированных элементов печени, а снижение уровня триглицеридов – о снижении синтетической функции.



Таблица 6.1.1.6 - 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=30	Контр. n=10	Опыт n=30	Контр. n=10	Опыт n=30	Контр. n=10	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

Однако снижение и даже исчезновение статистически достоверных различий между значениями аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и триглицеридов в опытной и контрольных группах спустя месяц после отмены препарата (140-е сутки эксперимента), а также отсутствие статистически достоверных различий между остальными биохимическими показателями сыворотки крови позволяет сделать заключение об обратимости токсического воздействия препарата на печень опытных животных в условиях хронического эксперимента.

*Функции выделительной системы.*

Статистически достоверных различий в показателях анализов мочи у животных опытной, контрольной групп и интактных крыс не выявлено ( $p > 0,1$ ).

Таблица 6.1.1.7 - Средние показатели анализов мочи крыс при изучении хронической токсичности

Сроки	Группы животных	Плотность мочи	pH мочи
0 день	Опытная группа, n=30	1025± 9	7,2± 0,2
	Контрольная группа, n=10	1022± 8	7,1± 0,1
	Интактные крысы, n=10	1024± 10	7,1± 0,1
28-е сутки	Опытная группа, n=30	1028± 8	7,1± 0,2
	Контрольная группа, n=10	1028± 7	7,1± 0,2
	Интактные крысы, n=10	1026± 11	7,1± 0,2
56-е сутки	Опытная группа, n=30	1022± 9	7,1± 0,2
	Контрольная группа, n=10	1025± 7	7,1± 0,2
	Интактные крысы, n=10	1025± 10	7,1± 0,2
84-е сутки	Опытная группа, n=30	1023± 9	7,1± 0,2
	Контрольная группа, n=10	1026± 8	7,1± 0,2
	Интактные крысы, n=10	1026± 7	7,1± 0,2
112-е сутки	Опытная группа, n=30	1023± 9	7,1± 0,1
	Контрольная группа, n=10	1024± 9	7,2± 0,2
	Интактные крысы, n=10	1022± 8	7,1± 0,2
140-е сутки	Опытная группа, n=15	1020± 9	7± 0,2
	Контрольная группа, n=5	1025± 8	7,1± 0,1
	Интактные крысы, n=5	1022± 9	7,1± 0,1

*Результаты патоморфологического исследования*

При внешнем визуальном осмотре тел подопытных животных различий между опытной и контрольными группами не выявлено. Шерсть гладкая, блестящая, кожа эластичная, подвижная, подкожная клетчатка умеренно выражена, видимые слизистые оболочки бледные, чистые, без изъязвлений и посторонних наложений, патологические выделения из естественных отверстий тела отсутствовали.

*Макроскопическое исследование.*

При макроскопическом исследовании внутренних органов различий между опытной и контрольными группами животных не обнаружено.

*Масса внутренних органов.*

Статистический анализ показателей массы внутренних органов не выявил достоверных различий между опытной, контрольной группами и интактными животными (таблица 6.1.1.8).

Таблица 6.1.1.8 - Средние показатели массы внутренних органов крыс при исследовании хронической токсичности, на 112 день эксперимента (граммы)

Показатели	Опытная группа n=15	Контрольная группа n=5	Интактные крысы n=5
Селезёнка	1,913± 0,057	1,918± 0,046	1,878± 0,049
Печень	12,755± 0,382	12,788± 0,306	12,523± 0,325
Головной мозг	2,774± 0,083	2,781± 0,066	2,724± 0,071
Сердце	1,084± 0,032	1,087± 0,026	1,064± 0,028
Лёгкие	1,435± 0,043	1,439± 0,034	1,409± 0,037
Почки	0,733± 0,022	0,735± 0,018	0,720± 0,019
Надпочечники	0,029± 0,003	0,030± 0,003	0,028± 0,005

*Результаты гистологического исследования внутренних органов крыс в условиях хронической токсичности.*

При микроскопическом изучении внутренних органов экспериментальных животных, выведенных из опыта на 112 день после начала введения препарата, выявлено следующее.

Печень. В гепатоцитах преобладают полиплоидные ядра, а среди центролобулярных клеток обращает на себя внимание увеличение количества двуядерных клеток до  $4,3 \pm 0,1\%$  по сравнению с контролем  $1,2 \pm 0,3\%$  (рисунок 6.1.1.1). Повышение числа полиплоидных и двуядерных 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).

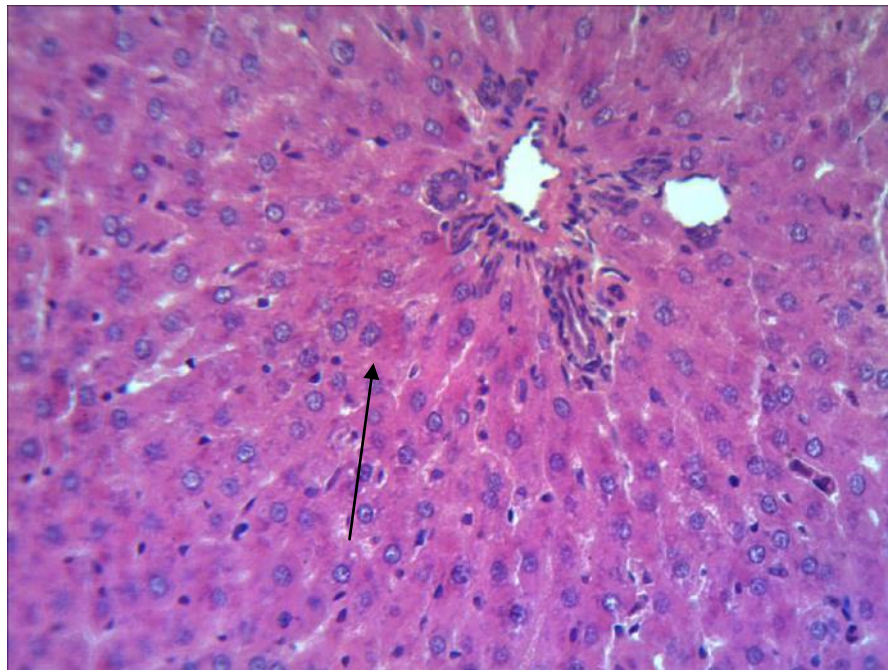


Рисунок 6.1.1.1 - Печень крысы опытной группы. Двуядерные гепатоциты указаны стрелкой. Гематоксилин-эозин. Ув. 300

Синусоидные капилляры долек «спавшиеся», вероятно из-за сдавления гиперплазированными гепатоцитами и отёка перисинусоидальных пространств Диссе (рисунок 6.1.1.2). Преимущественно в центролобулярных отделах долек,

встречаются диссеминированные фокусы гепатоцитов находящихся в состоянии гидропической дистрофии (рисунок 6.1.1.3). Изредка в толще долек наблюдается формирование единичных лимфо-гистиоцитарных гранулём (рисунок 6.1.1.4).

У животных контрольной группы изменений в печени не выявлено (рисунок 6.1.1.5).

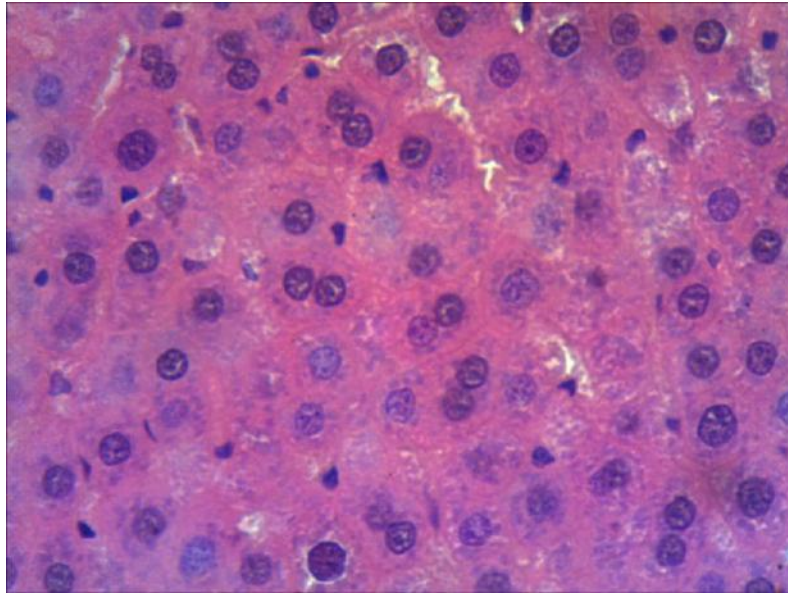


Рисунок 6.1.1.2 - Печень крысы опытной группы. Синусоидные капилляры долек. Гематоксилин-эозин. Ув. 600

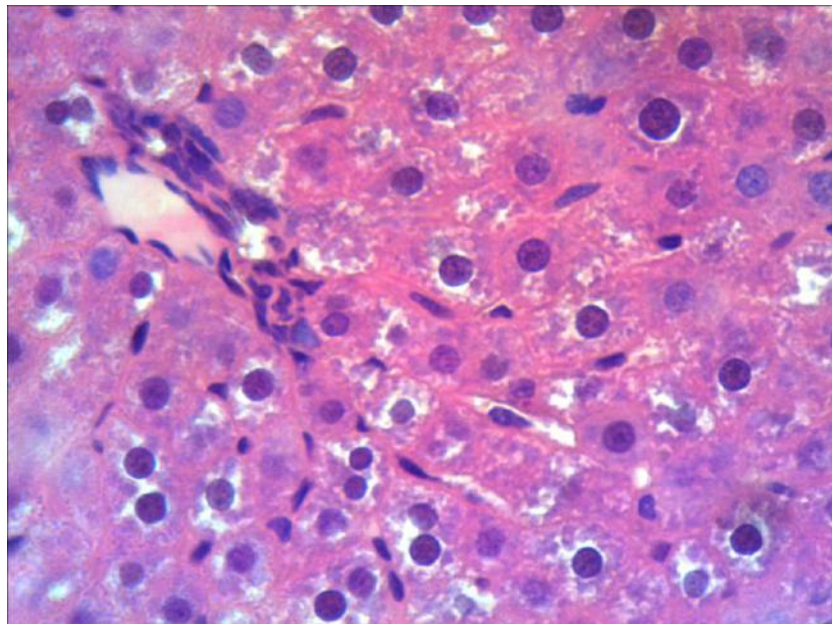


Рисунок 6.1.1.3 - Печень крысы опытной группы. Гепатоциты в состоянии гидропической дистрофии. Гематоксилин-эозин. Ув. 600



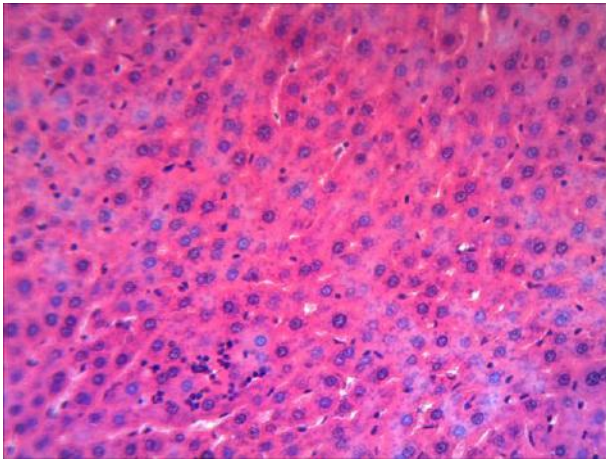


Рисунок 6.1.1.4 - Печень  
крысы опытной группы.  
Единичные лимфо-  
гистиоцитарные гранулёмы.  
Гематоксилин-эозин. Ув.150

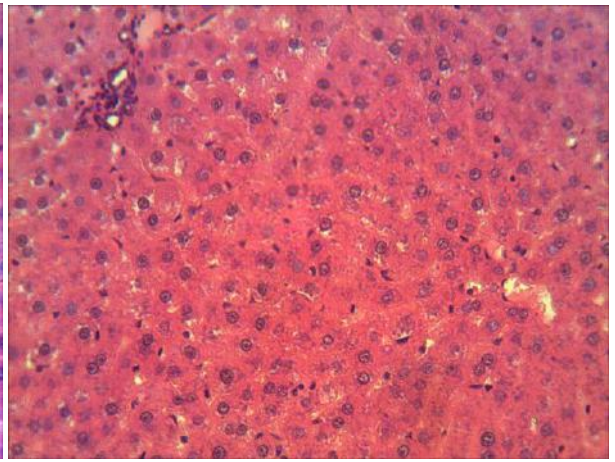


Рисунок 6.1.1.5 - Печень  
крысы контрольной группы.  
Гематоксилин-эозин. Ув.150

#### Селезёнка.

При изучении препаратов селезёнки крыс опытной группы выявлено следующее. Красная пульпа полнокровная (рисунок 6.1.1.6). Относительная объёмная плотность красной пульпы  $48,4 \pm 0,5\%$ .

Белая пульпа гиперплазирована, как за счёт периартериолярных (Т-клеточных) зон (рисунок 6.1.1.7), так и за счёт расширения светлых реактивных центров (В-клеточных) лимфатических фолликулов (рисунок 6.1.1.8). 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 –  $30,2 \pm 0,4\%$  (рисунок 6.1.1.9).

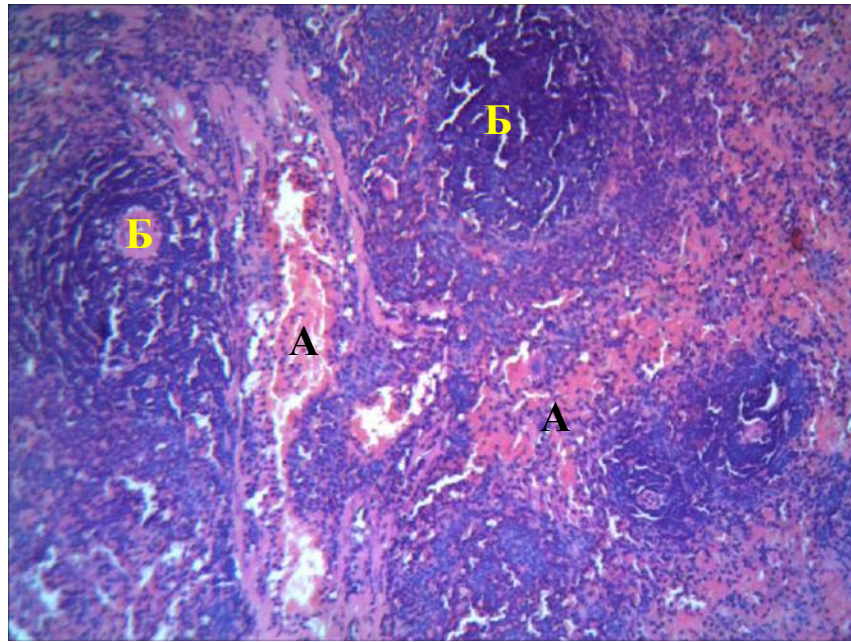


Рисунок 6.1.1.6 - Селезенка крысы опытной группы. А - красная пульпа, Б- белая пульпа. Гематоксилин – эозин. Ув. 150

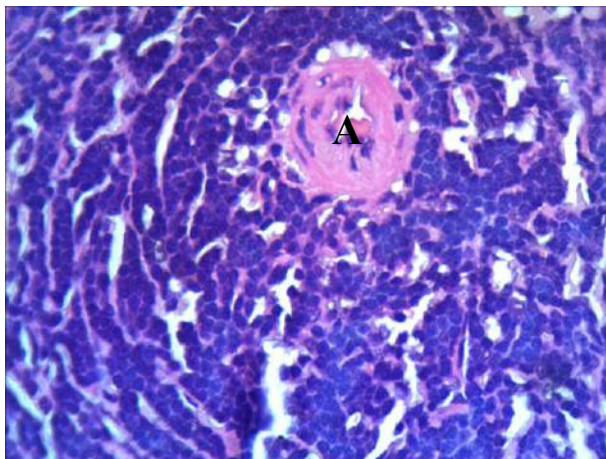


Рисунок 6.1.1.7 - Селезенка крысы опытной группы. Белая пульпа, Т-клеточная зона. А - центральная артерия. Гематоксилин – эозин. Ув. 600

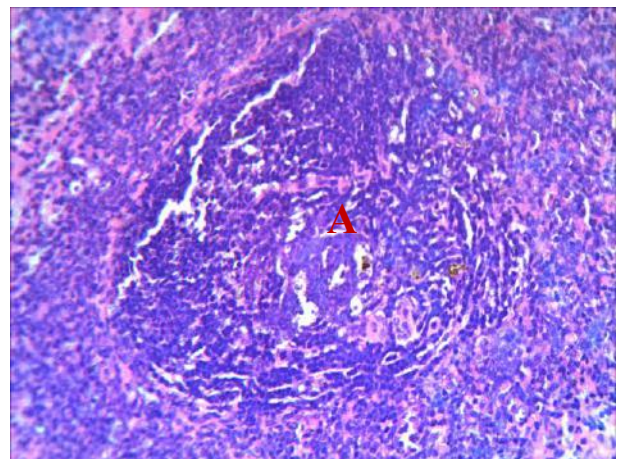


Рисунок 6.1.1.8 - Селезенка крысы опытной группы. Белая пульпа, А – реактивный центр. Гематоксилин – эозин. Ув.300

При гистологическом изучении тканей сердца, почек, легких и кишечника крыс при изучении хронической токсичности не наблюдалось отклонений от обычного строения (сердце - рисунки 6.1.1.10, 6.1.1.11, почка – рисунки 6.1.1.12, 6.1.1.13, легкое - рисунки 6.1.1.14, 6.1.1.15, кишечник – рисунки 6.1.1.46, 6.1.1.17).



Также не выявлено различий при исследовании тканей головного мозга крыс (рисунки 6.1.1.18, 6.1.1.19).

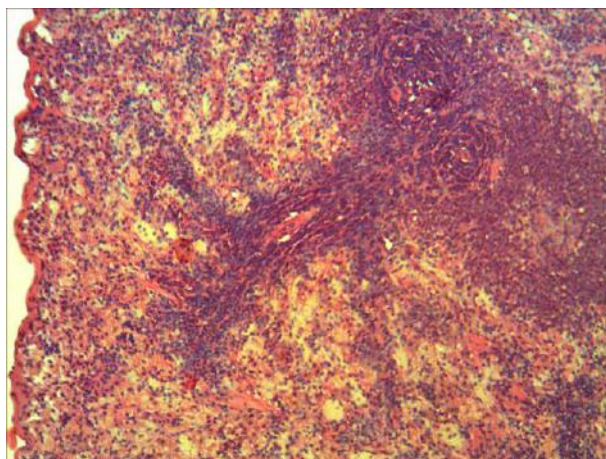


Рисунок 6.1.1.9 - Селезенка крысы контрольной группы.

Гематоксилин – эозин.

Ув.150

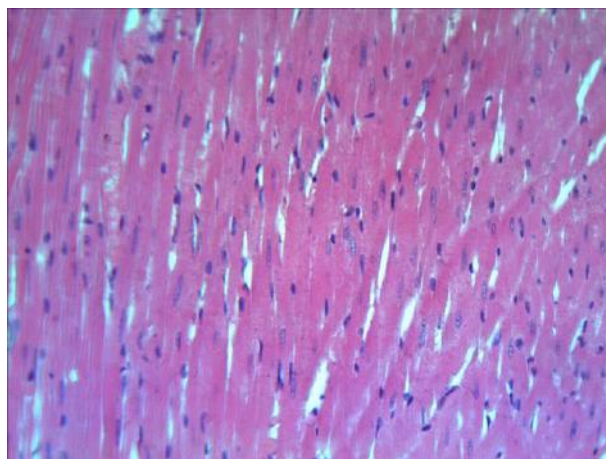


Рисунок 6.1.1.10 - Миокард крысы опытной группы.

Гематоксилин – эозин.

Ув.300

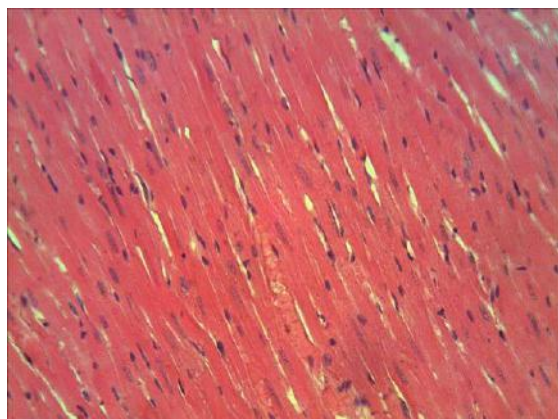


Рисунок 6.1.1.11 - Миокард крысы контрольной группы.

Гематоксилин – эозин.

Ув.300

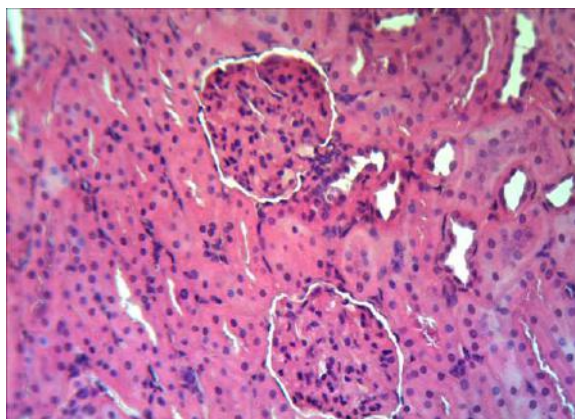


Рисунок 6.1.1.12 - Почка крысы опытной группы.

Гематоксилин – эозин.

Ув.300

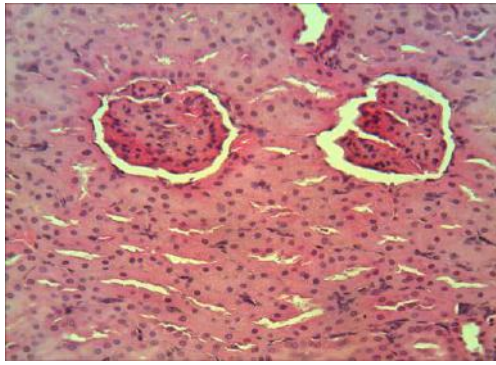


Рисунок 6.1.1.13 - Почка  
крысы контрольной группы.

Гематоксилин – эозин.

Ув.300

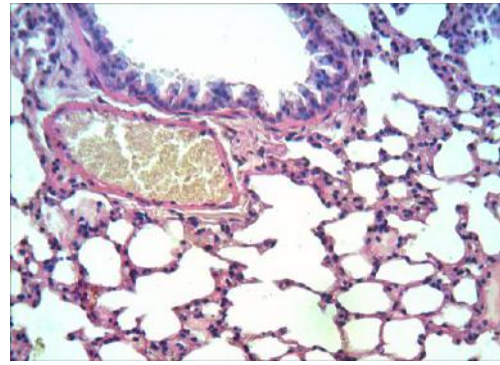


Рисунок 6.1.1.14 - Лёгкое  
крысы опытной группы.

Гематоксилин – эозин.

Ув.300

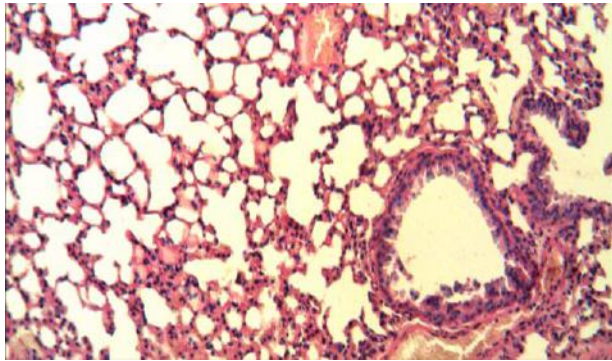


Рисунок 6.1.1.15 - Лёгкое  
крысы контрольной группы.

Гематоксилин – эозин. Ув.150

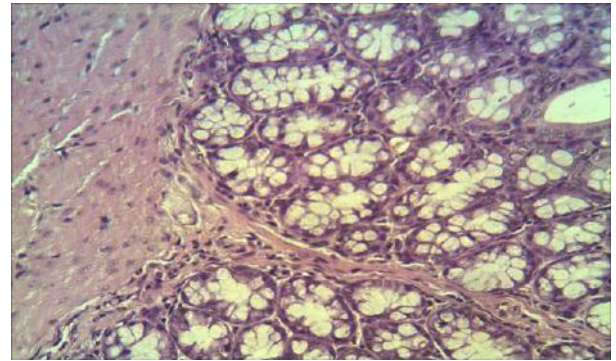


Рисунок 6.1.1.16 - Участок  
кишечника крысы опытной  
группы. Гематоксилин – эозин.

Ув. 300

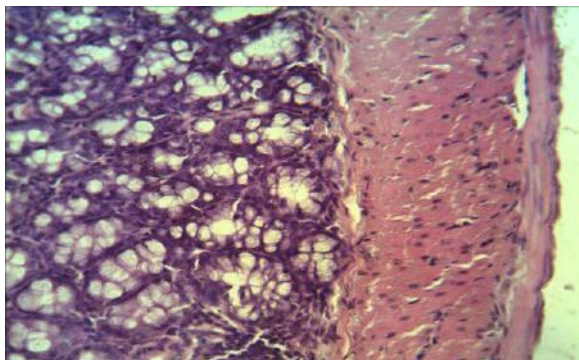


Рисунок 6.1.1.17 - Участок  
кишечника крысы  
контрольной группы.

Гематоксилин – эозин. Ув.300

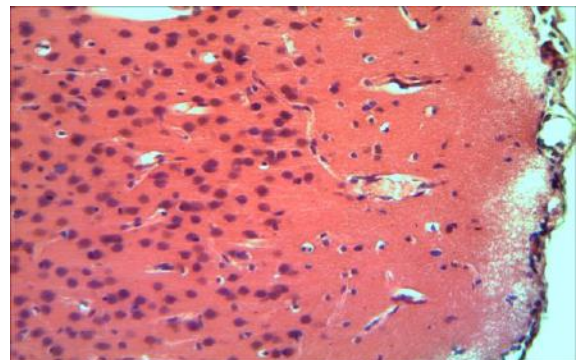


Рисунок 6.1.1.18 - Головной  
мозг крысы опытной группы.

Сенсомоторная зона.

Гематоксилин – эозин. Ув. 300



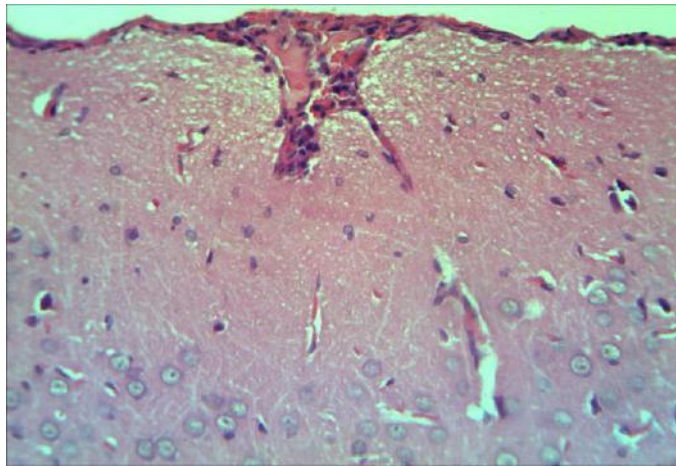


Рисунок 6.1.1.19 - Головной мозг крысы контрольной группы.  
Сенсомоторная зона. Гематоксилин – эозин. Ув. 300

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 препарата на организм подопытных крыс в условиях проведённого эксперимента.

При изучении хронической токсичности на крысах зафиксировано минимальное токсическое воздействие на организм.

### **6.1.2. Результаты исследования хронической токсичности на мышях**

В ходе проведения еженедельных 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. Волосной и кожный покров не изменялся.

Изменений в поведении, реакции тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, в потреблении корма и воды, в характере, режиме дефекации и мочеиспускания не зафиксировано. Во всех группах наблюдался прирост массы тела (таблица 6.1.2.1). Потребление корма и воды обычное (таблица 6.1.2.2).

Таблица 6.1.2.1 - Средние показатели массы тела мышей при исследовании хронической токсичности (граммы)

День наблюдения	Опытная группа	Контр. группа	Интактные мыши
0 (до инъекции)	16,7± 1,0 (n=30)	16,6± 1,0 (n=10)	16,3± 0,9 (n=10)
7	19,0± 0,9 (n=30)	18,9± 1,0 (n=10)	18,4± 0,8 (n=10)
14	21,2± 0,9 (n=30)	21,2± 1,1 (n=10)	20,7± 0,9 (n=10)
21	23,5± 0,9 (n=30)	23,3± 1,0 (n=10)	23,0± 0,9 (n=10)
28	23,9± 0,9 (n=30)	23,7± 1,1 (n=10)	23,4± 1,0 (n=10)
35	23,9± 0,9 (n=30)	23,8± 1,1 (n=10)	23,5± 0,8 (n=10)
42	23,9± 0,9 (n=30)	23,7± 1,1 (n=10)	23,5± 1,0 (n=10)
49	23,8± 1,0 (n=30)	23,6± 1,1 (n=10)	23,3± 1,0 (n=10)
56	23,9± 0,9 (n=30)	23,8± 1,1 (n=10)	23,3± 0,9 (n=10)
63	23,8± 1,0 (n=30)	23,8± 1,1 (n=10)	23,4± 0,9 (n=10)
70	23,8± 0,9 (n=30)	23,7± 1,0 (n=10)	23,4± 0,9 (n=10)
77	23,9± 0,9 (n=30)	23,7± 1,0 (n=10)	23,3± 1,0 (n=10)
84	23,8± 0,9 (n=30)	23,7± 1,2 (n=10)	23,4± 1,0 (n=10)
91	23,9± 0,9 (n=30)	23,7± 1,1 (n=10)	23,3± 1,1 (n=10)
98	23,8± 1,0 (n=30)	23,6± 1,0 (n=10)	23,4± 0,9 (n=10)
105	23,8± 1,0 (n=30)	23,8± 1,2 (n=10)	23,3± 0,9 (n=10)
112	23,6± 1,1 (n=30)	23,4± 1,1 (n=10)	23,5± 0,7 (n=10)
119	23,7± 1,1 (n=15)	23,5± 1,0 (n=5)	23,3± 0,8 (n=5)
126	23,6± 1,1 (n=15)	23,5± 1,0 (n=5)	23,3± 0,6 (n=5)
133	23,6± 1,1 (n=15)	23,5± 1,1 (n=5)	23,5± 0,7 (n=5)
140	23,7± 1,1 (n=15)	23,4± 1,1 (n=5)	23,4± 0,6 (n=5)

При анализе показателей веса мышей выявлен устойчивый прирост массы тела. Статистически достоверных различий между опытной и контрольной группами не выявлено ( $p > 0,1$ ).

Таблица 6.1.2.2 - Потребление корма мышами при исследовании хронической токсичности (грамм корма/килограмм веса животного в сутки)

День наблюдения	Опытная группа	Контр. группа	Интактные крысы
0 (до инъекции)	293,9± 12,4 (n=30)	292,4± 9,9 (n=10)	290,8± 11,5 (n=10)
7	295,3± 13,2 (n=30)	291,8± 10,0 (n=10)	296,1± 10,8 (n=10)
14	295,2± 10,7 (n=30)	287,2± 11,3 (n=10)	294,6± 13,7 (n=10)
21	295,0± 11,5 (n=30)	296,5± 8,8 (n=10)	296,5± 9,0 (n=10)
28	295,0± 13,4 (n=30)	299,1± 9,1 (n=10)	298,8± 9,5 (n=10)
35	296,2± 11,7 (n=30)	296,8± 9,1 (n=10)	302,6± 7,2 (n=10)
42	293,1± 10,2 (n=30)	297,5± 13,2 (n=10)	294,3± 12,6 (n=10)
49	296,6± 12,7 (n=30)	288,8± 11,7 (n=10)	295,0± 12,3 (n=10)
56	294,5± 12,4 (n=30)	299,5± 10,1 (n=10)	295,4± 10,9 (n=10)
63	292,4± 11,5 (n=30)	292,1± 6,0 (n=10)	294,6± 13,8 (n=10)
70	296,5± 12,1 (n=30)	299,6± 12,1 (n=10)	297,9± 11,6 (n=10)
77	294,9± 10,9 (n=30)	290,5± 12,0 (n=10)	288,7± 11,9 (n=10)
84	297,7± 12,5 (n=30)	297,4± 10,2 (n=10)	287,8± 11,1 (n=10)
91	294,7± 13,0 (n=30)	291,2± 9,7 (n=10)	293,3± 12,6 (n=10)
98	294,7± 10,5 (n=30)	292,1± 8,1 (n=10)	290,8± 9,0 (n=10)
105	295,0± 11,2 (n=30)	301,8± 10,9 (n=10)	294,5± 13,9 (n=10)
112	291,2± 11,4 (n=30)	302,8± 10,9 (n=10)	293,6± 9,5 (n=10)
119	291,9± 13,8 (n=15)	289,5± 10,6 (n=5)	299,3± 12,9 (n=5)
126	289,4± 11,3 (n=15)	303,6± 6,7 (n=5)	298,7± 13,0 (n=5)
133	289,2± 13,9 (n=15)	293,5± 15,9 (n=5)	293,4± 13,5 (n=5)
140	291,8± 10,4 (n=15)	288,8± 15,1 (n=5)	291,5± 13,3 (n=5)

Статистически достоверных различий в потреблении корма между группами на разных сроках наблюдения не выявлено ( $p > 0,1$ ).

Клинические анализы крови выполнялись в день опыта (до введения препарата), затем на 28-й, 56-й, 84-й и 112-й дни после начала эксперимента и спустя месяц (140-й день опыта) после отмены препарата. Результаты анализов крови лабораторных мышей показаны в таблицах 6.1.2.3, 6.1.2.4. Статистически значимых различий между показателями опытной и контрольной групп, а также

между значениями показателей крови интактных мышей, содержащихся в идентичных условиях, не выявлено ( $p>0,1$ ).

Таблица 6.1.2.3 - Гематологические показатели интактных мышей

Показатели	0 день n=10	28-е сутки n=10	56-е сутки n=10	84-е сутки n=10	112-е сутки n=10	140-е сутки n=5
Эритроциты, *10 <sup>12</sup> /л	9,2± 0,8	8,8± 0,6	9,6± 0,7	9,3± 0,9	9,2± 0,8	9,5± 0,8
Лейкоциты, *10 <sup>9</sup> /л	9,0± 2,3	8,3± 1,9	7,3± 2,2	8,4± 2,0	9,1± 2,0	7,6± 1,1
Гемоглобин, г/л	145,2± 12,5	145,0± 15,3	147,2± 14,5	137,2± 12,4	144,4± 14,4	146,4± 14,6
Гематокрит, %	43,8± 1,3	43,5± 1,1	44,0± 1,2	44,4± 1,1	43,9± 1,4	44,0± 1,0
Нейтрофилы %	27,7± 4,2	26,9± 4,6	25,8± 2,8	25,4± 3,1	24,8± 2,1	28,4± 3,4
Лимфоциты, %	67,6± 3,7	69,3± 4,0	69,6± 2,4	70,0± 3,3	70,9± 2,3	67,5± 3,1
Моноциты, %	1,9± 0,5	1,7± 0,6	2,1± 0,6	2,0± 0,7	1,8± 0,6	1,8± 0,8
Эозинофилы, %	2,8± 0,9	2,0± 0,8	2,6± 1,0	2,5± 0,7	2,5± 0,9	2,3± 1,3

Таблица 6.1.2.4 - Гематологические показатели 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=30	Контр. n=10	Опыт n=30	Контр. n=10	Опыт n=30	Контр. n=10	Опыт n=30	Контр. n=10	Опыт n=15	Контр. n=5
Эритроциты, *10 <sup>12</sup> /л	9,3± 0,7	9,5± 0,7	9,1± 0,8	9,2± 0,6	9,3± 0,8	9,4± 0,6	9,3± 0,7	9,1± 0,8	9,3± 0,7	8,9± 0,4	9,4± 0,6	9,6± 0,4
Лейкоциты, *10 <sup>9</sup> /л	8,2± 1,7	8,2± 1,7	7,9± 1,9	7,9± 2,0	8,5± 2,2	9,0± 1,5	8,4± 1,9	8,8± 2,3	8,7± 2,3	8,4± 1,9	8,3± 2,1	7,7± 2,1
Гемоглобин, г/л	146,7± 14,9	137,9± 15,0	145,7± 14,3	142,6± 13,2	147,5± 12,5	144,4± 14,0	144,4± 14,7	151,7± 13,0	144,6± 14,2	142,5± 14,3	144,1± 16,4	138,2± 5,9
Гематокрит, %	43,7± 1,1	44,5± 0,9	44,0± 1,1	43,9± 1,2	43,9± 1,3	43,6± 1,3	44,2± 1,1	44,6± 1,2	43,5± 1,1	44,4± 1,0	44,1± 1,4	44,3± 1,4
Нейтрофилы %	26,2± 3,8	27,6± 1,8	26,6± 3,3	26,1± 4,2	25,9± 3,8	27,2± 3,9	27,1± 3,9	25,0± 3,3	26,6± 3,6	27,0± 3,6	26,4± 3,8	27,9± 1,8
Лимфоциты, %	69,3± 3,5	68,2± 2,5	68,8± 3,1	69,7± 3,6	69,9± 3,6	68,5± 3,9	68,2± 3,7	70,2± 3,5	68,8± 3,3	68,6± 4,0	68,7± 3,9	67,7± 1,7
Моноциты, %	2,1± 0,6	1,8± 0,7	2,2± 0,5	2,1± 0,5	2,0± 0,5	2,0± 0,6	2,0± 0,6	2,3± 0,7	2,0± 0,4	1,7± 0,7	2,1± 0,5	2,5± 0,5
Эозинофилы, %	2,5± 0,9	2,5± 0,8	2,4± 0,9	2,1± 0,9	2,3± 1,0	2,3± 1,0	2,7± 0,8	2,5± 0,9	2,5± 0,9	2,7± 0,9	2,8± 0,9	2,0± 0,8



*Биохимические показатели крови мышей при исследовании хронической токсичности.* Средние биохимические показатели крови мышей показаны в таблицах 6.1.2.5, 6.1.2.6.

Таблица 6.1.2.5 - Средние значения показателей биохимии сыворотки крови интактных мышей

Показатели	0 день n=10	28-е сутки n=10	56-е сутки n=10	84-е сутки n=10	112-е сутки n=10	140-е сутки n=5
АсАТ, мккат/л	95,13± 4,52	93,65± 3,83	92,85± 4,04	93,24± 4,89	92,55± 4,38	91,60± 5,90
АлАТ, мккат/л	16,34± 0,74	16,24± 0,89	16,00± 1,12	16,21± 0,90	16,37± 0,90	15,78± 0,96
ЩФ, мккат/л	95,29± 5,19	97,02± 5,69	95,52± 4,92	95,10± 3,25	95,78± 5,07	98,96± 5,30
Креатинин, мкмоль/л	43,75± 3,82	44,35± 4,22	42,57± 3,53	41,87± 3,40	44,18± 3,91	45,18± 3,31
Мочевина, ммоль/л	7,21± 0,59	7,01± 0,47	7,06± 0,49	6,98± 0,66	6,94± 0,50	6,81± 0,43
Холестерин, ммоль/л	3,12± 0,18	3,09± 0,14	3,14± 0,18	3,07± 0,16	3,22± 0,15	3,01± 0,09
Билирубин, мкмоль/л	5,99± 1,53	7,22± 1,13	7,04± 1,03	6,17± 1,68	6,33± 1,19	6,20± 1,26
Глюкоза, моль/л	6,50± 0,41	6,67± 0,35	6,65± 0,41	6,57± 0,38	6,50± 0,37	6,85± 0,44

Изменения в биохимических показателях сыворотки крови зафиксированы только к 112 дню эксперимента. Отмечено увеличение концентрации аланинаминотрансферазы. На 112-е сутки среднее значение АлАТ у интактных мышей составило 16,37± 0,90 мккат/л, у животных контрольной группы - 15,74± 0,88 мккат/л ( $p>0,1$ ), в то время как у мышей опытной группы - 18,48± 0,97 мккат/л ( $p<0,01$  с обеими группами). На 140-е сутки значение АлАТ у интактных мышей составило 15,78± 0,96 мккат/л, у животных контрольной группы - 16,04± 0,62 мккат/л ( $p>0,1$ ), а у мышей опытной группы - 15,84± 0,93 мккат/л ( $p>0,1$ ).

Таблица 6.1.2.6 - Средние значения показателей биохимии сыворотки 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=30	Контр. n=10	Опыт n=30	Контр. n=10	Опыт n=30	Контр. n=10	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± 0,97	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

То есть через месяц после отмены препарата (140-е сутки опыта) концентрация АлАТ снизилась и не отличалась от значений в контрольных группах. Данный факт позволяет сделать заключение об обратимости токсического воздействия препарата на печень опытных животных в условиях хронического эксперимента.

*Функция выделительной системы.*

Статистически достоверных различий в показателях анализов мочи у животных опытной, контрольной групп и интактных крыс не выявлено ( $p > 0,1$ ).

Таблица 6.1.2.7 - Средние показатели анализов мочи мышей при изучении хронической токсичности

Сроки	Группы животных	Плотность мочи	pH мочи
0 день	Опытная группа, n=30	1024± 9	7,1± 0,2
	Контрольная группа, n=10	1026± 10	7,1± 0,2
	Интактные мыши, n=10	1023± 11	7,1± 0,2
28-е сутки	Опытная группа, n=30	1025± 9	7,1± 0,2
	Контрольная группа, n=10	1021± 8	7,1± 0,2
	Интактные мыши, n=10	1025± 9	7,2± 0,2
56-е сутки	Опытная группа, n=30	1024± 8	7,0± 0,2
	Контрольная группа, n=10	1029± 9	7,0± 0,1
	Интактные мыши, n=10	1022± 8	7,1± 0,2
84-е сутки	Опытная группа, n=30	1022± 9	7,2± 0,2
	Контрольная группа, n=10	1025± 6	7,1± 0,1
	Интактные мыши, n=10	1021± 8	7,1± 0,2
112-е сутки	Опытная группа, n=30	1023± 10	7,1± 0,2
	Контрольная группа, n=10	1023± 8	7,3± 0,1
	Интактные мыши, n=10	1019± 8	7,1± 0,1
140-е сутки	Опытная группа, n=15	1022± 9	7,0± 0,2
	Контрольная группа, n=5	1028± 11	7,2± 0,2
	Интактные мыши, n=5	1026± 4	7,0± 0,2

*Результаты патоморфологического исследования.*

Патоморфологическое исследование выполнялось на 112 день после начала введения препарата.

*Внешний осмотр.*

При внешнем визуальном осмотре тел подопытных животных различий между опытной и контрольными группами не выявлено. Шерсть гладкая, блестящая, кожа эластичная, подвижная, подкожная клетчатка умеренно выражена, видимые слизистые оболочки бледные, чистые, без изъязвлений и посторонних наложений, патологические выделения из естественных отверстий тела отсутствовали.

*Макроскопическое исследование.*

При макроскопическом исследовании внутренних органов различий между опытной и контрольными группами животных не обнаружено.

*Масса внутренних органов.*

Статистический анализ показателей массы внутренних органов не выявил достоверных различий между опытной, контрольной группами и интактными животными.

Таблица 6.1.2.8 - Средние показатели массы внутренних органов мышей при исследовании хронической токсичности, на 112 день эксперимента (граммы)

Показатели	Опытная группа n=15	Контрольная группа n=5	Интактные мыши n=5
Селезёнка	0,091± 0,003	0,091± 0,005	0,088± 0,004
Печень	0,542± 0,019	0,543± 0,029	0,524± 0,027
Головной мозг	0,130± 0,004	0,130± 0,007	0,125± 0,006
Сердце	0,048± 0,002	0,048± 0,003	0,046± 0,002
Лёгкие	0,132± 0,005	0,132± 0,007	0,128± 0,006
Почки	0,127± 0,004	0,127± 0,007	0,123± 0,006
Надпочечники	0,002± 0,0003	0,003± 0,0003	0,002± 0,0003

*Результаты гистологического исследования внутренних органов мышей в условиях хронической токсичности.*

Исследование печени, как основного органа биотрансформации ксенобиотиков, показало, что морфологическая картина печени, как в условиях опыта, так и контроля сходна. Печень и опытных и контрольных животных имеет классическое балочное строение (рисунок 6.1.2.1).

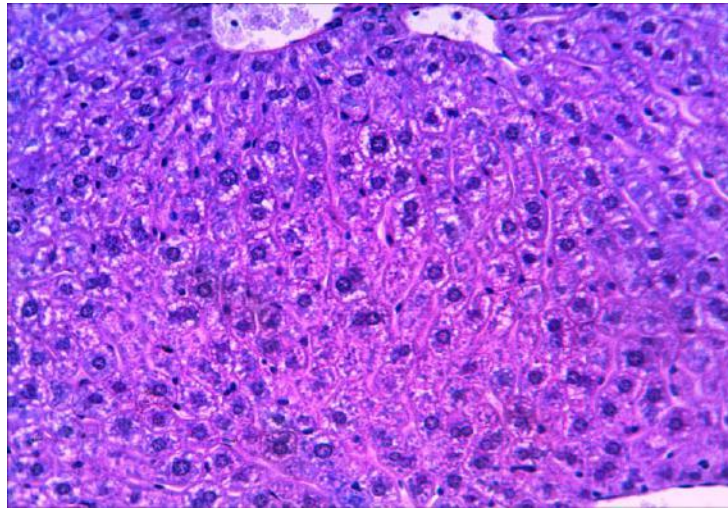


Рисунок 6.1.2.1 - Печень мыши опытной группы.  
Гематоксилин – эозин. Ув. 300

Признаков повреждения гепатоцитов нет. У животных обеих групп распределение богатых гликогеном клеток в пределах дольки мозаичное. Но у двух животных (13,3%) в условиях опыта обнаруживаются явления гидропической дистрофии, а также единичные оксифильные тельца Каунсельмена (рисунок 6.1.2.2) - запрограммированная гибель отдельных гепатоцитов. В контрольной группе, и у остальных мышей опытной группы эти тельца не выявляются. Активизация апоптотической доминанты среди гепатоцитов в печени у данных опытных животных подтверждается иммуногистохимическими исследованиями с использованием антител к каспазе-3 (рисунки 6.1.2.3, 6.1.2.4).

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 обнаруживаются скопления перисинусоидальных макрофагов (рисунок 6.1.2.5).



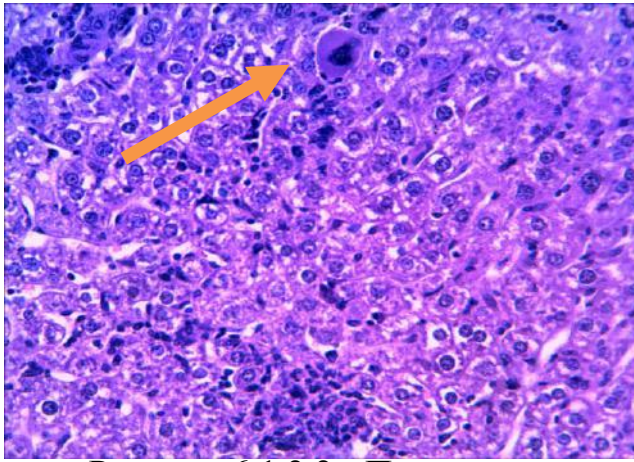


Рисунок 6.1.2.2 - Печень мыши  
опытной группы. Тельце  
Каунсельмена (указано стрелкой).  
Гематоксилин – эозин. Ув. 300

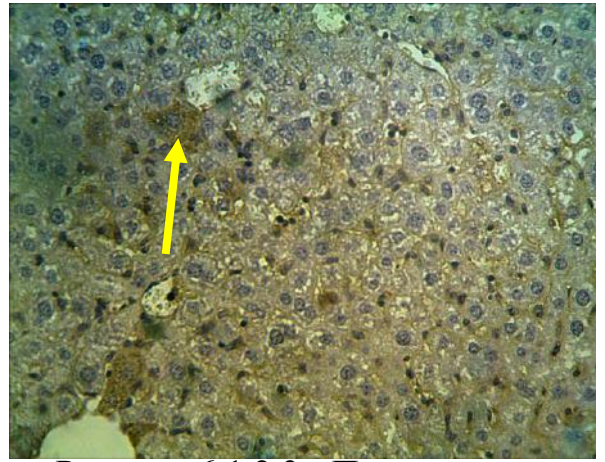


Рисунок 6.1.2.3 - Печень мыши  
опытной группы.  
Иммуногистохимия, экспрессия  
каспазы-3 в гепатоцитах. Ув. 300

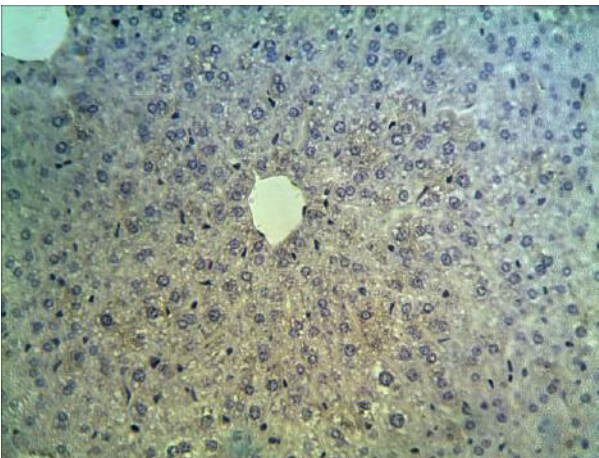


Рисунок 6.1.2.4 - Печень мыши  
контрольной группы.  
Иммуногистохимия, отсутствие  
экспрессии каспазы-3 в  
гепатоцитах. Ув.300

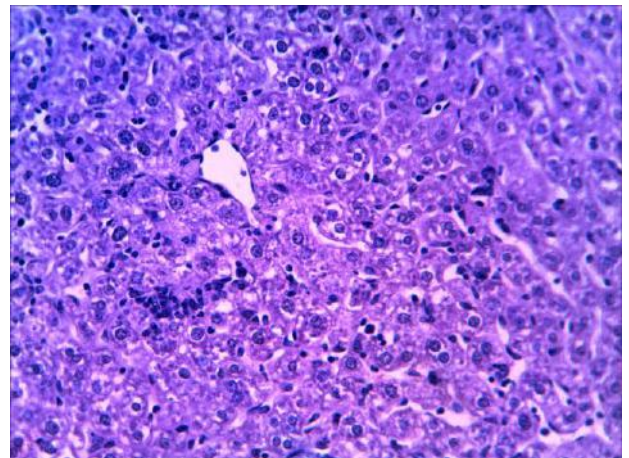


Рисунок 6.1.2.5 - Печень мыши  
опытной группы. Стрелкой  
указаны скопления  
перисинусоидальных макрофагов.  
Гематоксилин – эозин. Ув. 300

Исследование почек, как основного органа выведения, показало, что морфологическая характеристика почек контрольных и опытных животных идентична (рисунки 6.1.2.6, 6.1.2.7). Как со стороны почечных телец, осуществляющих фильтрацию, так и со стороны почечных канальцев,



участвующих в процессах реабсорбции, какой либо структурной реорганизации в почках опытных животных не обнаружено.

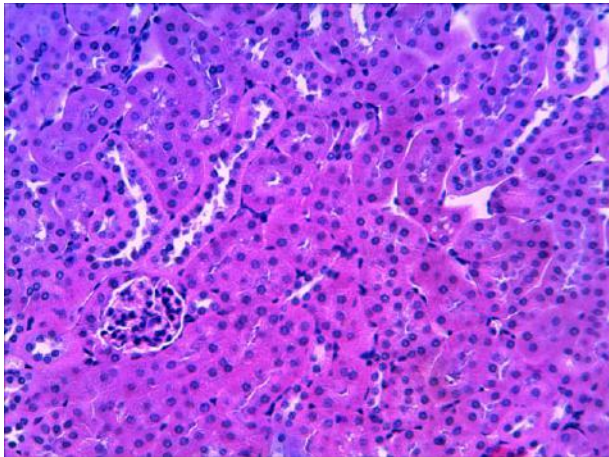


Рисунок 6.1.2.6 - Почка мыши  
контрольной группы.  
Гематоксилин – эозин. Ув. 300

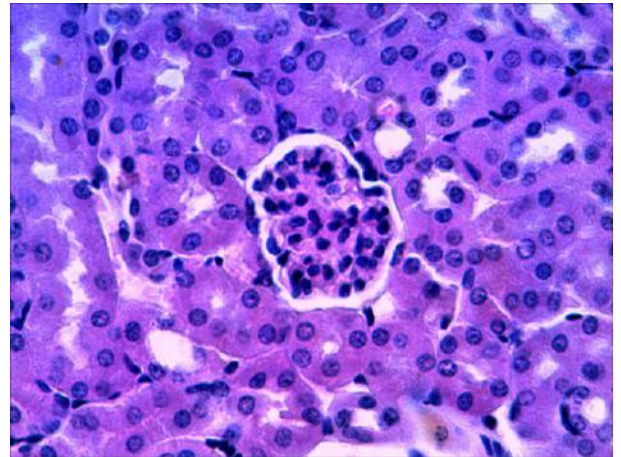


Рисунок 6.1.2.7 - Почка мыши  
опытной группы. Гематоксилин –  
эозин. Ув.600

В сердцах исследованных животных при хроническом воздействии препарата структурных изменений не обнаруживается. Миокард опытной и контрольной группы животных имеет сходное строение (рисунки 6.1.2.8, 6.1.2.9).

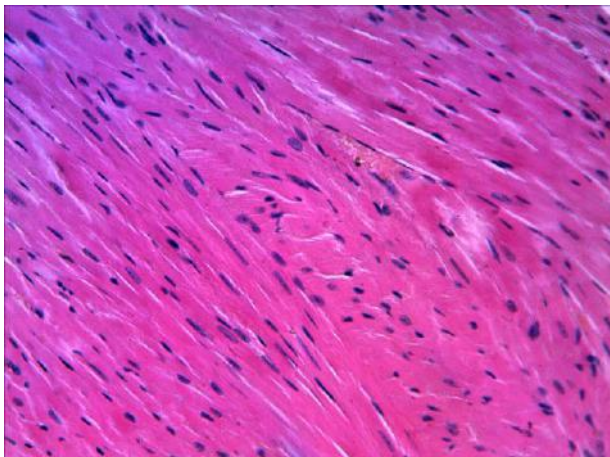


Рисунок 6.1.2.8 - Миокард  
мышы контрольной группы.  
Гематоксилин – эозин. Ув. 300

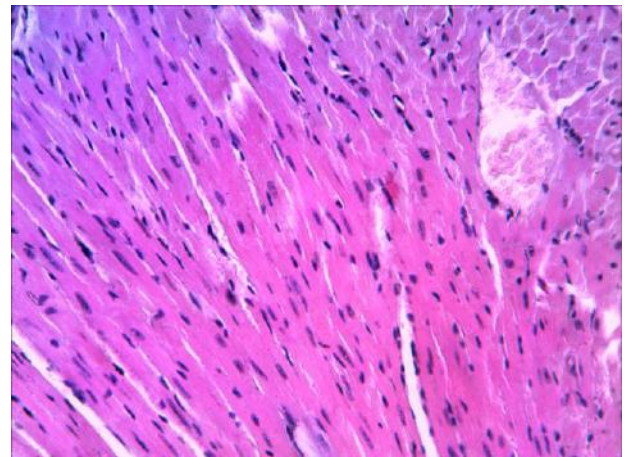


Рисунок 6.1.2.9 - Миокард  
мышы опытной группы.  
Гематоксилин – эозин. Ув. 300



При морфологическом исследовании сенсомоторных зон коры головного мозга животных опытной группы, какой либо ее структурной реорганизации не обнаружено (рисунки 6.1.2.10, 6.1.2.11).

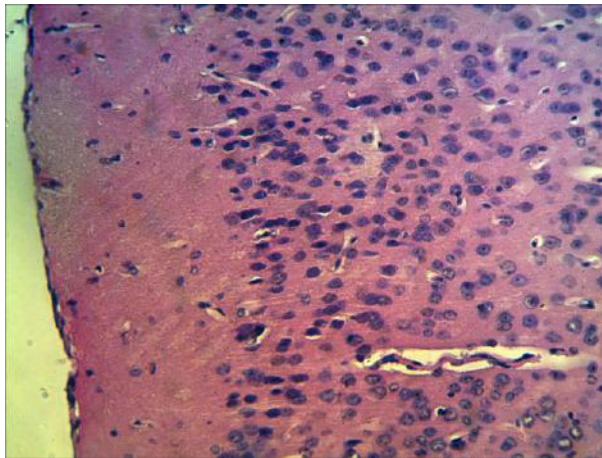


Рисунок 6.1.2.10 - Головной мозг  
мышь контрольной группы.

Сенсомоторная зона коры.

Гематоксилин – эозин. Ув. 300

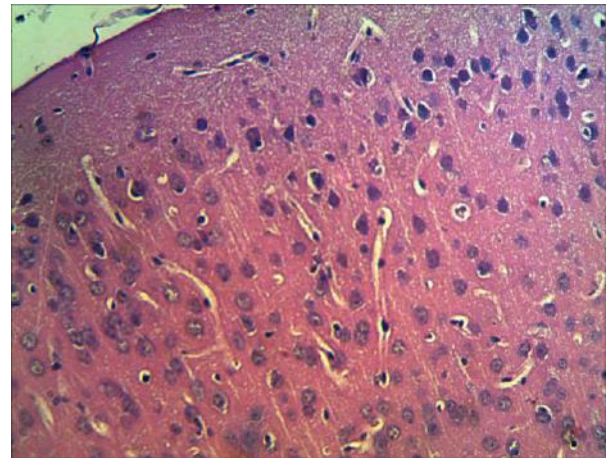


Рисунок 6.1.2.11 - Головной  
мозг мышь опытной группы.

Сенсомоторная зона.

Гематоксилин – эозин. Ув. 300

В селезенке опытных животных при длительном воздействии препарата ни в белой, ни в красной пульпе изменений не выявлено (рисунки 6.1.2.12, 6.1.2.13).

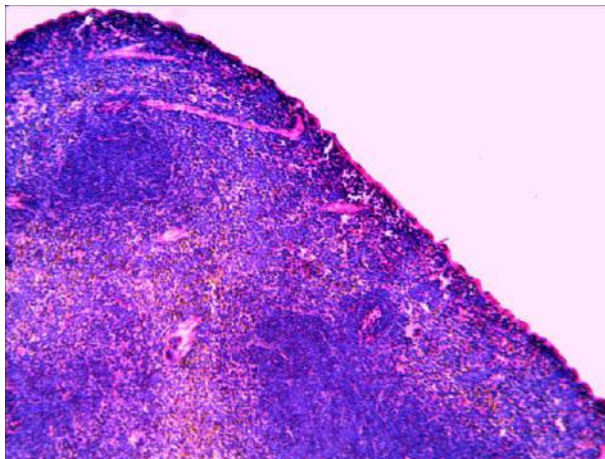


Рисунок 6.1.2.12 - Селезёнка  
мышь контрольной группы.

Гематоксилин – эозин. Ув. 150

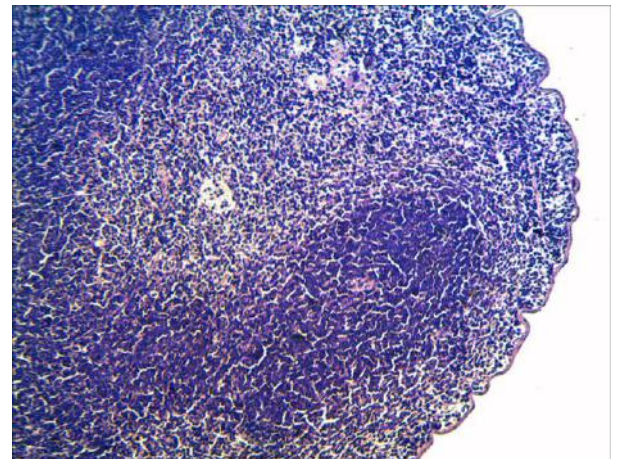


Рисунок 6.1.2.13 - Селезёнка  
мышь опытной группы.

Гематоксилин – эозин. Ув. 150

В легких опытной группы животных каких либо патологических процессов, как в бронхах (рисунок 6.1.2.14), так и в элементах респираторного отдела (рисунок 6.1.2.15) не обнаружено.



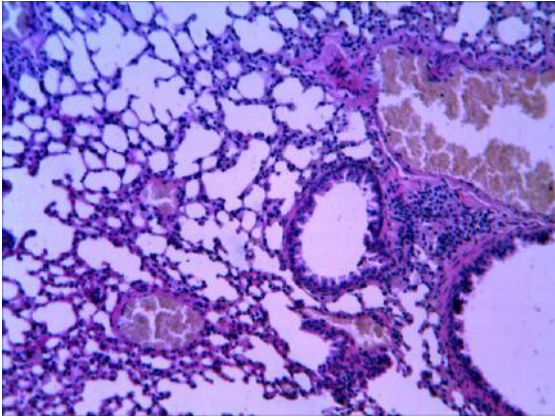


Рисунок 6.1.2.14 - Лёгкие мыши опытной группы. Гематоксилин-эозин. Ув.150

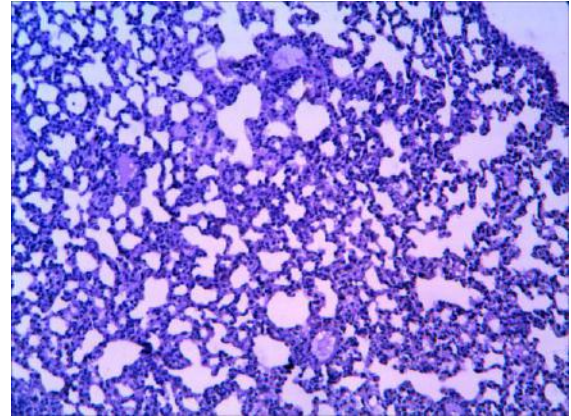


Рисунок 6.1.2.15 - Лёгкие мыши опытной группы.

Гематоксилин – эозин. Ув.150

Значимых изменений у животных контрольной (рисунок 6.1.2.16) и опытной (рисунок 6.1.2.17) групп в кишечнике не обнаружено.

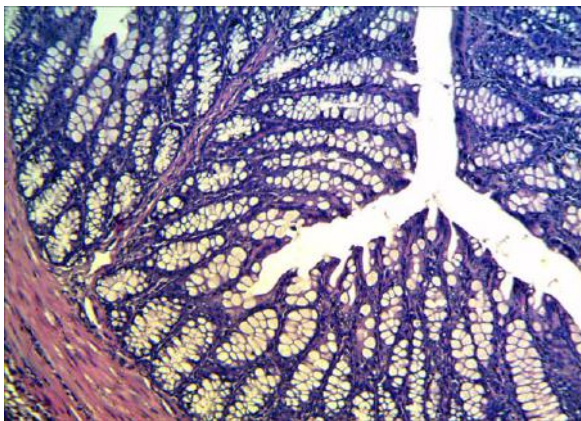


Рисунок 6.1.2.16 - Участок кишечника мыши контрольной группы. Гематоксилин – эозин.

Ув.150

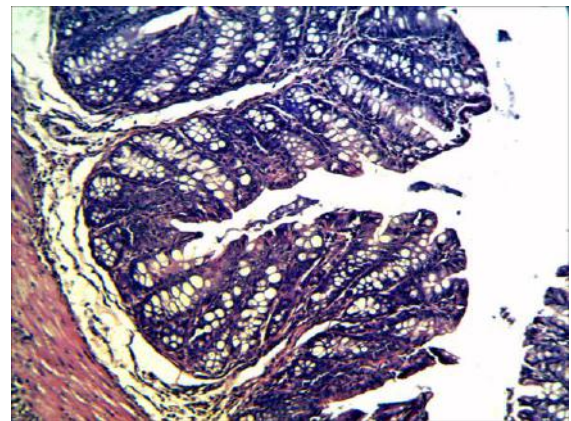


Рисунок 6.1.2.17 - Участок кишечника мыши опытной группы. Гематоксилин – эозин.

Ув. 150

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

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.

## 6.2 Результаты исследования острой токсичности метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов

Для изучения острой токсичности препарата были выполнены эксперименты с использованием 72 взрослых крыс линии «Wistar» массой 180-200 г. (36 самцов и 36 самок) и 72 взрослых мышей линии BALB/C массой 18-20 г. (36 самцов и 36 самок). Крысам препарат вводился внутримышечно, мышам – внутрибрюшинно. Эксперименты проводились согласно методикам, описанным в главе «Материалы и методы».

При исследовании острой токсичности гибели животных (таблицы 6.2.1, 6.2.2) за весь период наблюдения на протяжении 15 дней не наблюдалось.

Таблица 6.2.1 - Острая токсичность препарата при внутримышечном введении препарата крысам

Группа	Количество на одно животное, мл	Кол-во крыс	Из них пало	Клиника интоксикации
№1	0,5	12	0	Отсутствует
№2	1,5	12	0	Отсутствует
№3	5,0	12	0	Отсутствует

Таблица 6.2.2 - Острая токсичность препарата при внутрибрюшинном введении препарата мышам

Группа	Количество на 1 животное, мл	Кол-во мышей	Из них пало	Клиника интоксикации
№1	0,1	12	0	Отсутствует
№2	0,5	12	0	Отсутствует
№3	1,0	12	0	Отсутствует

*Клинические наблюдения за крысами.*

Первые сутки после введения препарата.

Общее состояние удовлетворительное, поведение обычное, движения координированы, судорог не отмечалось. Реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители – идентичная наблюдавшейся до эксперимента в обеих группах. Волосяной и кожный покров не изменялся. Потребление корма и воды обычное.

В последующие 14 дней изменений в поведении, реакции тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, в потреблении корма и воды, в характере, режиме дефекации и мочеиспускания не было.

*Клинические наблюдения за мышами.*

Первые сутки после введения препарата.

Общее состояние удовлетворительное, поведение обычное, движения координированы, судорог не отмечалось. Реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители – идентичная наблюдавшейся до эксперимента в обеих группах. Волосяной и кожный покров не изменялся. Потребление корма и воды обычное.

В последующие 14 дней изменений в поведении, реакции тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, в потреблении корма и воды, в характере, режиме дефекации и мочеиспускания не было.

*Динамика массы тела.*

Результаты измерения массы тела крыс отражены в таблице 6.2.3. Статистически достоверных различий в прибавке массы за 14 суток не выявлено. Средняя прибавка массы крыс за время наблюдения в опытных группах составила: группа, получавшая 0,5 мл препарата -  $21 \pm 1,8$  грамм; группа, получавшая 1,5 мл препарата -  $20 \pm 2,6$  грамм; группа, получавшая 5,0 мл препарата -  $20 \pm 1,9$  грамм. Средняя прибавка массы за время наблюдения в контрольных группах составила: группа, получавшая 0,5 мл 0,9% раствора хлористого натрия -  $18 \pm 1,5$  грамм; группа, получавшая 1,5 мл 0,9% раствора хлористого натрия -  $19 \pm 2,7$  грамм; группа, получавшая 5,0 мл 0,9% раствора

хлористого натрия -  $20 \pm 2,5$  грамм. Статистически достоверных различий в прибавке массы тела крыс в опытных и контрольных группах не выявлено ( $p > 0,1$ ).

Таблица 6.2.3 - Средние значения массы тела крыс при исследовании острой токсичности

Группа, вводимое вещество	Исх. масса (г)		7-е сутки (г)		14-е сутки (г)	
Опытная - 0,5мл препарата	189 $\pm$ 5,5	p>0,5	198 $\pm$ 5,9	p>0,5	211 $\pm$ 5,7	p>0,1
Контрольная – 0,5мл физ. р-ра	191 $\pm$ 4,1		199 $\pm$ 4,5		209 $\pm$ 4,8	
Опытная - 1,5мл препарата	187 $\pm$ 5,0	p>0,5	196 $\pm$ 4,6	p>0,5	207 $\pm$ 4,5	p>0,5
Контрольная – 1,5мл физ. р-ра	188 $\pm$ 5,8		196 $\pm$ 5,0		207 $\pm$ 5,8	
Опытная - 5,0мл препарата	192 $\pm$ 6,8	p>0,1	201 $\pm$ 7,3	p>0,1	212 $\pm$ 6,5	p>0,1
Контрольная – 5,0мл физ. р-ра	190 $\pm$ 6,0		199 $\pm$ 6,3		210 $\pm$ 6,7	

Результаты измерения массы тела мышей отражены в таблице 6.2.4. Статистически достоверных различий в прибавке массы за 14 суток не выявлено. Средняя прибавка массы мышей за время наблюдения в опытных группах составила: группа, получавшая 0,1 мл препарата -  $2,3 \pm 0,9$  грамм; группа, получавшая 0,5 мл препарата -  $1,9 \pm 1,2$  грамм; группа, получавшая 1,0 мл препарата -  $2,2 \pm 0,9$  грамм. Средняя прибавка массы за время наблюдения в контрольных группах составила: группа, получавшая 0,1 мл 0,9% раствора хлористого натрия -  $2,2 \pm 0,7$  грамм; группа, получавшая 0,5 мл 0,9% раствора хлористого натрия –  $2,8 \pm 0,7$  грамм; группа, получавшая 1,0 мл 0,9% раствора хлористого натрия -  $2,0 \pm 1,0$ грамм. Статистически достоверных различий в

прибавке массы тела мышей в опытных и контрольных группах не выявлено ( $p>0,1$ ).

Таблица 6.2.4 - Средние значения массы тела мышей при исследовании острой токсичности

Группа, вводимое вещество	Исх. масса (г)		7-е сутки (г)		14-е сутки (г)	
Опытная - 0,1мл препарата	16,8± 1,1	$p>0,5$	18,1± 1,4	$p>0,1$	19,1± 1,8	$p>0,5$
Контрольная – 0,1мл физ. р-ра	16,5± 1,1		17,5± 1,1		18,7± 1,2	
Опытная - 0,5мл препарата	16,8± 0,8	$p>0,1$	17,8± 1,1	$p>0,1$	18,7± 1,7	$p>0,1$
Контрольная – 0,5мл физ. р-ра	16,4± 0,9		18,2± 1,3		19,6± 1,3	
Опытная - 1,0мл препарата	16,3± 1,1	$p>0,1$	17,4± 1,2	$p>0,1$	18,4± 1,4	$p>0,1$
Контрольная – 1,0мл физ. р-ра	16,0± 0,6		17,0± 1,0		18,0± 1,2	

#### *Лабораторные исследования.*

В связи с тем, что летальности во всех группах не наблюдалось, клинические анализы крови, патоморфологические и гистологические исследования выполнялись в группах животных, получавших максимальное количество препарата или физиологического раствора. Для крыс это количество составило 5,0 мл внутримышечно, для мышей – 1,0 мл внутрибрюшинно.

Клинический анализ крови выполнялся на вторые, седьмые и четырнадцатые сутки опыта. Результаты анализов крови лабораторных крыс показаны в таблице 6.2.5. Нормальные показатели отражены в таблице 6.2.6.



Таблица 6.2.5 - Клинический анализ крови крыс при исследовании острой токсичности

Показатели	2-е сутки		7-е сутки		14-е сутки	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Эритроциты, *10 <sup>12</sup> /л	8,4±0,8	8,3±0,72	8,4±0,85	8,2±0,77	8,4±0,73	8,6±0,82
Лейкоциты, *10 <sup>9</sup> /л	13,5±0,92	12,0±1,62	10,5±2,27	10,6±1,74	11,2±2,07	11,6±1,87
Гемоглобин, г/л	140,4±16,24	139,8±17,21	150,3±17,81	158,5±8,97	147,6±15,45	146,5±12,73
Гематокрит, %	45,7±2,54	44,7±3,23	44,2±2,26	45,7±4,25	46,1±2,61	45,9±3,44
Нейтрофилы %	27,8±5,54	22,8±5,05	21,3±5,27	21,8±4,85	23,2±5,72	22,0±4,89
Лимфоциты, %	69,5±6,46	74,7±4,01	76,2±5,02	76,2±5,12	74,3±6,19	76,0±6,24
Моноциты, %	2,1±1,38	1,5±1,38	2,2±1,4	1,3±1,5	2,2±1,47	1,7±1,37
Эозинофилы, %	0,6±0,67	1,0±1,1	0,4±0,5	0,7±0,52	0,4±0,5	0,3±0,5
Глюкоза, ммоль/л	4,6±1,21	4,3±1,15	4,6±1	3,7±0,84	4,9±1,1	4,5±0,53

Таблица 6.2.6 - Нормальные показатели крови крыс (Линева А., 2008).

Показатели	Значение
Эритроциты, *10 <sup>12</sup> /л	7,2-9,6
Лейкоциты, *10 <sup>9</sup> /л	8-14
Гемоглобин, г/л	120-170
Гематокрит, %	40-50
Нейтрофилы %	13-30
Лимфоциты, %	65-77
Моноциты, %	0-4
Эозинофилы, %	0-1
Глюкоза, ммоль/л	2,75-6,3

При анализе результатов обращает на себя внимание статистически достоверное различие в количестве лейкоцитов на вторые сутки в опытной группе

( $13,5 \pm 0,92 * 10^9/\text{л}$ ) и в группе контроля ( $12,0 \pm 1,62 * 10^9/\text{л}$ ),  $p < 0,001$ . В последующем эти показатели выравниваются (рисунок 6.2.1). Также обращает на себя внимание повышение количества нейтрофилов на вторые сутки в опытной группе ( $27,8 \pm 5,54\%$ ) по сравнению с контрольной группой ( $22,8 \pm 5,05\%$ ),  $p < 0,001$ . При дальнейших наблюдениях статистически существенных различий в этих показателях не наблюдается ( $p > 0,1$ ) (рисунок 6.2.2). По-видимому, повышение числа лейкоцитов происходит за счет нейтрофилёза, и является проявлением реакции на введение метаболита бактерий, не выходящей за пределы физиологической нормы.

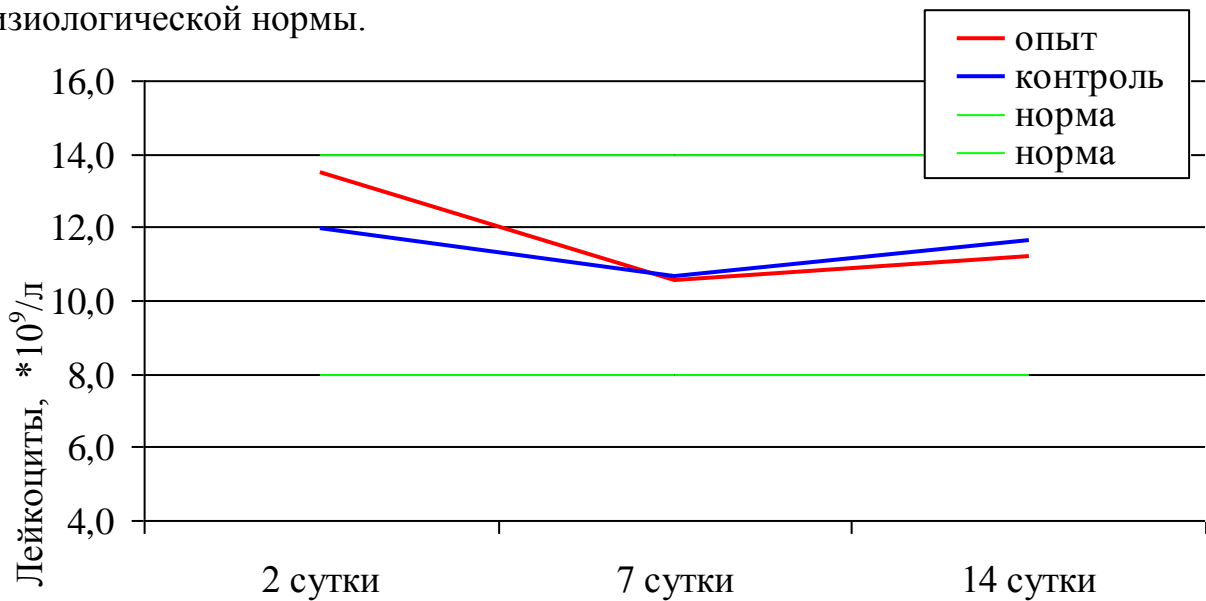


Рисунок 6.2.1 - Количество лейкоцитов у крыс опытной и контрольной групп при исследовании острой токсичности

При анализе остальных показателей не выявлено статистически достоверных различий, значения не выходят за пределы физиологической нормы.

Результаты анализов крови лабораторных мышей показаны в таблице 6.2.7. Нормальные показатели отражены в таблице 6.2.8. В обеих группах на вторые сутки отмечается незначительный лейкоцитоз -  $12,1 \pm 1,07 * 10^9/\text{л}$  в опытной группе и  $12,5 \pm 0,95 * 10^9/\text{л}$  в контрольной группе. Достоверной разницы между количеством лейкоцитов в обеих группах на вторые сутки нет ( $p > 0,1$ ). В дальнейшем численность лейкоцитов падает (рисунок 6.2.3). Количество лейкоцитов на седьмые сутки в опытной группе -  $9,1 \pm 1,68 * 10^9/\text{л}$ , в контрольной

группе  $9,6 \pm 1,28 \cdot 10^9/\text{л}$  ( $p > 0,5$ ). На 14-е сутки число лейкоцитов в контрольной группе ( $6,4 \pm 1,09 \cdot 10^9/\text{л}$ ) ниже, чем в опытной ( $8,2 \pm 2,35 \cdot 10^9/\text{л}$ )  $p = 0,01$ , однако укладывается в физиологическую норму.

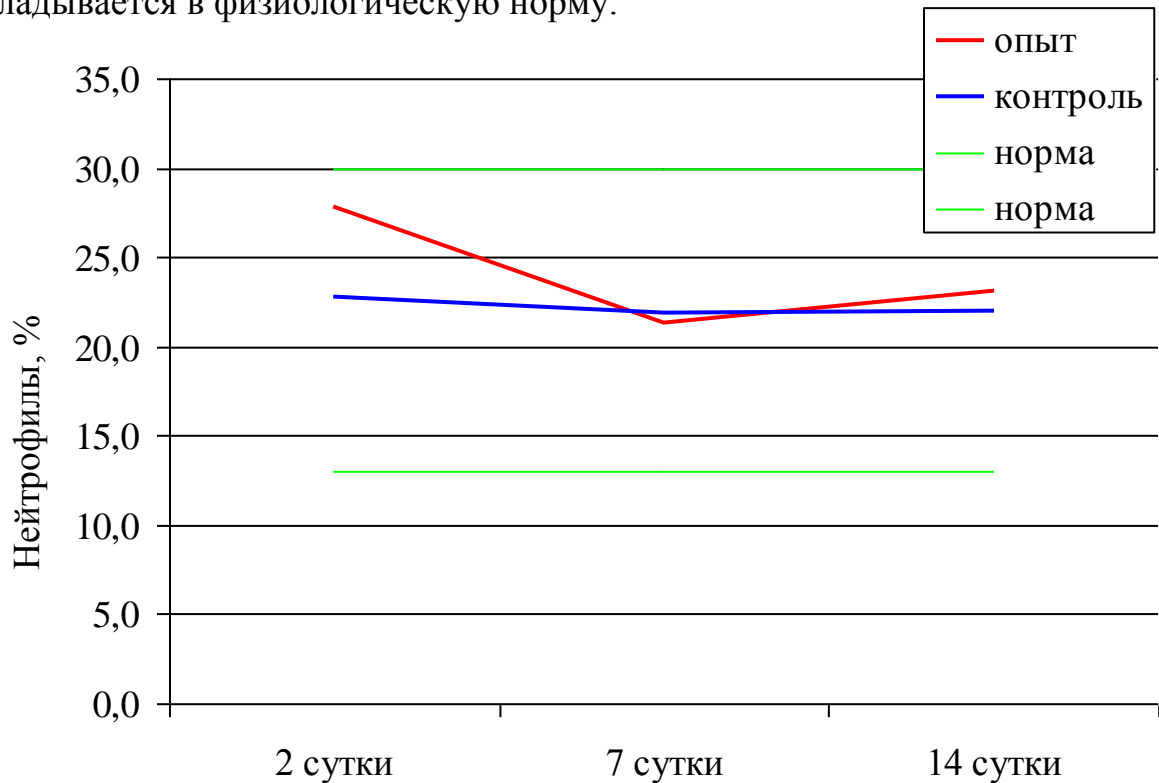


Рисунок 6.2.2 - Относительное количество нейтрофилов у крыс опытной и контрольной групп при исследовании острой токсичности

Также обращает на себя внимание небольшой нейтрофилез в обеих группах на вторые сутки:  $39,7 \pm 1,0\%$  в опытной и  $39,3 \pm 1,37\%$  в контрольной группе. Различий между группами нет ( $p > 0,5$ ). В последующем нейтрофилёза не наблюдается (рисунок 6.2.4). Число нейтрофилов на седьмые сутки в опытной группе -  $23,9 \pm 8,61\%$ , в контрольной группе -  $21,4 \pm 9,82\%$  ( $p > 0,5$ ). На 14-е сутки:  $23,2 \pm 9,05\%$  в опытной и  $20,2 \pm 7,77\%$  в контрольной группе ( $p = 0,5$ ). Можно сделать вывод, что повышение количества нейтрофилов на вторые сутки после инъекции в равной степени у обеих групп является проявлением реакции на инвазивную процедуру (внутрибрюшинную инъекцию).

Таблица 6.2.7 - Клинический анализ крови мышей при исследовании острой токсичности

Показатели	2-е сутки		7-е сутки		14-е сутки	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Эритроциты, *10 <sup>12</sup> /л	9,3± 0,82	8,9± 0,54	9,3± 0,68	9,5± 0,53	9,4± 0,52	9,3± 0,78
Лейкоциты, *10 <sup>9</sup> /л	12,1± 1,07	12,5± 0,95	9,1± 1,68	9,6± 1,28	8,2± 2,35	6,4± 1,09
Гемоглобин, г/л	150,7± 13,85	135,9± 15,58	144,4± 14,69	151,8± 14,5	145,9± 15,67	146,6± 16,5
Гематокрит, %	43,9± 1,0	43,4± 0,93	44,1± 1,3	43,7± 0,88	44,3± 1,27	44,0± 1,18
Нейтрофилы %	39,7± 1,0	39,3± 1,37	23,9± 8,61	21,4± 9,82	23,2± 9,05	20,2± 7,77
Лимфоциты, %	55,9± 3,32	56,5± 2,51	72,1± 8,97	74,4± 10,5	72,5± 9,11	74,6± 6,92
Моноциты, %	1,9± 1,0	2,2± 1,4	2,1± 1,08	2,3± 1,4	2,0± 1,04	2,3± 0,82
Эозинофилы, %	2,5± 1,31	2,0± 1,3	1,9± 1,24	1,8± 1,33	2,3± 1,07	2,8± 1,17
Глюкоза, ммоль/л	6,64± 0,39	6,54± 0,3	6,76± 0,29	6,53± 0,51	6,50± 0,35	6,54± 0,44

Таблица 6.2.8 - Нормальные показатели крови мышей

Показатели	Значение
Эритроциты, *10 <sup>12</sup> /л	8,0-10,5
Лейкоциты, *10 <sup>9</sup> /л	5,1-11,8
Гемоглобин, г/л	120-170
Гематокрит, %	42-46
Нейтрофилы %	7-38
Лимфоциты, %	63-75
Моноциты, %	1-3
Эозинофилы, %	1-4
Глюкоза, ммоль/л	5,94-7,26

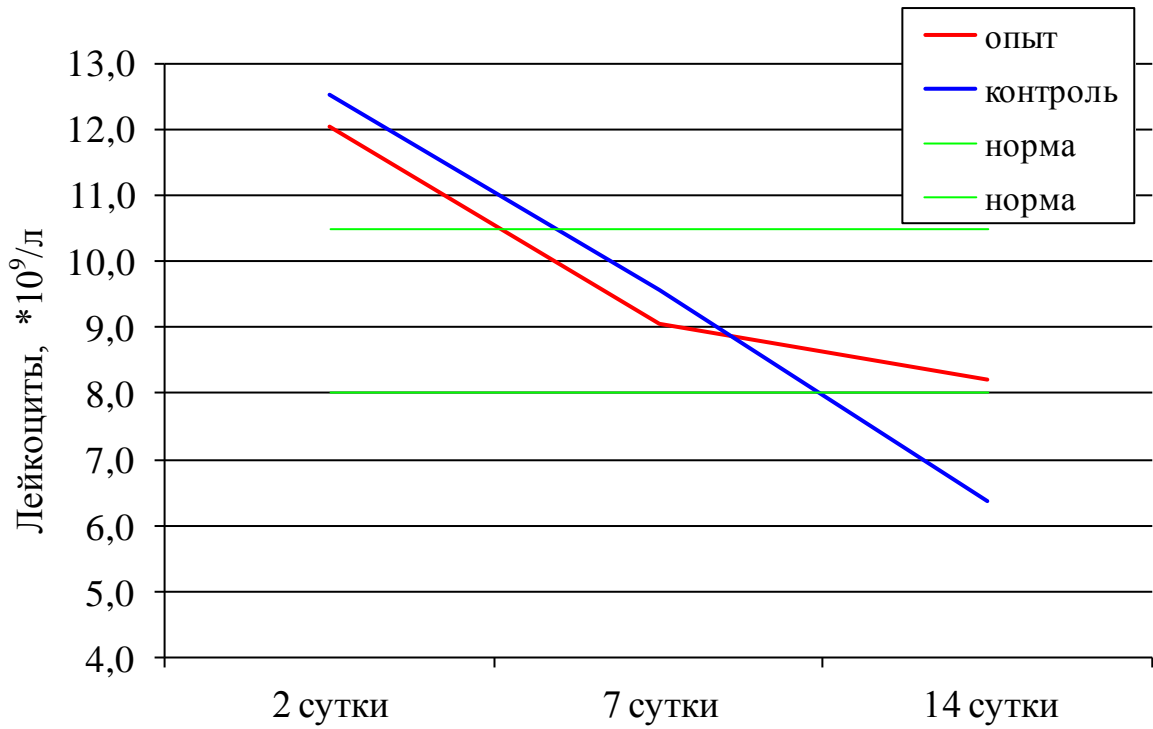


Рисунок 6.2.3 - Количество лейкоцитов у мышей опытной и контрольной групп при исследовании острой токсичности

При анализе остальных показателей не выявлено статистически достоверных различий, значения не выходят за пределы физиологической нормы..

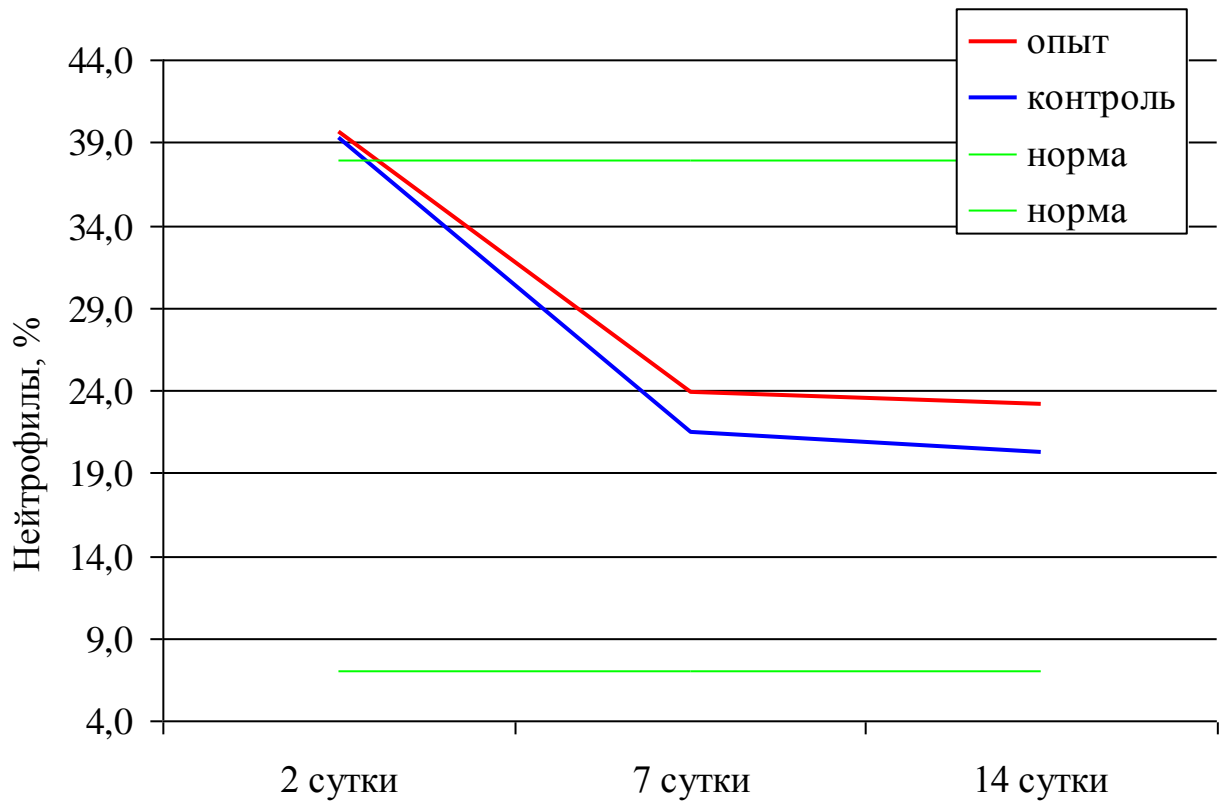


Рисунок 6.2.4 - Относительное количество нейтрофилов у мышей опытной и контрольной групп при исследовании острой токсичности

*Результаты патоморфологического исследования крыс.*

При внешнем визуальном осмотре тел животных различий между опытной и контрольной группами не выявлено. Шерсть гладкая, блестящая; кожа эластичная, подвижная; подкожная клетчатка умеренно выражена; видимые слизистые оболочки бледные, чистые, без изъязвлений и посторонних наложений; патологические выделения из естественных отверстий тела отсутствовали.

При макроскопическом исследовании внутренних органов различий между группой животных, получавших тестируемый препарат, и контрольной группой не обнаружено. Раздражающего воздействия тестируемого вещества в месте введения (передняя группа мышц бедра) не выявлено.

*Результаты патоморфологического исследования мышей.*

При внешнем визуальном осмотре тел животных различий между опытной и контрольной группами также не выявлено. Кожа эластичная, подвижная; шерсть гладкая, блестящая; видимые слизистые оболочки бледные, чистые, без изъязвлений и посторонних наложений; подкожная клетчатка умеренно выражена; патологические выделения из естественных отверстий тела отсутствовали.

При макроскопическом исследовании внутренних органов различий между опытной и контрольной группами не обнаружено. Раздражающего воздействия тестируемого вещества в месте введения (брюшинная полость) не выявлено.



*Результаты гистологического исследования внутренних органов крыс.*

Печень.

При изучении препаратов печени животных опытной группы выявлено следующее. Гепатоциты обычных размеров (рисунок 6.2.5), небольшая часть находится в состоянии гидропической дистрофии, иногда переходящей в фокальные колликвационные некрозы - разрозненные очаги баллонной дистрофии отдельных гепатоцитов (рисунок 6.2.6). Просветы синусоидных капилляров долек расширены, полнокровны (рисунок 6.2.7). Количество двух- и многоядерных гепатоцитов у животных опытной группы (рисунок 6.2.8, рисунок 6.2.9) сравнимо с контрольной группой (рисунок 6.2.10, рисунок 6.2.11), что говорит об отсутствии повышенной регенераторной активности. Картина изменений печени опытных животных в условиях эксперимента свидетельствует о слабо выраженной воспалительной реакции.

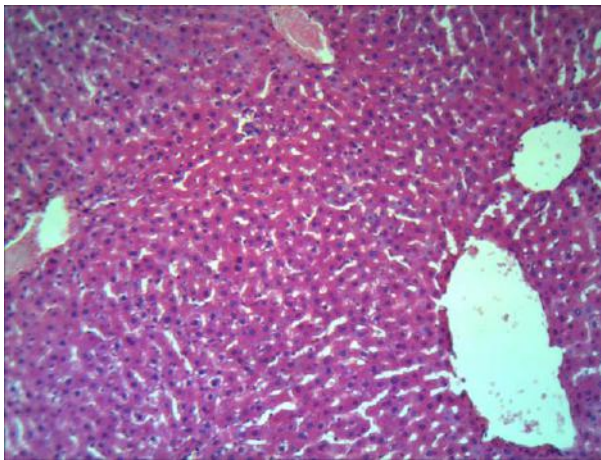


Рисунок 6.2.5 - Печень крысы опытной группы.

Гематоксилин-эозин. Ув.150

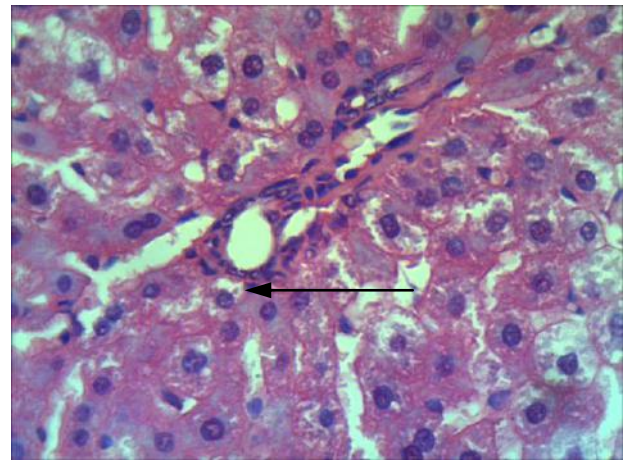


Рисунок 6.2.6 - Печень крысы опытной группы. Видны

разрозненные очаги баллонной дистрофии отдельных гепатоцитов. Гематоксилин-эозин.

Ув.600

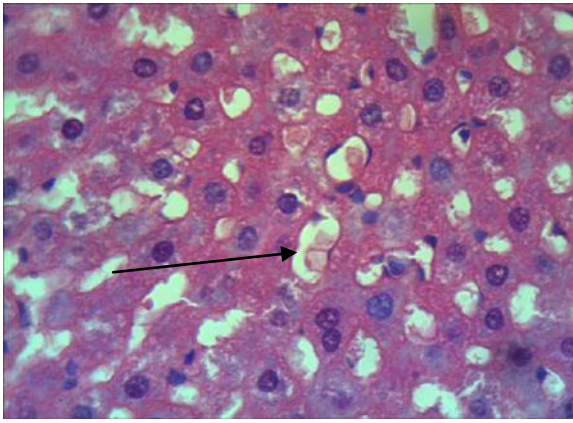


Рисунок 6.2.7 - Печень крысы опытной группы. Расширены просветы синусоидных капилляров. Гематоксилин-эозин. Ув.600

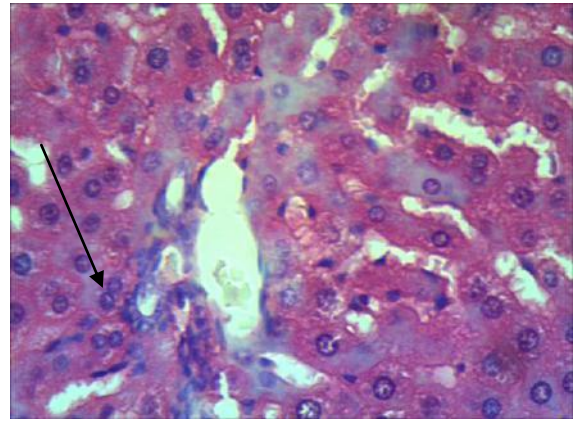


Рисунок 6.2.8 - Печень крысы опытной группы. Двухядерные гепатоциты. Гематоксилин-эозин. Ув.600

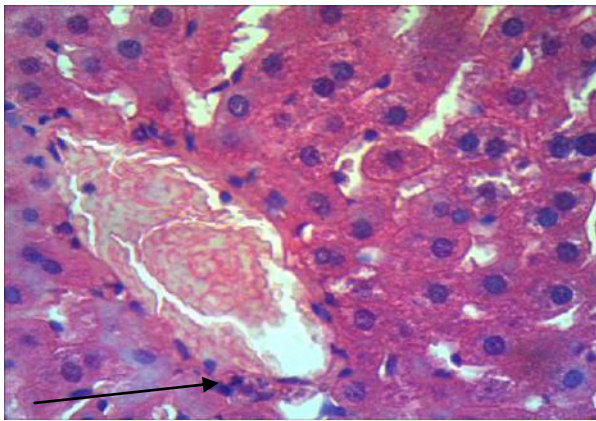


Рисунок 6.2.9 - Печень крысы опытной группы. Многоядерные гепатоциты. Гематоксилин-эозин. Ув.600

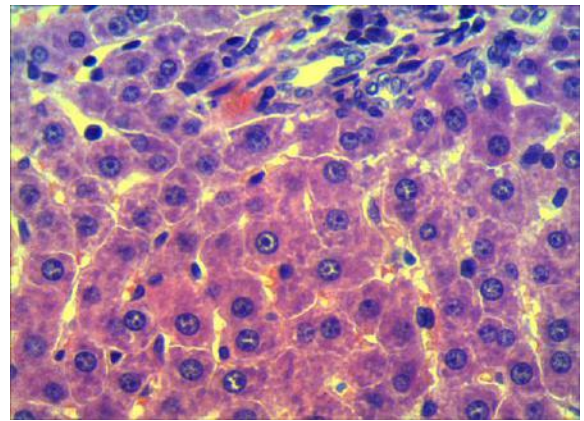


Рисунок 6.2.10 - Печень крысы контрольной группы. Двухядерные гепатоциты. Гематоксилин-эозин. Ув.600

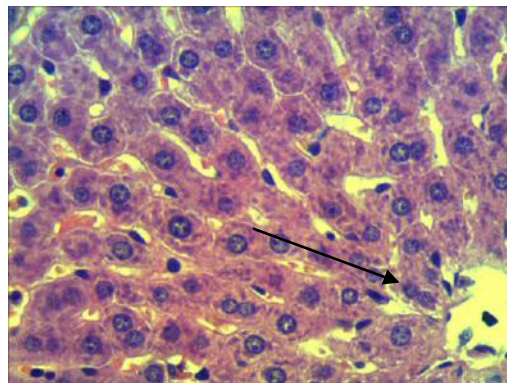


Рисунок 6.2.11 - Печень крысы контрольной группы. Многоядерные гепатоциты. Гематоксилин-эозин. Ув.600



Селезенка.

Соотношение белой и красной пульпы (рисунок 6.2.12) сопоставимо с контрольной группой. В лимфатических фолликулах отсутствуют многоядерные гистиоциты (рисунок 6.2.13). Таким образом, изменений в селезенке крыс, свидетельствующих о токсическом поражении, нет.

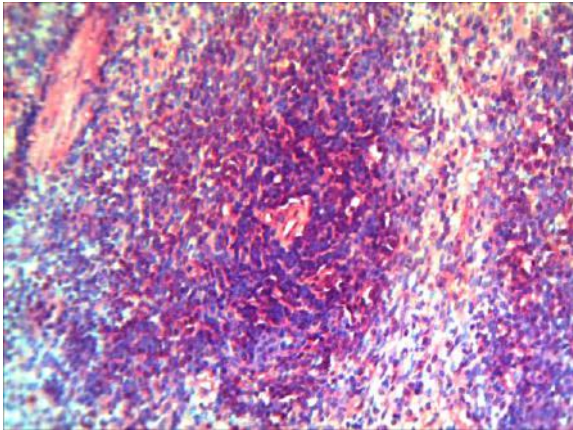


Рисунок 6.2.12 - Селезенка  
крысы опытной группы.

Гематоксилин – эозин. Ув.300

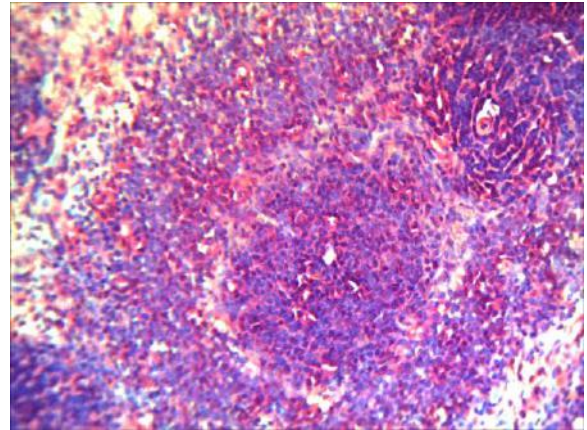


Рисунок 6.2.13 - Селезенка  
крысы контрольной группы.

Гематоксилин – эозин. Ув.300

При гистологическом изучении тканей сердца, почек и легких крыс при изучении острой токсичности не наблюдалось отклонений от обычного строения. Также не выявлено различий при исследовании тканей головного мозга крыс опытной и контрольной групп.

*Результаты гистологического исследования внутренних органов мышей.*

У опытной группы животных в селезенке наблюдается умеренно выраженная гиперплазия белой пульпы (рисунок 6.2.14) и увеличение числа мегакариобластов и мегакариоцитов (рисунок 6.2.15) по сравнению с группой контроля (рисунок 6.2.16, рисунок 6.2.17).

В условиях опыта у мышей в печени наблюдаются центрлобулярные участки гидропической дистрофии гипертрофированных гепатоцитов (рисунок 6.2.18), в периферических отделах долек гепатоциты пролиферируют (рисунок 6.2.19). У животных контрольной группы гистологическое строение печени соответствует норме (рисунок 6.2.20).

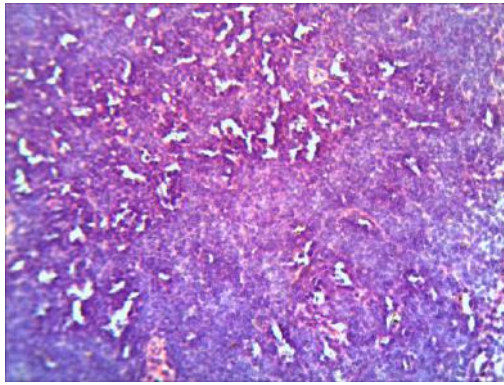


Рисунок 6.2.14 - Селезёнка  
мышы опытной группы.

Умеренно выраженная  
гиперплазия белой пульпы.

Гематоксилин – эозин. Ув.300

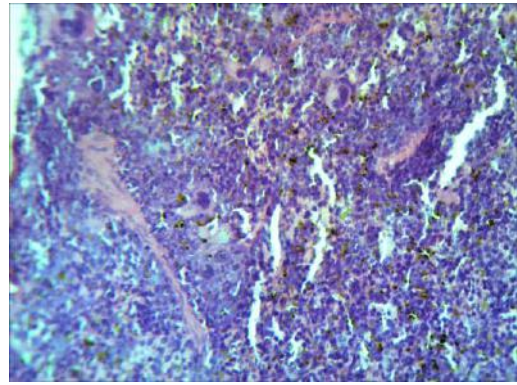


Рисунок 6.2.15 - Селезёнка  
мышы опытной группы.

Увеличение числа  
мегакариобластов и  
мегакариоцитов.

Гематоксилин – эозин. Ув.300

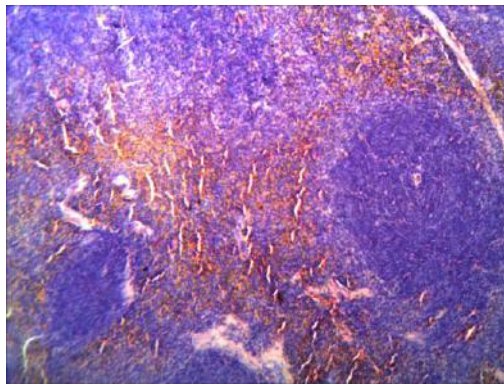


Рисунок 6.2.16 Селезёнка  
мышы контрольной группы.

Гематоксилин – эозин. Ув.150

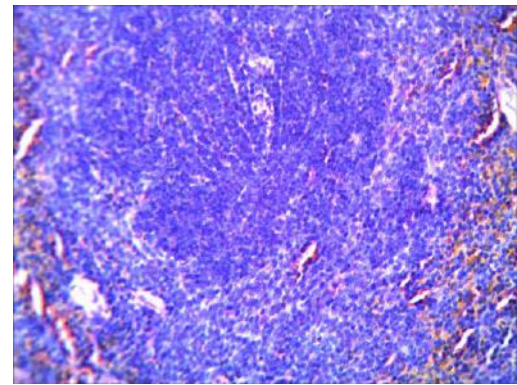


Рисунок 6.2.17 Селезёнка  
мышы контрольной группы.

Гематоксилин – эозин. Ув.150

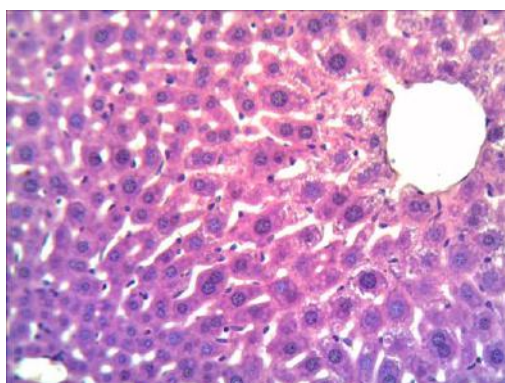


Рисунок 6.2.18 - Печень мышы  
опытной группы. Участки  
гидропической дистрофии  
гипертрофированных гепатоцитов.  
Гематоксилин – эозин. Ув.300

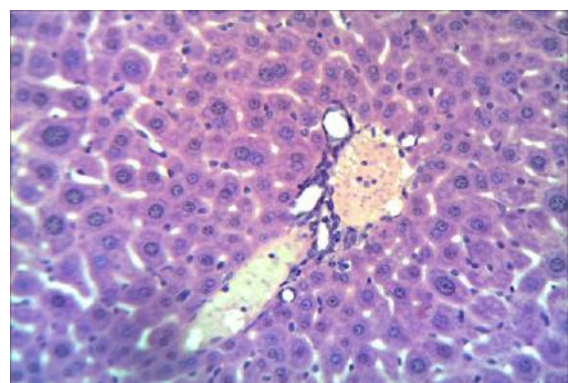


Рисунок 6.2.19 - Печень мышы  
опытной группы. Пролиферация  
гепатоцитов. Гематоксилин –  
эозин. Ув.300



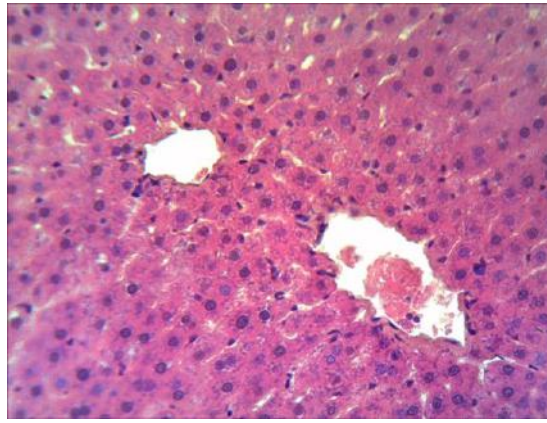


Рисунок 6.2.20 Печень мыши контрольной группы.

Гематоксилин – эозин. Ув.300

Патологические изменения в других органах мышей опытной группы и группы контроля отсутствовали. При гистологическом изучении тканей головного мозга мышей при изучении острой токсичности не наблюдалось отклонений от обычного строения как в опытной, так и в контрольной группах.

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 позволяют сделать вывод о слабо выраженной токсичности лекарственного препарата в условиях проведения данного опыта.

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 токсического эффекта.

### 6.3. Оценка анафилактического действия

Для изучения анафилактического 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.

Таблица 6.3.1 - Распределение животных и оценка выраженности анафилактического шока у морских свинок

Группа	№ животных	Характеристика поведения	Оценка шока
Опытная №1	1.	Изменений в общем состоянии и поведении не было.	0
	2.		0
	3.		0
	4.		0
	5.		0
Опытная №2	1.	Нет изменений.	0
	2.	Нет изменений.	0
	3.	Нет изменений.	0
	4.	Нет изменений.	0
	5.	Нет изменений.	0
Контрольная	1.	Изменений в общем состоянии и поведении не было.	0
	2.		0
	3.		0
	4.		0
	5.		0



Таким образом, анафилактогенной активности у метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, не выявлено.

#### **6.4. Оценка аллергизирующего действия**

Для изучения аллергизирующего действия метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, мы использовали метод накожных 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 накожных 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 метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, не выявлено.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема лечения открытых переломов в настоящее время является актуальной для медицинских организаций, оказывающих помощь по профилю «травматология и ортопедия». При подобной травме особенно высока частота дефектов кожи, мягких тканей и костей, которые являются факторами риска для развития инфекционных осложнений, хронического остеомиелита. Открытые переломы часто приводят к нарушениям консолидации. Всё это оборачивается тяжёлыми последствиями для пациента и часто заканчивается инвалидизацией (Мироманов А. М. и др., 2009; Мартель И.И., 2011).

Одной из причин неблагоприятных исходов открытых переломов является нарушение механизмов репаративного гистогенеза. Спектр причин этого достаточно широк. Так, при высокоэнергетичной травме (дорожные происшествия, падения с высоты) преобладают оскольчатые диафизарные и метафизарные переломы. Данный механизм травмы приводит к большей выраженности локального повреждения и последующим трофическим расстройствам в области открытого перелома, нарушениям механизмов репаративного гистогенеза (Климовицкий В.Г. и др., 2013). Высока частота нарушений консолидации переломов при множественной и сочетанной травме (Кавалерский Г.М. и др., 2014; Ключевский В.В. и др., 2015). 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.

Проблема поиска путей оптимизации механизмов репарации тканей после травмы является крайне актуальной в настоящее время. Доказательством этого является большое количество исследований, посвящённых влиянию на разные звенья репаративной регенерации. Например, применение физических факторов - электромагнитного излучения крайне высоких частот (Ирьянов Ю.М. и др., 2012),

низкоинтенсивного импульсного ультразвука (Малышкина С.В. и др., 2013); использование костнопластических материалов на основе трикальцийфосфата (Дмитриева Э.А., 2014); применение препаратов костного мозга (Torres J. et al., 2015) , обогащенной аутоплазмы (Ачкасов Е.Е. и др., 2014). Эти перспективные методы либо находятся в стадии изучения, либо их применение в клинической практике ограничено из-за технической сложности.

Выполненное исследование было посвящено улучшению результатов лечения открытых переломов. Для достижения цели мы выполнили научное изучение и разработку нового метода локального стимулирующего воздействия на репаративный гистогенез костной ткани и кожи при лечении открытых переломов костей конечностей.

Для осуществления поставленной цели были выполнены комплексные медико-статистические и экспериментальные исследования. Первоначально мы основные проблемы, которые возникали при лечении пациентов с открытыми переломами костей конечностей в условиях ГБУЗ ГКБ №4 г.Оренбурга с 2003 по 2013 г.г.

Критерии включения в исследование:

- Госпитализация в ГБУЗ ГКБ №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.

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. 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.

Большинство пациентов 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).

215 пострадавших (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.

Всем 291 пациентам выполнялась первичная хирургическая обработка (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.

Остеосинтез аппаратами внешней фиксации был выполнен у 95 (37%) пациентов, экстрamedулярный остеосинтез – у 106 (41,2%) пострадавших, интрамедуллярная фиксация - у 48 (18,7%) больных и 8 (3,1%) пациентам выполнялся этапный остеосинтез – установка АВФ при поступлении с последующей заменой на внутренний фиксатор.

При переломах I и II типа большая часть пациентов была прооперирована с использованием внутренней фиксации – 69,8% и 64,9% от всех пострадавших соответственно. 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.

Общее количество ранних осложнений после операций остеосинтеза открытых переломов составило 66 случаев (22,7%). Основными видами были – частичный некроз мягкотканого лоскута (5,2%) и нагноение раны (13,4%). Отмечается устойчивая тенденция к увеличению частоты осложнений с утяжелением открытого перелома. При переломах I и II типа (по R. Gustilo и J. Anderson) частота осложнений составила 19,8% и 16,5% соответственно. При переломах IIIА и IIIВ типа осложнения развились уже у 24,7% и 54,5% пациентов соответственно. Общее число ранних осложнений после переломов IIIС типа – 5 из 7 (71,4%). Выявленная зависимость частоты ранних осложнений от тяжести открытого перелома описана и в работе А.Н.Блаженко и соавт. (2010) – 9% при переломах II типа и более 30% - после переломов III типа.

Основное количество операций остеосинтеза выполнено либо в первые 6 часов после поступления (39,7%), либо через несколько суток после купирования воспалительных явлений (56,4%), при условии неосложнённого заживления раны. Доля осложнений после операций, выполненных при поступлении (22,1%) несколько ниже, чем после отсроченных вмешательств (26,5%).

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 экстремедуллярного остеосинтеза и 79,2% интрамедуллярной фиксации.

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. В современной литературе представлен анализ отдаленных исходов открытых переломов по различным сегментам в отдельности, либо при политравме. Данных по общему

количеству отдалённых результатов лечения открытых переломов различных локализаций мы не обнаружили.

Наибольшее число неблагоприятных исходов, в том числе и нарушений консолидации, возникало после тяжелых открытых переломов III типа по классификации R.Gustilo и J.Anderson. 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 IIIA и IIIB типа отдаленные удовлетворительные результаты отмечены лишь у 49 (67,1%) и 15 (68,2%) пострадавших соответственно. При открытых переломах IIIC у 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 осложнения – некроз мягкотканых лоскутов и нагноение раны, а в отдалённые сроки – нарушения консолидации переломов. Степень тяжести перелома прямо влияет на развитие инфекционных осложнений и на отдалённые 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 результате анализа мировой научной литературы и предварительных исследований, мы пришли к выводу, что одним из наиболее перспективных методов воздействия на репаративный гистогенез является использование фактора роста фибробластов.

В результате многолетних исследований в Оренбургской государственной медицинской академии был обнаружен природный штамм бактерий *Bacillus subtilis* 804, продуцирующий бактериальный фактор роста фибробластов. 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. Факторы роста фибробластов получают путём встраивания гена, кодирующего их синтез, в генотип бактерий. Например, это могут быть *Escherichia coli* (Славченко И.Ю. и др., 2003; Гаспарян М.Э. и др., 2009). Был создан оригинальный отечественный препарат, содержащий метаболиты штамма *Bacillus subtilis* 804. Нашу уверенность в необходимости выполнения данной научной работы укрепил тот факт, что технология получения препарата проста, легко воспроизводима, не требует больших материальных вложений.

Для проведения исследования 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 –  $7,1 \pm 0,2$ .

С целью разработки и определения перспектив внедрения в клиническую практику препарата для воздействия на репаративный гистогенез необходимо выполнить ряд этапов. Большую часть из них мы реализовали в данной научной работе.

Для изучения возможности стимулирующего воздействия на остеогенез мы выполнили эксперименты на 112 белых крысах-самцах линии «Wistar» массой 185 – 215 г. Была выполнена остеотомия средней трети бедра с последующим интрамедуллярным остеосинтезом спицей. 56 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. 56 крыс контрольной группы получали раствор натрия хлорида 0,9% в том же количестве.

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. На 7, 14, 21, 28, 44 и 61 сутки по 8 крыс каждой группы были подвергнуты эвтаназии для получения гистологического материала.

При сравнении средней толщины периостальной костной мозоли у животных контрольной и опытной групп наглядны различия в динамике репаративного остеогенеза. В течение первой недели в опытной группе периостальная мозоль формировалась намного быстрее, чем в контрольной. На 3 сутки средняя толщина периостальной мозоли в контрольной группе  $0,26 \pm 0,015$  мм, в опытной -  $0,79 \pm 0,020$ . На 7 сутки в группе контроля толщина составляла  $1,25 \pm 0,07$  мм, а в опытной группе -  $1,64 \pm 0,09$  ( $p \leq 0,05$ ). В дальнейшем, на сроке 7-28 дней, толщина периостальной костной мозоли в опытной группе остается в пределах от  $1,82 \pm 0,05$  до  $1,65 \pm 0,08$  мм, а в контрольной группе возрастает, от  $2,15 \pm 0,09$  до  $2,11 \pm 0,09$  мм. 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.

На 3 сутки на рентгенограммах признаков миграции металлоконструкций нет. У животных *контрольной группы* 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.). У животных *опытной группы* 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 с началом дифференцировки в хондробласты и клетки остеогенного типа.

У животных опытной группы уже на 3 сутки наблюдается значительная активация неоангиогенеза (АЧП эндотелиоцитов  $25,0 \pm 3,0$ /п.з., в контрольной группе данный показатель равен  $7,0 \pm 2,0$ /п.з.).

*Контрольная группа, 7 сутки.* На рентгенограммах признаков костной мозоли пока не определяется, остеосинтез стабилен. 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  $4,83 \pm 1,02\%$ , также отмечаются группы остеогенных клеток (АЧП остеобластов  $33,0 \pm 5,0$ /п.з.). *Опытная группа, 7 сутки.* На рентгенограммах признаков костной мозоли пока не определяется, как и в контрольной группе, остеосинтез стабилен. 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 и пролиферирующих остеогенных клеток. ООП коллагена I типа составляет  $7,23 \pm 1,02\%$ , АЧП остеобластов составляет  $173,0 \pm 17,0$ /п.з.

*Контрольная группа, 14 сутки.* На 14 сутки различия между двумя группами становятся ещё более заметными. На рентгенограммах крыс контрольной группы по-прежнему признаков костной мозоли не видно. 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 остеогенных клеток, АЧП остеобластов в которых равно  $93,0 \pm 8,0$ /п.з. Остеокласты (АЧП =  $3,0 \pm 1,0$ /п.з.) активно участвуют в резорбции костных отломков. *В опытной группе на 14 сутки* при рентгенологическом исследовании области переломов животных опытной группы можно наблюдать признаки формирующейся костной мозоли. Интермедиарная костная мозоль

представлена остатками деградирующего хряща и очагами формирования ретикулофиброзной кости, состоящими преимущественно из остеобластов (АЧП =  $108,0 \pm 9,0$ /п.з.), а также значительного числа остеоцитов (АЧП =  $91,0 \pm 6,0$ /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 остеогенных клеток.

При дальнейшем наблюдении выявлено более быстрое формирование костной мозоли у животных опытной группы, в среднем на 7-10 дней.

На 21 сутки в контрольной группе при рентгенологическом контроле видны признаки формирующейся хрящевой мозоли. 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 =  $27,0 \pm 4,0$ /п.з.). У животных опытной группы на 21 сутки на рентгенограммах животных опытной группы уже видны признаки костной мозоли, мелкие отломки перелома включены в костную мозоль. Вся площадь (периферические и центральные отделы) интермедиарной костной мозоли представлена остатками деградирующего хряща и очагами формирования ретикулофиброзной кости. Последняя состоит преимущественно из остеобластов (АЧП =  $155,0 \pm 12,0$ /п.з.) и незрелого внеклеточного остеидного матрикса (ООП коллагена I типа =  $20,7 \pm 3,71\%$ ). Только на 28 сутки в контрольной группе на рентгенограммах становятся видны признаки костной мозоли.

На 44 сутки 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 =  $85,0 \pm 8,0$ /п.з.) и остеоцитов (АЧП =  $105,0 \pm 11,0$ /п.з.), замурованных в остеидный матрикс, с ООП коллагена I типа равной  $21,23 \pm 4,13\%$ . На 44 сутки в опытной группе намечается ремоделирование интермедиарной костной мозоли в

диафиз трубчатой кости. Признаки этого процесса отмечаются на контрольных рентгенограммах. Из балок пластинчатой кости, хаотично расположенных на более ранних сроках, начинают формироваться компактное и губчатое вещество (рис. 10). В составе компактного вещества присутствует небольшое количество костномозговых полостей. Экспрессия коллагена I типа (ООП  $42,43 \pm 2,21\%$ ) на этом сроке возрастает на четверть.

*На 61 сутки у животных опытной группы* на контрольных рентгенограммах заметна консолидация перелома с ремоделированием в диафиз. При гистологическом исследовании наблюдалась полная консолидация перелома с полноценной перестройкой костной мозоли в диафиз трубчатой кости с органотипичным строением периоста, компактного вещества и эндоста. В контрольной группе гистологическая картина костной мозоли сходна с таковой, наблюдавшейся в опытной группе на 44 сутки. То есть полная консолидация в опытной группе наступила примерно на 38% быстрее по сравнению с консолидацией в контрольной группе.

Относительная объёмная плотность (ООП) коллагена I типа в матриксе костной мозоли в опытной группе нарастала быстрее, чем в группе контроля. Так, на 7-е сутки после перелома ООП коллагена I типа на 49,7%, на 14-е сутки – на 68,9%, на 21-е сутки – на 84%, на 28-е сутки – на 83,9%, на 44-е сутки – на 99% больше по сравнению с контрольной группой. Также наблюдалась значительная разница в абсолютной численной плотности остеоцитов и остеобластов, особенно на ранних сроках. 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.

Таким образом, обнаружены следующие закономерности. Применение метаболитов *Bacillus subtilis* 804 при лечении открытых переломов лимитирует выраженность воспалительного процесса, сокращая 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. (Prazdnova E.V. et al., 2015), которые установили, что ферменты некоторых штаммов *Bacillus subtilis* обладают ДНК-протективными и антиоксидантными свойствами.

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, наблюдаем и раннюю 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). Ряд авторов отмечают, что усиление ангиогенеза и формирования грануляционной ткани происходит на 14 сутки после применения ФРФ (Obara K. et al., 2005; Nagato H. et al., 2006; Akasaka Y. et al., 2010)

У животных опытной группы уже на 3 сутки наблюдалась значительная активация ангиогенеза. Усиление ангиогенеза при использовании ФРФ для лечения ран получено в различных экспериментальных работах (Wilcke I. et al., 2007; Takikawa M. et al., 2015). По данным ряда авторов (Vlodavsky Cao R. et al., 2003), ФРФ являются более мощными ангиогенными факторами, нежели фактор роста эндотелия сосудов или фактор роста тромбоцитов. Как известно, ангиогенез является сильным стимулирующим фактором для образования костной мозоли. Данных в литературе по использованию препаратов, содержащих фактор роста фибробластов, или метаболитов бактерий, для лечения открытых переломов мы не обнаружили.



Ещё в 1996 г. P.J. Green и соавт. установили, что группа белков – факторов роста фибробластов оказывают влияние на различные типы клеток, оказывают регуляторное, структурное и эндокринное воздействие. Эти данные не противоречат полученным нами фактам о стимуляции репаративного остеогенеза. В 2015 г. Y. Ни и соавт. опубликовали сведения о том, что ФРФ повышает синтез остеопоэтина. Мы выявили, что 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.

*Впервые доказано стимулирующее влияние метаболитов Bacillus subtilis 804, содержащих фактор роста фибробластов, на репаративный остеогенез.*

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. Дном раны являлась фасция. После созревания грануляционной ткани на 10 сутки выполнена кожная пластика расщеплёнными свободными ауто трансплантатами. 60 крысам при проведении кожной пластики непосредственно перед укладкой трансплантата рану орошали 0,1 мл метаболитов 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. Донорские раны орошались теми же веществами, что и операционные раны.

При 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 приживление кожных аутотрансплантатов ( $p < 0,005$ ).

Донорские раны орошались теми же веществами, что и операционные раны. Заживление «донорских» ран при использовании препарата происходило достоверно быстрее, чем при использовании физиологического раствора в контрольной группе. Достоверные различия в динамике заживления «донорских» ран отмечаются с 7 суток после операции. Они составили в опытных группах №1 и №2  $0,76 \pm 0,098 \text{ см}^2$  и  $0,77 \pm 0,084 \text{ см}^2$  соответственно, в опытной группе №3 -  $1,25 \pm 0,080 \text{ см}^2$ , в группе контроля -  $1,48 \pm 0,131 \text{ см}^2$ . На 10 и 12 сутки размеры ран в опытных группах №1 и №2 также достоверно меньше, чем в остальных двух группах. Это согласуется с данными К. Dai и соавт. (2015) о том, что экзогенный ФРФ может также стимулировать заживление ран косвенно, повышая продукцию других факторов роста, таких, как эпидермальный или трансформирующий факторы роста, или усиливая действие факторов роста, поставляемых в рану тромбоцитами или макрофагами.

На 7, 10 и 20 сутки по 5 животных из каждой группы были выведены из опыта для выполнения гистологического изучения тканей области ран. В результате выявлено стимулирующее воздействие на приживление аутотрансплантатов.

*В контрольной группе на 7 сутки* после пластики в процессе приживления аутодермотрансплантата 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. 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.

*В опытной группе №3* изменения, обнаруженные при гистоморфологическом исследовании ран на 7 сутки после аутодермопластики, 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. 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 дермы. Причём различий в степени приживания трансплантата между опытными группами №1 и №2 нет.

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 сохраняется очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация 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. 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.

*На 20 сутки у животных группы контроля и опытной группы №3*, несмотря на успешное приживание 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.* Аутодермотрансплантат по строению и гистоархитектонике идентичен интактной коже данной области и плотно фиксирован к подлежащему ложу, которое представлено так же органотипичной гиподермой с пролиферирующими дериватами. Воспалительная инфильтрация отсутствует, грануляционная ткань полностью редуцирована. Встречная краевая эпителизация с трансплантата и с кожи краёв раны завершена.

При *морфологическом изучении «донорских» ран* выявлено, что применение метаболитов *Bacillus subtilis* 804 в нативном виде и разведённых в 10 раз уже через три недели после кожной пластики приводит к формированию полностью дифференцированного на все функциональные слои эпидермиса с признаками полноценной кератинизации и образованием погружённых в дерму сосочковых инвагинаций. В группе контроля в те же сроки эпидермис ещё не формирует сосочковых инвагинаций в образующейся дерме и сохраняется высокая общая клеточность соединительной ткани.

Таким образом, впервые доказано, что местное однократное орошение гранулирующей раны метаболитами *Bacillus subtilis* 804 при аутодермопластике улучшает приживление кожных лоскутов. Следует упомянуть о работах М. Miyoshi и соавт. (2005), которые создали экспериментальное раневое покрытие с использованием ФРФ. При его применении выявлено увеличение количества вновь образованных кровеносных сосудов и грануляционной ткани, а также ускорение эпителизации и закрытия раны. Нами выявлена закономерность, что метаболиты *Bacillus subtilis* 804, содержащие ФРФ, стимулируют реваскуляризацию, клеточную пролиферацию фибробластов и эпителиоцитов кожи и восстанавливают органотипическое строение кожного покрова. При этом происходит усиление синтеза зрелого коллагена I типа и снижается активность склеротических процессов, что уменьшает образование рубцов. Это подтверждает мнение ряда ученых о том, что факторы роста фибробластов являются антагонистами фиброза (Dang C.M. et al., 2003; Kong W. et al., 2008; Abe M. et al., 2012).

После того, как эффективность новых способов лечения была доказана в эксперименте, мы выполнили следующий необходимый этап разработки оригинального лекарственного препарата – определение его доклинической безопасности.

Мы провели изучение острой и хронической токсичности, анафилактической активности метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов.

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. Летальности после введения максимального количества препарата (5,0 мл препарата для внутримышечного введения крысам, 1,0 мл - для внутрибрюшинного введения мышам) не наблюдалось. Общий срок наблюдения за животными после введения препарата составил 15 дней. Клинический анализ крови выполнялся на вторые, седьмые и четырнадцатые сутки опыта. На 15-е сутки животных выводили из опыта. Выполнялись патоморфологические исследования.

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 слабо выраженной 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 максимальной дозе метаболиты не вызывают летального и выраженного токсического эффекта. Robson M.C. 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.

Для определения *хронической токсичности* метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, были поставлены эксперименты с использованием 50 крыс линии «Wistar» массой 180-200 г и 50 мышей линии BALB/C массой 18-20 г. На протяжении 140 дней 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. Через 16 недель (112 дней) половина животных из каждой серии была выведена из опыта с помощью летальной дозы фторотана. Выполнялось патоморфологическое исследование внутренних органов (печень, селезенка, желудок, почки, легкие, головной мозг, сердце). Патоморфологическое исследование включало в себя: макроскопическое исследование, взвешивание, гистологическое и иммуногистохимическое исследование внутренних органов.

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. Волосяной и кожный покров не изменялся. Потребление корма и воды обычное.

На 112 сутки опыта было выявлено некоторое снижение концентрации триглицеридов и увеличение показателей аланинаминотрансферазы и щелочной фосфатазы в сыворотке крови животных опытной группы.

На 112-е сутки среднее значение АлАТ у интактных крыс составило  $0,13 \pm 0,01$  мккат/л, у животных контрольной группы -  $0,14 \pm 0,01$  мккат/л ( $p > 0,1$ ), в то время как у крыс опытной группы -  $0,18 \pm 0,03$  мккат/л ( $p \leq 0,05$  с обеими группами). На 140-е сутки значение АлАТ у интактных крыс составило  $0,13 \pm 0,01$  мккат/л, у животных контрольной группы -  $0,13 \pm 0,01$  мккат/л ( $p > 0,1$ ), а у крыс опытной группы -  $0,16 \pm 0,02$  мккат/л ( $p \leq 0,05$ ). На 112-е сутки среднее значение ЩФ у интактных крыс составило  $1,54 \pm 0,08$  мккат/л, у животных контрольной группы -  $1,59 \pm 0,09$  мккат/л ( $p > 0,1$ ), в то время как у крыс опытной группы -  $1,89 \pm 0,11$  мккат/л ( $p \leq 0,05$  с обеими группами). На 140-е сутки концентрация щелочной фосфатазы у интактных крыс составила  $1,50 \pm 0,07$  мккат/л, у животных контрольной группы -  $1,66 \pm 0,08$  мккат/л ( $p > 0,1$ ), а у крыс опытной группы -  $1,79 \pm 0,26$  мккат/л ( $p > 0,05$ ).

На 112-е сутки среднее значение концентрации триглицеридов у интактных крыс составило  $0,70 \pm 0,05$  ммоль/л, у животных контрольной группы -  $0,73 \pm 0,06$  ммоль/л ( $p > 0,1$ ), в то время как у крыс опытной группы -  $0,51 \pm 0,07$  ммоль/л ( $p \leq 0,05$  с обеими группами). На 140-е сутки концентрация триглицеридов сыворотки крови у интактных крыс составила  $0,75 \pm 0,03$  ммоль/л, у животных контрольной группы -  $0,71 \pm 0,05$  ммоль/л ( $p > 0,1$ ), а у крыс опытной группы -  $0,62 \pm 0,14$  ммоль/л ( $p > 0,1$  по сравнению с животными контрольной группы).

На 112-е сутки среднее значение АлАТ у интактных мышей составило  $16,37 \pm 0,90$  мккат/л, у животных контрольной группы -  $15,74 \pm 0,88$  мккат/л

( $p > 0,1$ ), в то время как у мышей опытной группы -  $18,48 \pm 2,97$  мккат/л ( $p < 0,01$  с обеими группами). На 140-е сутки значение АлАТ у интактных мышей составило  $15,78 \pm 0,96$  мккат/л, у животных контрольной группы -  $16,04 \pm 0,62$  мккат/л ( $p > 0,1$ ), а у мышей опытной группы -  $15,84 \pm 0,93$  мккат/л ( $p > 0,1$ ).

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

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 двуядерных клеток до  $4,3 \pm 0,1\%$  по сравнению с контролем  $1,2 \pm 0,3\%$ . Повышение числа полиплоидных и двуядерных 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 (В.С. Полякова, 2004). 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 –  $30,2 \pm 0,4\%$ . В других органах изменений не обнаружено.

Таким образом, у крыс опытной группы наблюдался слабовыраженный продуктивный гепатит с компенсаторно-увеличенной регенераторной активностью гепатоцитов. Изменения в иммунологическом статусе организма этой группы животных подтверждались 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 препарата 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. В других органах изменений не обнаружено.

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.

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 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. Анафилактогенной активности у препарата не выявлено.

Для изучения аллергизирующего действия метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, мы использовали метод накожных аппликаций. Десяти морским свинкам-альбиносам наносили на выстриженный участок кожи туловища по 3 капли метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, 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 накожных 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. Аллергизирующего действия у метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, 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. X.Ye 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.

Р.Хи и соавт. (2016) показали, что один из факторов роста фибробластов не только не оказывает токсического эффекта на печень, но имеет антидиабетический эффект и даже может снижать фиброзные процессы в печени, то есть в перспективе может использоваться для лечения цирроза печени. J.I.Chuang и соавт. (2015) опубликовали данные об антитоксическом действии ФРФ-9 на нейроны головного мозга.

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*. В.J.Lampe и J.C.English (2016) доказали безопасность фермента «наттокиназы» для крыс при назначении этого вещества в максимальных дозах.

Многие вещества, выделяемые *Bacillus subtilis*, обладают полезными свойствами для макроорганизма. J.Jiang и соавт. (2016) показали антигрибковую активность штамма *Bacillus subtilis* против *Fusarium moniliforme*. Y.Fan и соавт. в 2015 г. опубликовали данные о защитном действии *Bacillus subtilis* против



афлотоксинов. Последние являются очень сильными гепатоканцерогенами (Wogan G.N. et al., 2004; Ricordy R. et al., 2002)

Полученные результаты исследования являются необходимым этапом разработки оригинального лекарственного препарата для воздействия на репаративный гистогенез при лечении открытых переломов. При изучении доклинической безопасности впервые установлено, что метаболиты *Bacillus subtilis* 804, содержащие фактор роста фибробластов, не обладают острой и хронической токсичностью и не оказывают анафилоктогенного и аллергизирующего действия в экспериментах на животных. Впервые выявлена эффективность препарата при лечении открытых переломов и скальпированных ран. Это позволяет нам обратиться в Министерство здравоохранения РФ для получения разрешения на проведение государственных клинических испытаний нового лекарственного препарата.

## 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 ауто трансплантатов 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 алергизирующего 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АВФ	Аппарат внешней фиксации
АЧП	Абсолютная численная плотность
кДа	КилоДальтон
ООП	Относительная объёмная плотность
п.з.	Поле зрения
ПХО	Первичная хирургическая обработка
Ув.	Увеличение
ФРФ	Фактор роста фибробластов

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агаджанян, В.В. Лечение больных с политравмами за последние 10 лет. / В.В.Агаджанян // Политравма. - 2006. - № 3. - С. 5-8.
2. Агаджанян, В.В. Остеоиндуктивные покрытия на основе фосфатов кальция и перспективы их применения при лечении политравм / В.В. Агаджанян , С.Н.Твердохлебов, Е.Н.Большасов, В.П.Игнатов, Е.В.Шестериков // Политравма. - 2011. - №3. - С.5-13
3. Алимов, Д.В. Профилактика гнойно-воспалительных осложнений в области спиц при лечении методом чрезкостного компрессионно-дистракционного остеосинтеза пробиотиком «споробактерин жидкий» / Д.В.Алимов, Т.Г.Солнышкова, А.А.Сафронов // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. - 2008. - Т.167.№ 1. - С. 48-51.
4. Алимов, Д.В. Экспериментальное и клиническое обоснование применения пробиотка «споробактерин жидкий» для профилактики хирургической инфекции при лечении методом чрезкостного остеосинтеза / Д.В.Алимов, А.А.Сафронов, М.Б.Литвак, С.А.Немоляев, Х.М.Ф.Сакалла // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2007. - Т.3,№4. - С.93-98.
5. Апагуни , А.Э. Анатомо-функциональные результаты различных методов лечения пациентов с повреждениями диафиза и дистальной трети бедренной кости / А.Э. Апагуни , А.Ю.Власов // Кубанский научный медицинский вестник. - 2009. - Т. 107, №2. - С.19-21
6. Атаев, Э.А. Коррекция репаративной регенерации при замещении дефектов длинных костей / Э.А. Атаев // Вестник Российского государственного медицинского университета. - 2012. - №3. - С.76-79
7. Ахмедов, Б.А. Способ лечения пострадавших с несросшимися переломами и ложными суставами длинных костей конечностей огнестрельного генеза / Б.А. Ахмедов // Травматология и ортопедия России. - 2010.- Т.55 №1. - С. 94-98.

8. Ачкасов, Е.Е. Применение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в клинической практике / Е.Е.Ачкасов, Э.Н.Безуглов, А.А.Ульянов, В.В.Куршев, А.Д.Репетюк, О.Н.Егорова // Биомедицина. - 2013. -Т.1, №4. - С.46-59
9. Ачкасов, Е.Е. Использование обогащенной тромбоцитарными факторами роста аутоплазмы в хирургии и травматологии / Е.Е. Ачкасов , А.А.Ульянов, Э.Н.Безуглов // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. - 2014. - №9. - С.48-54
- 10.Баранов, О.П. Распространенность травматизма среди населения агропромышленного региона / О.П.Баранов // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. - 2012. - № 6. - С.13-16.
- 11.Бейдик, О.В. Метод стержневого чрескостного остеосинтеза в лечении диафизарных переломов костей голени / О.В. Бейдик, К.К.Левченко, Ю.В.Трошкин // Гений ортопедии. - 2009. - № 4. - С. 114-120
- 12.Бельских, А.Н. Указания по военно-полевой хирургии. 8-е издание / А.Н. Бельских, И.М.Самохвалов. - М.: Главное военно-медицинское управление МО РФ, 2013. — 474 с.
- 13.Блаженко, А.Н. Тактика лечения пострадавших с открытыми и закрытыми множественными переломами длинных костей нижних конечностей / А.Н.Блаженко, В.Э.Дубров, А.А.Афаунов, М.Ю.Ханин, А.А.Блаженко, Г.П.Кобрицов, Р.М.Натхо // Кубанский научный медицинский вестник. - 2010. -№7(121). –С.21-27.
- 14.Бухарин, О.В. Механизмы транслокации бактерий при генерализованном хроническом пародонтите / О.В. Бухарин, Б.Я.Усвяцов, Н.Б.Дорошина, Д.Р.Кушкинбаева, Ю.А.Хлопко // Стоматология. - 2011. - Т. 90. № 4. - С. 16-18.
- 15.Виноградов, В.Г. Влияние стабильности аппарата внешней фиксации на исходы лечения открытых диафизарных переломов костей голени / В.Г. Виноградов, Н.Е.Агафонов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.- 2011.- Т.80. №4, Часть 1. - С. 242-245



- 16.Виноградова, Т.П. Регенерация и пересадка костей / Т.П. Виноградова, Г.И. Лаврищева.- М.: Медицина, 1974. - 247 с.
- 17.Волокитина, Е.А.Опыт хирургического лечения внутрисуставных переломов костей конечностей с применением биокомпозита на основе b-трикальцийфосфата / Е.А.Волокитина, Ю.В.Антониади, М.В.Гилев, Д.Н.Черницын // Уральский медицинский журнал. – 2014. – Т.115, №1. – С. 75-79.
- 18.Гаспарян, М.Э. Гиперэкспрессия в EscherichiaColi и отчистка рекомбинантного основного фактора роста фибробластов (FGF-2). / М.Э. Гаспарян, П.А. Елистратов, Н.И. Дризе, И.Н. Нифонтова и др. // Биохимия. – 2009. – Т.74, №2. – С. 272-277
- 19.Гордиенко, Д.И. Лечение открытых переломов голени / Д.И.Гордиенко, А.В.Скороглядов, Е.А.Лйтвина, В.А.Митин // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н.Приорова - 2003. - № 3. - С. 75 - 78
- 20.Гордиенко, Д.И. Тактика хирургического лечения открытых переломов голени / Д.И. Гордиенко // Кафедра травматологии и ортопедии. - 2013. - №1. - С. 15-26
- 21.Давыдов, Е.А. Применение биологически и механически совместимых имплантатов из нитинола для хирургического лечения повреждений и заболеваний позвоночника и спинного мозга / Е.А. Давыдов , А.Ю.Мушкин, И.В.Зуев и др. // Гений ортопедии. - 2010. - №1. - С. 5–11
- 22.Дажин, А.Ю. Свободная костная пластика васкуляризированным фрагментом малоберцовой кости при лечении больных с обширными сегментарными дефектами костей предплечья / А.Ю.Дажин, Б.Ш.Минасов, М.М.Валеев, С.А.Чистиченко, Э.М.Бикташева // Гений ортопедии. - 2013. - №2. - С.58-61.
- 23.Дмитриева, Э.А. Морфология регенерата при заполнении костного дефекта материалами easygraft и трикальцийфосфатом / Э.А. Дмитриева // Клиническая и экспериментальная морфология. - 2014. - № 3 (11). - С.40-45

24. Дубровин, Г.М. Влияние перфторана на локальную микроциркуляцию и остеорепарацию при высокоэнергетических переломах а зависимости от способа его введения (экспериментальное исследование) / Г.М.Дубровин, А.В.Иванов, О.В.Яковлева, Чен Ци Хсяянг, Д.А. Иванов // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2008. - №3. - С23-26.
- 25.Ерофеев, С.А. Лечение больных хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей на основании использования армирующего локального антибактериального носителя / С.А.Ерофеев, Г.Г. Дзюба, Д.И. Одарченко // Гений ортопедии. - 2013. - № 4. - С. 25-29.
- 26.Ерофеев, С.А. Репаративная регенерация костной ткани при применении местных антибактериальных носителей в условиях гнойного остеомиелита (экспериментальное исследование) / С.А.Ерофеев, Л.Б.Резник, Г.Г.Дзюба, Д.И.Одарченко // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. - 2014. - № 3. - С. 62-67.
- 27.Игнатьев, А.Г. Пластика дефектов костей тутопластом / А.Г. Игнатьев, Л.Б. Резник, А.Н. Горячев, М.Э. Гегер, А.Е.Кривошеин // Травматология и ортопедия России. - 2006. – Т.40, № 2. - С. 131.
- 28.Илизаров, Г. А. Возможности чрескостного остеосинеза при лечении переломов костей / Г. А. Илизаров, А. А. Девятов // Лечение переломов и их последствий методом чрескостного остеосинтеза. - Курган, 1979. - С. 4-8.
- 29.Ирьянов, Ю.М. Влияние электромагнитного излучения крайне высоких частот на репаративное костеобразование при лечении перелома в условиях чрескостного остеосинтеза (экспериментально-морфологическое исследование) / Ю.М. Ирьянов, Т.Ю.Ирьянова, О.В.Дюрягина, В.Н.Ирьянова // Гений ортопедии. - 2012. - №2. - С. 63-67.
- 30.Ирьянов, Ю.М. Заживление перелома в условиях возбуждения локального очага остеогенеза в контралатеральной конечности / Ю.М. Ирьянов , Т.Ю.Ирьянова, О.В.Дюрягина // Гений ортопедии. - 2010. - №3. - С. 28-33.
- 31.Ирьянов, Ю.М. Заживление перелома в условиях интрамедуллярного введения спиц с покрытием из гидроксиапатита / Ю.М. Ирьянов,

- Н.А.Кирьянов, А.В.Попков // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2014. - № 7-8. - С. 127-132.
- 32.Ирьянов, Ю.М. Замещение дефекта кости в условиях чрескостного остеосинтеза и применения имплантата из никелида титана / Ю.М. Ирьянов, Т.Ю.Ирьянова // Морфология. - 2012. - Т.142, № 4. - С. 83-86.
- 33.Ирьянов, Ю.М. Морфологические особенности грануляционной ткани, формирующейся при чрескостном остеосинтезе и воздействии лазерного излучения / Ю.М. Ирьянов, Т.Ю.Ирьянова, О.В.Дюрягина, В.Н.Ирьянова // Гений ортопедии. - 2011. - № 1. - С. 104-108.
- 34.Кавалерский, Г.М. К вопросу о лечении открытых переломов голени. / Г.М. Кавалерский, Н.В.Петров, С.В.Бровкин, А.Е.Смирнов [и др.] // Московский хирургический журнал. – 2014. - №6. – С.33-36.
- 35.Кавалерский, Г.М. Особенности лечения тяжелой травмы мягких тканей при открытых переломах длинных трубчатых костей с использованием перфторана / Г.М. Кавалерский, Н.В.Петров, С.В.Бровкин, А.Д.Калашник // Кафедра травматологии и ортопедии. - 2012. - №4. - С.4-7.
- 36.Казанцев, А.Б. Пластика дефектов губчатой кости пористыми опорными имплантатами при переломах плато большеберцовой кости / А.Б.Казанцев, В.Г.Голубев, М.Г.Еникеев, Н.Н.Кораблева, Д.Ю.Шестаков // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. - 2005. - №1. - С.19.
- 37.Камека, А.Л. Лечение открытых переломов костей голени, осложненных хроническим остеомиелитом, с использованием новых методов / А.Л. Камека, С.Н.Леонова, А.В.Рехов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2013.- Т.90, №2, Часть 1. - С. 30-34
- 38.Каплан, А. В. Профилактика и проблема риска гнойных осложнений при открытых переломах / А. В. Каплан, В. И. Лебедев, В. Ф. Пожарийский // профилактика и лечение гнойной инфекции при механических травмах различной локализации : материалы Всесоюз. конф. - М., 1985. - С. 73-79.

- 39.Кирилова, И.А. Репаративная регенерация губчатой кости при использовании костно-пластического материала "Депротекс" / И.А. Кирилова // Политравма. - 2011. - №1. - С.22-29
- 40.Климовицкий, В.Г. Наружный чрескостный остеосинтез при внесуставных переломах костей голени: клинические аспекты выбора метода / В.Г. Климовицкий, В.Ю. Черныш, Лафи Хатем, О.В. Лавриненко // Літопис травматології та ортопедії. – 2013. - №1-2. – С.46-48.
- 41.Ключевский, В.В. Лечение открытых переломов бедренной кости / В.В. Ключевский, С.М.Сметанин, И.Н.Соловьев // Гений ортопедии. - 2012. - № 1. - С.11-14
- 42.Ключевский, В.В. Лечение открытых переломов голени / В.В.Ключевский, И.Н.Соловьёв, И.И. Литвинов, А.А.Тимушев // Врач-аспирант. - 2015. - Т.68, №1.1. - С.199-203.
- 43.Ключевский, В.В. Первичный внутренний остеосинтез открытых переломов бедренной кости / В.В. Ключевский, С.М.Сметанин, И.Н.Соловьев, С.К.Шакола // Врач-аспирант. - 2010. - Т.42, №5.1. - С. 132-138.
- 44.Копысова, В.А. Чрескостный остеосинтез в лечении пострадавших с переломами костей голени / В.А. Копысова, В.А.Каплун, А.Н.Светашов // Российский медицинский журнал. - 2011. - № 1. - С. 26-28.
- 45.Корнилов, Н.В. Влияние выбора метода оперативного лечения в травматологии и ортопедии на расходы восстановительного лечения (у больных с переломом диафиза большеберцовой кости) / Н.В.Корнилов, Н.И.Вишняков, К.Г.Редько, К.И.Шапиро // Экономика здравоохранения. - 2006. - № 9. - С. 39-42.
- 46.Котомцев, В.В. Стимуляция заживления трубчатых костей у собак коллагенсодержащим препаратом «коллапаном д» с использованием чрескостного остеосинтеза / В.В. Котомцев, Н.А.Казанцев // Аграрный вестник Урала. - 2012. - №7, Т.99. - С.28-29
- 47.Лебедев, В.Ф. Перспектива использования препаратов интерферона в стимуляции регенерации тканей при переломах длинных костей / В.Ф.

- Лебедев, Л.А.Дмитриева, И.А.Шурыгина // В книге: X Юбилейный Всероссийский съезд травматологов-ортопедов. Материалы. - М.:2014. - С.463
- 48.Лернер, А.А. Использование принципов "damage control" при лечении тяжелых повреждений конечностей / А.А. Лернер , М.В.Фоменко // Новости хирургии. - 2012. - Т. 20, №3. - С.128-132
- 49.Линева, А. Физиологические показатели нормы животных / А.Линева. – М.:Аквариум-Принт, 2008. – 256с.
- 50.Линник, С.А. Применение препарата osteoset для заполнения костных полостей / С.А.Линник, П.П.Ромашов, К.А.Новоселов, В.В.Хаймин и соавт.// Травматология и ортопедия России. - 2009. – Т.53, № 3. - С. 155-156.
- 51.Линник, С.А. Травматический и послеоперационный остеомиелит при сочетанных и множественных повреждениях нижних конечностей / С.А.Линник, Х.Н.Назаров, П.П.Ромашов, А.С.Харютин, А.А.Хромов, А.Ф.Калимуллина, Д.С.Мусоев // Известия Академии наук Республики Таджикистан. Отделение биологических и медицинских наук. - 2014. – Т.185,№1. - С. 99-104.
- 52.Лиознер, Л.Д. Состояние процессов физиологической и репаративной регенерации / Л.Д. Лиознер , В.Ф.Сидорова // Журн. общ. биол. — 1975. - Т.36, №2. - С.237-242
- 53.Лунева , С.Н. Комплекс низкомолекулярных белков костной ткани и его влияние на регенерацию кости / С.Н. Лунева, А.Н.Накоскин, И.А.Талашова, Е.В.Осипова // Вестник новых медицинских технологий. - 2013. - №1, Т.20. - С.28-31
- 54.Майбородин, И.В. Регенерация красного костного мозга в кости нижней челюсти крыс после введения в участок повреждения мезенхимальных стволовых клеток / И.В. Майбородин , В.А.Матвеева, И.С.Колесников // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2011. - №4. - С.215-221
- 55.Малышкина, С.В. Репаративная регенерация кости вокруг титановых имплантатов после действия низкоинтенсивного импульсного ультразвука /

- С.В. Малышкина, В.И.Маколинец, И.В.Вишнякова // Таврический медико-биологический вестник. - 2013. - №1-1, Т.16. - С.147-151
- 56.Мартель, И.И. Современные представления об условиях консолидации переломов и возможность их обеспечения различными типами фиксаторов / И.И. Мартель , Ф.А.Мацукатов, В.М.Шигарев, С.П.Бойчук // Гений Ортопедии. - №4. - 2012. - С. 131-136
- 57.Мартель, И.И. Транспозиция фрагментов малоберцовой кости по методу Илизарова в реабилитации пострадавших с «острыми» дефектами диафиза большеберцовой кости / И.И. Мартель, А.Ю.Чевардин // Гений ортопедии.- 2012.- №1.- С. 5-10
- 58.Мартель, И.И. Чрескостный остеосинтез по Илизарову в комплексном лечении больных с открытыми повреждениями конечностей / И.И.Мартель// Гений ортопедии. - 2011.- №2.- С.44-48
- 59.Минасов, Б.Ш. Функциональные и эстетические результаты замещения дефектов мягких тканей кровоснабжаемыми лоскутам / Б.Ш.Минасов, М.М.Валеев // Травматология и ортопедия России - 2006. -№ 1.-С. 30-35.
60. Мироманов, А.М. Прогнозирование гнойно-воспалительных осложнений при открытых переломах длинных трубчатых костей / А. М. Мироманов, А.А.Герасимов, Е.В.Намоконов, Н.А.Мироманова // Вестн. хирургии им. И. И. Грекова. - 2009. - Т. 168, № 3. - С.57-60.
- 61.Назаров, Ф.Н. Роль остеосинтеза методом илизарова при сочетанных и множественных травмах нижних конечностей / Ф.Н. Назаров, С.А. Линник// Вестник последипломного образования в сфере здравоохранения. - 2014. - № 2. - С. 41-46.
- 62.Назаров, Х.Н. Внеочаговая фиксация переломов при сочетанных и множественных травмах нижних конечностей / Х.Н.Назаров, С.А.Линник // Здравоохранение Таджикистана. - 2014. – Т.321,№ 2. - С. 44-50.
- 63.Назаров, Х.Н. Профилактика осложнений при лечении открытых переломов костей голени у пострадавших с множественными и сочетанными травмами / Х.Н.Назаров // Вестник Авиценны. -2014. - № 1 (58). - С. 57-61.

64. Никитенко, В.И. Новые данные о патогенезе, профилактике и лечении хирургической инфекции при травме / В.И. Никитенко, А.А. Сафронов // Медицинский журнал Западного Казахстана. - 2011. - Т.31, № 3. - С.19-20.
65. Никитенко, В.И. Транслокация бактерий из желудочно-кишечного тракта – естественный защитный механизм / В.И. Никитенко, В.А. Копылов, М.В. Никитенко // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. - 2004. - №2-3. - С.16-18
66. Павлович, Е.Р. Патолофизиологическое значение трансинтестинальной транслокации бактерий / Е.Р. Павлович, С.Ф. Дугин // Успехи современного естествознания. - 2006. - № 6. - С. 81-82.
67. Панков, И.О. Принципы оказания специализированной помощи пациентам с тяжелыми множественными переломами костей конечностей в условиях травмцентра 1 уровня на современном этапе. Damage control в травматологии / И.О. Панков, С.Д. Сиразитдинов, Ш.Г. Асадуллин, Д.Т. Сиразитдинов // Современные проблемы науки и образования. - 2014. - №3. - С.467.
68. Патент № 2427644 C1RU МПК C12N A61K. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* – продуцент фактора роста фибробластов. Никитенко В.И. – опубл. 27.08.11. Бюл. №24.
69. Полякова, В.С. Структурная реорганизация покровного эпителия воздухоносных и респираторных отделов легкого при воздействии сероводородсодержащей газовой смеси / В.С. Полякова // Морфология. - 2003. - Т. 124, № 5. - С.20-23.
70. Попков, А.В. Клинический опыт использования интрамедуллярных спиц с биоактивным покрытием в лечении переломов длинных трубчатых костей / А.В. Попков, Д.А. Попков // Клиническая практика. - 2012. - № 2. - С. 40-47.
71. Прогнозирование гнойно-воспалительных осложнений при открытых переломах длинных трубчатых костей / А. М. Мироманов [и др.] // Вестн. хирургии им. И. И. Грекова. - 2009. - Т. 168, № 3. - С. 57-60.



- 72.Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за столбняком. Методические указания: МУ 3.1.2436-09. 3.1: утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 20.01.2009
- 73.Редько, К.Г. Метод исследования жесткости чрескостного остеосинтеза при планировании операций / К.Г.Редько, Л.Н.Соломин, Н.В.Корнилов, Д.А.Мыкало, А.И.Петухов // Российский НИИ травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена. Санкт-Петербург. - 2009.
- 74.Резник, Л.Б. Возможность использования контактного ультразвукового воздействия в условиях чрескостного остеосинтеза (экспериментальное исследование) / Л.Б.Резник, Г.Г.Дзюба, А.А.Новиков, К.Ю.Рожков, Д.А.Лебедева, Д.В.Котов // Гений ортопедии. - 2015. - № 3. - С. 55-59.
- 75.Резник, Л.Б. Применение наноуглеродных имплантов при замещении постостеомиелитических дефектов длинных костей (экспериментальное исследование) / Л.Б.Резник, И.В. Стасенко // Гений ортопедии. - 2015. - №3. - С. 95-96.
- 76.Резник, Л.Б. Хирургическое лечение внутрисуставных переломов проксимального отдела большеберцовой кости / Л.Б. Резник, И.П.Здебский// Гений ортопедии. – 2009. - №1. – С.28-32.
- 77.Родоманова, Л.А. Пластическое замещение поверхностных остеомиелитических дефектов стопы и области голеностопного сустава лоскутами с осевым кровоснабжением / Л.А.Родоманова, А.Ю.Кочиш, И.В.Козлов, А.Г.Полькин, С.В.Валетова // Травматология и ортопедия России. – 2008. – № 2 (Приложение). – С. 130.
- 78.Родоманова, Л.А. Раннее замещение обширных дефектов тканей конечностей / Л.А.Родоманова, А.Ю.Кочиш, А.Г.Полькин // Современные технологии диагностики, лечения и реабилитации при повреждениях и заболеваниях верхней конечности : материалы 1 Международного конгресса. – М., 2007. – С. 54–55.
- 79.Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ.ред. члена-корреспондента РАМН,

- проф. Р.У.Хабриева.- 2-е изд., перераб. и доп.- М.:ОАО "Издательство "Медицина", 2005. - 832 с.
- 80.Салато, О.В. Исследование транслокации бактерий при механической непроходимости тонкой кишки / О.В.Салато // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.- 2008. - № 4. - С. 76-79.
- 81.Самусенко, Д.В. Метод Илизарова в этапном лечении пострадавших с сочетанной травмой и множественными переломами / Д.В. Самусенко, А.Г. Карасев, И.И. Мартель, В.В.Шведов, С.П.Бойчук // Политравма. - 2014. - №1. - С.44-49.
- 82.Саркисов, Д.С. Очерки по структурным основам гомеостаза / Д.С.Саркисов. - М.:Медицина, 1977. - 351с.
- 83.Свешников, А.А. Недостатки в процессе реализации открытия г.а. илизарова и алгоритм достижения оптимальной активности репаративного процесса / А.А. Свешников // Фундаментальные исследования. - 2012. - №7-2. - С. 463-469.
- 84.Свидетельство на товарный знак (знак обслуживания) № 433087 «Винфар»./ Правообладатель Никитенко В.И. Зарегистрировано 23 марта 2011 г.
- 85.Сергеев, С.В. Происхождение остеосинтеза. Наружные фиксаторы / С.В. Сергеев [и др.] // Остеосинтез. - 2009. -№ 1. - С. 9-22.
- 86.Сироджов, К.Х. Лечение сочетанных повреждений скелета на основе ортопедического "damage control" / К.Х. Сироджов, К.К.Каримов, Ш.М.Толибов// Научно-практический журнал ТИППМК. - 2013. - №2. - С.195-196.
- 87.Славченко, И.Ю. Биосинтез основного фактора роста фибробластов человека в клетках Escherichia Coli и его очистка. / И.Ю. Славченко, Е.В. Борейко, Т.Г. Гавриш и др. // Biopolymersandcell. – 2003. – Т. 19, № 2. – С. 179-184
- 88.Соколов, В.А. Практическое применение концепции «damagecontrol» при лечении переломов длинных костей конечностей у пострадавших с

- политравмой / В.А. Соколов, Е. И. Бялик, П. А. Иванов, Д. А. Гараев // Вестн. травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. - 2005. - № 1.-Р.3-7.
- 89.Соколов, В.А. Дорожно-транспортные травмы / В.А.Соколов // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. - 2011. - № 4. - С.74-79.
- 90.Соколов, В.А. Профилактика и лечение осложнений закрытого блокируемого остеосинтеза переломов длинных костей у пострадавших с политравмой / В.А.Соколов, Е.И. Бялик, А.М Файн, П.А. Иванов,Ю.А. Воронцов // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. - 2008. - № 2. - С.29-32.
- 91.Соломин, Л.Н. Основы чрескостного остеосинтеза аппаратом Г.А. Илизарова / Л.Н. Соломин.- СПб.: Морсар АВ, 2005. - 544 с.
- 92.Сорокина, В.О. Применение споробактерина в лечении пациентов с ожоговыми ранами / В.О.Сорокина, Б.Ш.Минасов, О.В.Попова, О.С.Попов // Медицинский вестник Башкортостана. - 2013. - Т.8.№ 6. - С. 106-108.
- 93.Сулейманов, И.М. Споробактерин в комплексном лечении больных с синдромом диабетической стопы / И.М.Сулейманов, В.К.Есипов // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11: Медицина. - 2009. - №2. - С.108-114.
- 94.Сысенко, Ю.М. Лечение больных с множественными переломами костей верхних конечностей методом чрескостного остеосинтеза по Илизарову / Ю.М.Сысенко, К.Н.Смельшев, С.П.Бойчук // Гений ортопедии -2002.-№1.- С. 36-40
- 95.Такиев, А.Т., Особенности оперативного лечения открытых переломов дистального отдела бедра у пострадавших с сочетанной и множественной травмой/ А.Т. Такиев, Л.Г. Клопов, П.А. Иванов // Диагностика и лечение тяжелых внутрисуставных переломов дистального отдела бедра у пострадавших с политравмой. - М., 2005. - С. 16–19.
- 96.Тарасенко, В.С. Острый панкреатит и транслокация бактерий / В.С.Тарасенко, В.И.Никитенко, В.А.Кубышкин // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. - 2000. - Т.159, №6. - С.86-89с.

97. Тихилов, Р.М. Организационно-методическая работа по созданию и развитию травматологической службы / Р.М.Тихилов, Т.Н.Воронцова, С.С.Лучанинов // Сиб: РНИИТО им. Р.Р.Вредена, 2009. 372 с.
98. Ткаченко, С.С. Хирургическая обработка ран при огнестрельных переломах костей конечностей как проблема целостного организма / С.С.Ткаченко // Опыт советской медицины в Афганистане. - М., 1992.- С. 83-84.
99. Третьяков, Е.В. Современный взгляд на кишечную транслокацию бактерий как основную причину гнойно-септических осложнений при деструктивном панкреатите / Е.В.Третьяков, М.В.Варганов, Е.Е.Нифонтова // Успехи современного естествознания. – 2013. - № 9. - С. 78-80.
100. Чернов, В.Ф. Изучение имплантации сетчатых конструкций из никелида титана / В.Ф. Чернов, А.Н.Бевзюк, А.В.Чернов // Мед. наука образ. Урала. - 2008. - №2. - С.98-100
101. Шаповалов, В.М. Патогенез, клиника, диагностика и лечение хирургической инфекции при огнестрельных повреждениях опорно-двигательного аппарата / В.М. Шаповалов, А.Г.Овденко // Вестник Российской военно-медицинской академии. - 2008. - № 2 (22). - С. 60-65.
102. Шаповалов, В.М. Боевые повреждения конечностей: сберегательная первичная хирургическая обработка огнестрельной костно-мышечной раны (сообщение 7) / В.М. Шаповалов, А.Н.Ерохов // Травматология и ортопедия России. - 2006. - № 2 (40). - С. 305-306.
103. Шаповалов, В.М. Возможности последовательного остеосинтеза при лечении раненых с огнестрельными переломами длинных костей конечностей / В.М. Шаповалов, В.В.Хоминец // Гений ортопедии. - 2010. - № 3. - С. 5-12.
104. Шаповалов, Д.А. Особенности строения кожи крыс в норме и при действии пирогенала / Д.А.Шаповалов, А.П.Голуб // Морфология. - 2008. - Т. II, №2. - С.71-74.
105. Шевцов, В.И. Влияние кальций-фосфатного покрытия спиц на процессы минерализации и активность остеогенеза при чрескостном

- дистракционном остеосинтезе / В.И. Шевцов, Ю.М.Ирьянов, Н.В.Петровская, Т.Ю.Ирьянова // Морфол. ведомости. -2008. - №3-4. - С. 231-234.
106. Шевцов, В.И.О перспективах использования наноматериалов в лечении повреждений и заболеваний тканей опорно-двигательной системы / В.И. Шевцов, Е.А. Волокитина, С.Н. Лунева и соавт. // Гений ортопедии. - 2008. - № 4. - С. 26-31.
107. Шиббаев, Е.Ю. Микрохирургическая аутотрансплантация тканей в лечении открытых переломов конечностей / Е.Ю. Шиббаев, П.А. Иванов, Д.А. Кисель // Трансплантология. - 2010. - №3-4. - Р.23-36
108. Шурыгин, М.Г. Влияние основного фибробластического фактора роста на выраженность цитолиза при экспериментальном инфаркте миокарда / М.Г. Шурыгин, И.А. Шурыгина, Н.Н. Дремина // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2008. – Т.64,№6. – С. 58-60
109. Явление естественного защитного бактериального механизма при повреждениях: Заявка на открытие № ОТ 11353 / В.И. Никитенко, О.В. Бухарин, И.К.Никитенко (СССР). - ВНИИГПЭ: 1986.
110. Якиманская, Ю.О. Особенности формирования регенерата при лечении оскольчатых переломов костей нижних конечностей методом чрескостного остеосинтеза в сочетании с гирудотерапией (экспериментально-морфологическое исследование) / Ю.О. Якиманская, Е.Н.Горбач, Е.В.Осипова, М.А.Степанов // Гений ортопедии. - 2011. - №4. - С.14-19
111. Ямщиков, О.Н. Применение этапного оперативного лечения открытых переломов бедренных костей / О.Н. Ямщиков, С.А. Емельянов, Д.А. Марков, А.В. Гришин, А.Н. Перегородов // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. - 2015. - Т.20,№ 2. - С.325-327.
112. Ярыгин, Н.В.Местная цитокиноterapia в комплексном лечении и профилактике раневой инфекции открытых переломов длинных трубчатых

- костей / Н.В. Ярыгин, С.В. Колобов, А.Г. Сарвин, А.В. Мотренко, В.И. Ярема // Вестник лимфологии. - 2009. - №3. - С.4-10.
113. Abe, M. A. possible mechanism of basic fibroblast growth factor-promoted scarless wound healing: the induction of myofibroblast apoptosis. / M. Abe, Y. Yokoyama, O. Ishikawa // *Eur. J. Dermatol.* – 2012. – Vol., No.22. – P.46-53.
114. Achten, J. UK Fixation of Distal Tibia Fractures (UK FixDT): protocol for a randomised controlled trial of 'locking' plate fixation versus intramedullary nail fixation in the treatment of adult patients with a displaced fracture of the distal tibia / J.Achten, N.R. Parsons, K.R. McGuinness, S. Petrou, S.E. Lamb, M.L.Costa // *BMJ Open.* – 2015. – Vol. 18, Sep 18;5(9). - e009162 (электронная публикация).
115. Ajmera, A. Outcome of limb reconstruction system in open tibial diaphyseal fractures / A. Ajmera, A. Verma, M. Agrawal, S. Jain, A.Mukherjee // *Indian J Orthop.* -2015. - Vol.49(Jul-Aug). – P.429-435.
116. Akasaka, Y. The mechanisms underlying fibroblast apoptosis regulated by growth factors during wound healing / Y. Akasaka, I. Ono, T. Kamiya, Y. Ishikawa et al. // *J Pathol.* – 2010. – Vol.221(3). – P.285-299.
117. Allen Jr., J.C. The effect of retained intramedullary nails on tibial bone mineral density / J.C. Allen Jr., R.W.Lindsey, J.A.Hipp // *Clin Biomech (Bristol, Avon).* - 2008. - Vol. 23, No.6. - P.839-843
118. Almedia, J. Gut flora and bacterial translocation in chronic liver disease / J. Almedia, S. Galhenage, J. Yu // *World J Gastroenterol.* - 2006. - Vol. 12, No. 10.- P.1493-1502.
119. Anglen, J.O. Comparison of soap and antibiotic solutions for irrigation of lower-limb open fracture wounds: A prospective, randomized study / J.O. Anglen // *J Bone Joint Surg Am .* - 2006. - Vol. 87.- P.1415-1422.
120. Archdeacon, M.T. Modern papineau technique with vacuum-assisted closure / M.T. Archdeacon, P. Messerschmitt // *J Orthop Trauma.* - 2006.- Vol.20(2) - P.134-137

121. Arioka, M. Acceleration of bone regeneration by local application of lithium: Wnt signal-mediated osteoblastogenesis and Wnt signal-independent suppression of osteoclastogenesis / M. Arioka , F.Takahashi-Yanaga, M.Sasaki // *Biochem Pharmacol.* - 2014. - Vol. 90, No.4 (Aug 15). - P.397-405
122. Aro, H.T., Cortical bone reactions at the interface of external fixation half pins under different loading condition / H.T.Aro, M.D.Markel, E.Y.S. Chao // *J Trauma* -1993 -V 35,- N5 -P.776-785.
123. Attinger, C.E. Angiosomes of the foot and ankle and clinical implications for limb salvage: Reconstruction, incisions, and revascularization / C.E. Attinger, K.K. Evans, E. Bulan, P. Blume, P. Cooper // *Plast Reconstr Surg.* - 2006. - Vol. 117.- P.261-293.
124. Azzam, W. Our experience in the management of segmental bone defects caused by gunshots / W. Azzam, A.Atef // *Int Orthop.* – 2016. – Vol 40.No 2. – P.233-238.
125. Bach, A.W. Plates versus external fixation in severe open tibial shaft fractures: A randomized trial / A.W. Bach, S.T.Hansen Jr. // *Clin Orthop Relat Res.* - 1989. - Vol. 241. - P.89-94
126. Bakhshayesh, M. Effects of TGF- $\beta$  and b-FGF on the potential of peripheral blood-borne stem cells and bone marrow-derivedstem cells in wound healing in a murine model / M. Bakhshayesh, M. Soleimani, M. Mehdizadeh, M.Katebi // *Inflammation.* – 2012. –Vol.35, No.1(Feb). – P.138-142.
127. Barrientos, S. Growth factors and cytokines in wound healing. / S. Barrientos, O. Stojadinovic, S. Michael, M.D. Golinko et al. // *Wound Rep. Reg.* – 2008. – № 16. – P. 585–601
128. Beardmore, A.A. Effectiveness of local antibiotic delivery with an osteoinductive and osteoconductive bone-graft substitute / A.A.Beardmore, D.E.Brooks, J.C.Wenke, D.B.Thomas // *J Bone Joint Surg Am.* - 2005. - Vol.87, №1.-P. 107-112



129. Bennett S.P. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. / S.P. Bennett, G.D. Griffiths, A.M. Schor et al. // Br. J. Surg. – 2003. – Vol. 90. – P. 133–146
130. Bhandari, M. 3rd Study to prospectively evaluate reamed intramedullary nails in patients with tibial fractures (S.P.R.I.N.T.): study rationale and design / M. Bhandari, G.Guyatt, P.Tornetta 3rd // BMC Musculoskelet Disord. - 2008. - Vol. 23, Jun(9). - P.91
131. Bhandari, M. High and low pressure irrigation in contaminated wounds with exposed bone / M. Bhandari, K.Fong, S.Sprague, D.Williams, B.Petrisor// J Bone Joint Surg Am. - 2012. - Aug 1;94(15)- e1091-6. doi: 10.2106/JBJS.K.01344.
132. Bhattacharyya, T. Routine use of wound vacuum-assisted closure does not allow coverage delay for open tibia fractures / T. Bhattacharyya, P.Mehta, M.Smith, B.Pomahac // Plast Reconstr Surg . - 2008. - Vol. 121. - P.1263-1266
133. Bleck, T.P. Clostridium tetani (Tetanus) / T.P. Bleck // Principles and Practice of Infectious Diseases. / G. Mandell, R. Douglas, J. Bennett. - 8-е изд. - Philadelphia: Churchill Livingstone. - 2014. - Гл 13.
134. Breugem, C.C. Is there evidence-based guidance for timing of soft tissue coverage of grade III B tibia fractures? / C.C.Breugem, S.D.Strackee // Int J Low Extrem Wounds - 2006. - Vol. 5, № 4. - P. 261-270.
135. Campbell's operative orthopaedics. - 11th ed. / редкол.: S. Terry Canale, James H. Beaty. - Mosby:An Imprint of Elsevier, 2007. - 5512 p.
136. Carinci, F. Pre-clinical evaluation of a new coral-based bone scaffold / F. Carinci, A.Santarelli, L.Laino // Int J Immunopathol Pharmacol. - 2014. - Vol. 27, No.2 (Apr-Jun). - P.221-234
137. Ceccarelli, S. Cortactin involvement in the keratinocyte growth factor and fibroblast growth factor 10 promotion of migration and cortical actin assembly in human keratinocytes / S. Ceccarelli, G. Cardinali, N. Aspite, M. Picardo et al. // Exp. Cell. Res. - 2007. - Vol. 313. - P.1758-1777

138. Chadayammuri, V. Innovative strategies for the management of long bone infection: a review of the Masquelet technique / V.Chadayammuri, V M. Hake, C.Mauffrey // *Patient Saf Surg.* – 2015. – No.14(Oct.). - P.9-32.
139. Chandrasekaran, R. Bacillus subtilis chitinase identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight/time of flight mass spectrometry has insecticidal activity against *Spodopteralitura* Fab / R. Chandrasekaran, K. Revathi, A. Thanigaivel, S.A. Kirubakaran, S. Senthil-Nathan // *PesticBiochem Physiol.* – 2014. – Vol.116. – P.1-12.
140. Chang , S.H. Fabrication of vascularized bone grafts of predetermined shape with hydroxyapatite-collagen gel beads and autogenous mesenchymal stem cell composites / S.H. Chang , K.Y.Tung, Y.J.Wang // *Plast Reconstr Surg.* - 2010. - Vol. 215, No.5. - P.1393-1402
141. Chen, G.J. Nano-microcapsule basic fibroblast growth factor combined with hypoxia-inducible factor-1 improves random skin flap survival in rats / G.J. Chen, Y.H. Chen, X.Q. Yang, Z.J. Li // *Mol Med Rep.* – 2016. – Vol.13, No.2. – P.1661-1666.
142. Chen, X.Q. Stem cells with FGF4-bFGF fused gene enhances the expression of bFGF and improves myocardial repair in rats / X.Q. Chen, L.L. Chen, L. Fan, J. Fang, Z.Y. Chen, W.W. Li // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2014. – Vol.447, No.1. – P.145-151.
143. Cheng, E.T. Effect of blended carbon dioxide and erbium: YAG laser energy on preauricular and ear lobule keloid fibroblast secretion of growth factors: a serum-free study. / E.T. Cheng, K.C. Nowak, R.J. Koch // *Arch Facial Plast Surg.* – 2001. – № 3(4). – P. 252-257
144. Chuang, J.I. FGF9-induced changes in cellular redox status and HO-1 upregulation are FGFR-dependent and proceed through both ERK and AKT to induce CREB and Nrf2 activation / J.I. Chuang, J.Y. Huang, S.J. Tsai, H.S. Sun, S.H. Yang, P.C. Chuang, B.M. Huang, C.H. Ching // *Free RadicBiol Med.* – 2015. – Vol.89. - P.274-286.

145. Cole, P.A. Treatment of proximal tibia fractures using the less invasive stabilization system: Surgical experience and early clinical results in 77 fractures / P.A. Cole, M.Zlowodzki, P.J.Kregor // *J Orthop Trauma* . - 2004. - Vol. 18. - P.528-535
146. Cornfield, J. Some new aspects of the application of maximum likelihood to the calculation of the dosage response curve. / J.Cornfield, N.Mantel // *J. Am. Statist. Assoc.* 1956. - Vol.45. - P.181-201.
147. Cross III, W.W. Treatment principles in the management of open fractures / WW Cross III, M.F. Swiontkowski // *Indian J Orthop.* - 2008. - Vol.42. - P.377-86
148. Crowley, D.J. Debridement and wound closure of open fractures: The impact of the time factor on infection rates / D.J. Crowley, N.K. Kanakaris, P.V. Giannoudis // *Injury.* - 2007. - Vol. 38.- P.879-889.
149. Crowley, D.J. Irrigation of the wounds in open fractures / D.J.Crowley, N.K.Kanakaris, P.V.Giannoudis // *J Bone Joint Surg Br.* - 2007. - Vol. 89, № 5. - P. 580-585
150. Dai, K. PDGFR $\alpha$  participates in basic fibroblast growth factor-mediated recovery of human bone marrow mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation after irradiation / K. Dai, Z. Yang, S.N. Xu, J.M. Zhang, J.P.Chen // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2015. Vol.23.No.6.– P.1709-1715.
151. Dang, C.M. Decreased expression of fibroblast and keratinocyte growth factor isoforms and receptors during scarless repair. / C.M. Dang, S.R. Beanes, C. Soo, K. Ting et al. // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2003. – Vol.111, No.6. – P. 1969-1979
152. Dantas Filho, A.M. Effects of the basic fibroblast growth factor and its anti-factor in the healing and collagen maturation of infected skin wound. / A.M. Dantas Filho, J.L. Aguiar, L.R. Rocha, I.M. Azevedo et al. // *Acta Cir Bras.* – 2007. – Suppl 1. – P. 64-71

153. Dedmond, B.T. The use of negative-pressure wound therapy (NPWT) in the temporary treatment of soft-tissue injuries associated with high-energy open tibial shaft fractures / B.T. Dedmond, B.Kortesis, K.Punger, J.Simpson, J.Argenta, B.Kulp et al. // J Orthop Trauma . - 2007. - Vol. 21. - P.11-17
154. Deng, Y. Repair of canine medial orbital bone defects with miR-31-modified bone marrow mesenchymal stem cells / Y. Deng , H.Zhou, P.Gu, X.Fan // Invest Ophthalmol Vis Sci. - 2014. - Vol. 55, No.9. - P.6016-6023
155. Dirschl, D.R. High pressure pulsatile lavage irrigation of intraarticular fractures: effects on fracture healing / D.R.Dirschl, G.P.Duff, L.E.Dahners et al. // J Orthop Trauma - 1998. - Vol. 12, № 7. - P. 460-463
156. Dougherty , P.J. Conversion from temporary external fixation to definitive fixation: Shaft fractures / P.J. Dougherty, C.Silverton, Y.Yeni, S.Tashman, R.Weir // J Am Acad Orthop Surg . - 2006. - Vol. 14. - P.124-127
157. Draeger, R.W. Debridement of cancellous bone: a comparison of irrigation methods / R.W. Draeger, D.R. Dirschl, L.E. Dahners // J Orthop Trauma. – 2006. Vol.20 (Nov-Dec). – P.692-698.
158. Draeger, R.W. Traumatic wound debridement: a comparison of irrigation methods / R.W. Draeger, L.E.Dahners // J Orthop Trauma. – 2006. -Vol.20 (Feb). - P.83-88.
159. Erickson, J. Acute Multiple Flexor Tendon Injury and Carpal Tunnel Syndrome After Open Distal Radius Fracture / J. Erickson, B. Culp, S. Kayiaros, J.Monica // Am J Orthop (Belle Mead NJ). - 2015 – Vol. 44 (Nov). –P.458-460.
160. European Convention for the Protection of vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes / Council of Europe, Strasbourg, 1986.
161. Fan, L. The hypoxia-inducible factor pathway, prolyl hydroxylase domain protein inhibitors, and their roles in bone repair and regeneration / L. Fan, J.Li, Z. Yu, X. Dang, K. Wang // BioMed Research International Volume. - 2014. - режим доступа <http://dx.doi.org/10.1155/2014/239356>

162. Fan, Y. Protective Effects of *Bacillus subtilis* ANSB060 on Serum Biochemistry, Histopathological Changes and Antioxidant Enzyme Activities of Broilers Fed Moldy Peanut Meal Naturally Contaminated with Aflatoxins / Y. Fan, L. Zhao, C. Ji, X. Li, R. Jia, L. Xi, J. Zhang, Q. Ma // *Toxins (Basel)*. – 2015. – Vol.7(8). – P.3330-3343.
163. Faraj, A. A. Study of twenty-seven paediatric patients with open tibial fracture : the role of definitive skeletal stabilisation / A. A. Faraj, A. T. Watters // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*. - 2002. - Vol. 65, No 10.-P. 453-456
164. Fathi , M. Anatomical study of lateral circumflex femoral arterial system for the anterolateral thigh flap / M. Fathi , H. Reza Fathi, E. Hatamipour et al. // *Minerva Chir.* - 2008. - Vol. 63, No.4. - P.283-288
165. Fisher, F.M. Understanding the Physiology of FGF21 / F.M. Fisher, E. Maratos-Flier // *AnnuRevPhysiol.* –2016. – Vol.78. P.223-241
166. Good Laboratory Practice for Non-clinical Laboratory Studies  
[Электронный ресурс]:  
URL: <http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/NonclinicalLaboratoriesInspectedUnderGoodLaboratoryPractices/ucm072691.htm> (дата обращения: 18.09.2016).
167. Green, P.J. Promiscuity of fibroblast growth factor receptors / P.J.Green, F.S.Walsh, P.Doherty // *BioEssays.* –1996. – Vol.18 (8). – P.639–646
168. Gupta, A. Free tissue transfer to the traumatized upper extremity: Risk factors for postoperative complications in 282 cases / A. Gupta, C. Lakhiani, B.H. Lim, J.M. Aho, A. Goodwin, A. Tregaskiss, M. Lee, L. Scheker, M.Saint-Cyr // *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* – 2015.- Vol.68(Sep). - P.1184-1190.
169. Gustilo, R.B. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: Retrospective and prospective analyses / R.B. Gustilo, J.T. Anderson // *J Bone Joint Surg Am.* - 1976.- Vol.58. - P. 453-458
170. Gustilo, R.B. Classification of type III (severe) open fractures relative to treatment and results / R.B. Gustilo, R.P. Gruninger, T. Davis // *Orthopedics.* - 1987. - Vol. 10. - P. 1781-1789

171. Harada, N. Bone regeneration in a massive rat femur defect through endochondral ossification achieved with chondrogenically differentiated MSCs in a degradable scaffold / N. Harada , Y. Watanabe, K.Sato // *Biomaterials*. - 2014. - Vol. 35(27), Sep. - P.7800-7810
172. Hardwicke, J. A role for vacuum-assisted closure in lower limb trauma: A proposed algorithm / J. Hardwicke, P. Paterson // *Int J Low Extrem Wounds* . - 2006. - Vol. 5. - P.101-104
173. Heffernan, E.J. The radiology of antibiotic-impregnated cement / E.J.Heffernan, F.O.Alkubaidan, L.M.White et al. // *Am J Roentgenol*. - 2007. - Vol. 189, № 2. - P. 446-454
174. Hildebrand, F. Damage control: Extremities / F. Hildebrand, P.Giannoudis, C.Krettek, H.C.Pape // *Injury* . - 2004. - Vol. 35. - P.678-689
175. Hildebrand, F. Impact of age on the clinical outcomes of major trauma / F. Hildebrand , H.C.Pape, K.Horst et al.// *Eur J Trauma Emerg Surg*. – 2016. – Vol.42.No.3. – P.317-332.
176. Hirsch, E.R. United States navy surgical research Republic of Vietnam 1966-1970 : A retrospective review / E.R. Hirsch, // *Milit: Med*. - 1987. - Vol. 152. - No. 5.- P.238-240.
177. Hu, Y. Basic fibroblast growth factor lentiviral vector-transfected sheep bone marrow mesenchymal stem cells and non-specific osteogenic gene expression / Y. Hu, Q. Zhang, L. Zhang, X.X. Tang, H.Y.He // *Mol Med Rep*. – 2015. Vol.12, No.1. – P.267-272.
178. Hutson, J.J. Jr. The treatment of gustilo grade IIIB tibia fractures with application of antibiotic spacer, flap, and sequential distraction osteogenesis / J.J. Jr. Hutson, D. Dayicioglu, J.C. Oeltjen // *Ann Plast Surg*. - 2010. - Vol.64. No.5.- P.541-552.
179. Imaizumi, T. Acceleration of sensory neural regeneration and wound healing with human mesenchymal stem cells in immunodeficient rats. / T. Imaizumi, S. Akita, K. Akino, A. Hirano // *Stem Cells*. – 2007. – № 25(11). – P. 2956-2963

180. Itoh, N. Functional Evolutionary History of the Mouse Fgf Gene Family. / N. Itoh, D.M.Ornitz // *Developmental Dynamics*. – 2008. – Vol. 237. – P. 18–27
181. Jacob, N. Management of high-energy tibial pilon fractures / N. Jacob, A. Amin, N. Giotakis, B. Narayan, S. Nayagam, A.J.Trompeter // *Strategies Trauma Limb Reconstr.* – 2015. - Vol.10(Nov). - P.137-147.
182. Jiang, J. Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against *Fusarium moniliforme*. / J. Jiang, L. Gao, X. Bie, Z. Lu, H. Liu, C. Zhang, F. Lu, H. Zhao // *BMC Microbiol.* – 2016. – Vol.16 – P. 31.
183. John , J.K. Short-term outcomes of severe open wartime tibial fractures treated with ring external fixation / J.K. John , E.G.David, M.T. Scott // *J Bone Joint Surg Am.* - 2008. - Vol. 90, No.12. - P.2643-2651
184. Jungnickel, J. Faster nerve regeneration after sciatic nerve injury in mice over-expressing basic fibroblast growth factor. / J. Jungnickel, K. Haase, J. Konitzer // *J Neurobiol.* – 2006. – Vol.66. – P. 940–948
185. Kawai, K. Accelerated wound healing through the incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis using a pressure-induced decubitus ulcer model in genetically diabetic mice. / K. Kawai, S. Suzuki, Y. Tabata, Y. Nishimura // *Br J Plast Surg.* – 2005. – Vol.58, No.8. – P. 1115-1123
186. Kim , J.W. Minimally invasive plate osteosynthesis for open fractures of the proximal tibia / J.W. Kim , C.W.Oh, W.J.Jung, J.S.Kim // *Clin Orthop Surg.* - 2012. - Vol. 4, No.4. - P.313-320
187. Kobbe, P. Treatment strategies for gunshot wounds of the extremities / P. Kobbe , M.Frink, R.Oberbeck, I.S.Tarkin, C.Tzioupis, D.Nast-Kolb et al. // *Unfallchirurg.* - 2008. - Vol. 111. - P.247-255
188. Kong ,W. Blood-derived small Dot cells reduce scar in wound healing. / W. Kong, S. Li, M.T. Longaker, H.P. Lorenz // *Exp. Cell Res.* – 2008. – Vol.314, No.7. – P.1529-1539



189. Koskenvuo, K. Current challenges of military medicine from the point of view of field health and medical care / K. Koskenvuo , // *Rev. Intern. Serv.Sante Armies.* - 1984. - Vol. 57, No. 4.- P.359-362.
190. Kural, C. A comparison between three irrigation methods in the debridement of contaminated bovine cancellous bone and the effect of duration of irrigation on the efficiency of debridement / C.Kural, I. Kaya, M.Yilmaz, E.Demirbaş, B.Yücel, M.Korkmaz, M.E.Cetinus // *Acta Orthop Traumatol Turc.* – 2009.- Vol.43,No4. – P.359-365.
191. Kuroda, K. Up-regulation of putative hyaluronan synthase mRNA by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor-1 in human skin fibroblasts. / K. Kuroda, A. Utani, Y. Hamasaki, H. Shinkai // *J. Dermatol. Sci.* – 2001. – Vol. 26. – P.156–160
192. La, W.G. Delivery of bone morphogenetic protein-2 and substance P using graphene oxide for bone regeneration / W.G. La, M.Jin, S.Park // *Int J Nanomedicine.* - 2014. - Vol. 9, Suppl 1. - P.107-116
193. Lambert, E.W. Orthopaedic injuries among survivors of USS COLE attack / E.W.Lambert, R.B.Simpson, A.Marzouk, D.V.Unger // *J Orthop Trauma* - 2003. -Vol. 17, No6. - P. 436-441
194. Lampe, B.J. Toxicological assessment of nattokinase derived from *Bacillus subtilis* var. natto / B.J. Lampe, J.C. English // *Food ChemToxicol.* – 2016. - Vol.88. – P.87-99.
195. Lawrence, X.W. Analysis of Surgeon-Controlled Variables in the Treatment of Limb-Threatening Type-III Open Tibial Diaphyseal Fractures / X.W. Lawrence , J.B. Michael, C.C.Renan // *Bone Joint Surg Am.* - 2007. - Vol. 89, No.5. - P.923-928
196. Lecene, P. *Chirurgie des os et des articulations des membres* / P.Lecene. - Paris : Masson, 1929. - 591 p.
197. Lee, J.H. Outcomes of anterolateral thigh-free flaps and conversion from external to internal fixation with bone grafting in gustilo type IIIB open tibial

- fractures / J.H. Lee, D.W.Chung, C.S.Han // *Microsurgery*. - 2012. - Vol. 32, No.6. - P.431-437
198. Leriche, R. Les problemes de la physiologie normale et la pathologique de l'os / R. Leriche , A.Policard .- Paris: Mason, 1926. - 231p.
199. Levin, L.S. Early versus delayed closure of open fractures / L.S. Levin, // *Injury*. - 2007. - Vol. 38.- P.896-899.
200. Lin, C.A. Reaming does not affect functional outcomes after open and closed tibial shaft fractures: the results of a randomized controlled trial / C.A. Lin, M.Swiontkowski, M. Bhandari, S.D. Walter, E.H. Schemitsch, D. Sanders, P. Tornetta 3<sup>rd</sup> // *J Orthop Trauma*. – 2016. – Vol.30, No.3. – P.142-148.
201. Lin, C.M. Biomimetic growth of apatite on electrolytic TiO<sub>2</sub> coatings in simulated body fluid / C.M. Lin , S.K. Yen // *Materials Sci. & Engineering*. - 2006. - Vol. 26. - P.54-64
202. Lin, D.L. Evaluation of orthopaedic injuries in Operation Enduring Freedom / D.L.Lin, K.L.Kirk, K.P.Murphy // *J Orthop Trauma* - 2004. - Vol. 18, №8.-P. 48-53.
203. MacFie, J. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years / J. MacFie, B.S. Reddy, M. Gatt // *Br J Surg*. - 2006. - Vol. 93, No. 1.- P.87-93.
204. Martí-Carvajal, A.J. Growth factors for treating diabetic foot ulcers / A.J. Martí-Carvajal, C. Glud, S. Nicola et al. // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2015. - Oct 28;10 doi: 10.1002/14651858.CD008548 (электронный ресурс).
205. Mathieu, L. Damage control orthopaedics in the context of battlefield injuries: the use of temporary external fixation on combat trauma soldiers / L. Mathieu , F.Bazile, R.Barthélémy, P.Duhamel, S.Rigal // *Orthop Traumatol Surg Res*. - 2011. - Vol. 97, No.8. - P.852-859
206. McKee, M.D. A prospective, randomized clinical trial comparing an antibiotic-impregnated bioabsorbable bone substitute with standard antibiotic-impregnated cement beads in the treatment of chronic osteomyelitis and infected nonunion / M.D. McKee, E.A. Li-Bland, L.M. Wild, E.H. Schemitsch // *J Orthop Trauma*. - 2010 – Vol.24, No.8(Aug). – P.483-490

207. McLaren, J.S. A biodegradable antibiotic-impregnated scaffold to prevent osteomyelitis in a contaminated in vivo bone defect model / J.S. McLaren , L.J.White, H.C.Cox // *Eur Cell Mater.* - 2014. - Vol. 27. - P.332-349
208. McNamara, I.R. Surgical fixation methods for tibial plateau fractures / I.R. McNamara, T.O. Smith, K.L. Shepherd, A.B. Clark, D.M. Nielsen, S. Donell, C.B. Hing // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2015. – Sep. – P.15–19.
209. Mei, Z.F. Locking plate external fixator for the treatment of middle and distal tibial fractures // Z.F. Mei, S.W. Fan, F.D. Zhao, C.Y. Wang, J.H. Liu, Z. Shan // *Zhongguo GuShang.* – 2014. – Vol.27, No.6. – P.458-460.
210. Metsemakers, W.J. The use of gentamicin-coated nails in complex open tibia fracture and revision cases: A retrospective analysis of a single centre case series and review of the literature / W.J. Metsemakers, M. Reul, S.Nijs // *Injury.* – 2015. – Vol.46(Dec). – P.2433-2437.
211. Milenkovic, S. External skeletal fixation of the tibial shaft fractures / S. Milenkovic, M. Mitkovic, M. Radenkovic // *Vojnosanit Pregl.* - 2005. - Vol. 62, No 1. - P. 11-15.
212. Miyoshi, M. Effects of bFGF incorporated into a gelatin sheet on wound healing. / M. Miyoshi, T. Kawazoe, H.H. Igawa, Y. Tabata et al. // *J Biomater Sci Polym Ed.* – 2005. – Vol. 16(7). – P. 893-907
213. Monni, T. Conversion of external fixation to internal fixation in a non-acute, reconstructive setting: a case series / T. Monni , F.F.Birkholtz, P.de Lange // *Strategies Trauma Limb Reconstr.* - 2013. - Vol. 8, No.1. - P.25-30
214. Morawska-Chochół, A. Gentamicin release from biodegradable poly-l-lactide based composites for novel intramedullary nails / A. Morawska-Chochół, P. Domalik-Pyzik, J. Chłopek, B. Szaraniec, et al. // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* – 2014. – Vol. 45(Dec). – P.15-20.
215. Muharrem, I. Treatment of type IIIA open fractures of tibial shaft with Ilizarov external fixator versus unreamed tibial nailing / I. Muharrem, H.Mehmet, A.Irfan // *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery.* - 2007. - Vol. 127, No.8. - P.617-623

216. Nagato, H. Collagen-poly glycolic acid hybrid matrix with basic fibroblast growth factor accelerated angiogenesis and granulation tissue formation in diabetic mice. / H.Nagato, Y. Umebayashi, M. Wako, Y. Tabata et al. // J Dermatol. – 2006. – Vol. 33, No.10. – P. 670-675
217. Naique, S.B. Management of severe open tibial fractures / S.B. Naique, M. Pearse, J.Nanchahal // J Bone Joint Surg Br. - 2006. - Vol. 88.- P.351-357.
218. Nandi , S.K. Converted marine coral hydroxyapatite implants with growth factors: In vivo bone regeneration / S.K. Nandi , B.Kundu, J.Mukherjee // Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. - 2015. - Vol. 49 (Apr 1). - P.816-823
219. Nejedly, A. Muscle flap transfer of the treatment of infected tibial and malleolar fractures and chronic osteomyelitis of the tibia / A. Nejedly, V. Dzupa, J. Zahorka et al. // Acta Chir Orthop Traumatol Cech. - 2007. - Vol. 74, No. 3.- P.162-170.
220. 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. - Vol. 20, No. 3.- P.114-121.
221. Nikitenko, V.I. Can translocated bacteria reduce wound infection / V.I. Nikitenko // Journal of wound care. - 2007. - Vol. 16, No. 4.- P.151-153.
222. Obara, K. Acceleration of wound healing in healing-impaired db/db mice with a photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2. / K. Obara, M. Ishihara, M. Fujita, Y. Kanatani et al. // Wound Repair Regen. – 2005. – Vol. 13(4). – P. 390-397
223. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring [Электронный ресурс]: URL: [http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcomplianceandmonitoring.htm#GLP\\_consensus\\_documents](http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcomplianceandmonitoring.htm#GLP_consensus_documents) (дата обращения: 18.09.2016).
224. Owens, B.D. Comparison of irrigation solutions and devices in a contaminated musculoskeletal wound survival model / B.D.Owens, D.W.White, J.C. Wenke // J Bone Joint Surg Am. – 2009. - Vol.91(Jan). - P. 92-98.

225. Pairon, P. Intramedullary nailing after external fixation of the femur and tibia: a review of advantages and limits / P. Pairon, C. Ossendorf, S. Kuhn, A. Hofmann, P.M.Rommens // *Eur J Trauma Emerg Surg.* – 2015. – Vol.41(Feb). – P.25-38.
226. Pape, H.C. Patient assessment in polytrauma: Current trends rely on multiple parameters to improve the prediction of complications and mortality. / H.C. Pape, H.R.Champion// *Injury.* - 2015. –Vol.46, No.10. - P.1875-1877
227. Parrett, B.M. Lower extremity trauma: Trends in the management of soft-tissue reconstruction of open tibia-fibula fractures / B.M. Parrett, E.Matros, J.J.Pribaz, D.P.Orgill // *Plast Reconstr Surg.* - 2006. - Vol. 117. - P.1315
228. Petrisor, B. Fluid lavage of open wounds (FLOW): a multicenter, blinded, factorial pilot trial comparing alternative irrigating solutions and pressures in patients with open fractures / FLOW Investigators, B.Petrisor, X.Sun, M.Bhandari, G.Guyatt G, K.J.Jeray, S.,Sprague, S.Tanner, E.Schemitsch, P.Pancheti, J.Anglen, P.Tornetta, M.Bosse, S.Liew // *J Trauma.* – 2011. – Vol. 71 (Sep) . – P.596-606.
229. Plazas Bonilla , C.E. New porous polycaprolactone-silica composites for bone regeneration / C.E. Plazas Bonilla , S.Trujillo, B.Demirdögen // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* - 2014. - Vol. 40. - P.418-426
230. Pollak, A.N. Short-term wound complications after application of flaps for coverage of traumatic softtissue defects about the tibia / A.N. Pollak, M.L. McCarthy, A.R. Burgess // *J Bone Joint Surg Am .* – 2000. Vol.82-A, No. 12.- P.1681-1691.
231. Pollak, A.N. Timing of debridement of open fractures / A.N. Pollak, // *J Am Acad Orthop Surg.* - 2006. - Vol. 14.- P.48-51.
232. Prazdnova, E.V. DNA-protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 / E.V. Prazdnova, V.A. Chistyakov, M.N. Churilov, M.S. Mazanko et al. // *Lett Appl Microbiol.* – 2015. – Vol.61,No.6. – P.549-554

233. Presta, M. Inflammatory cells and chemokines sustain FGF2-induced angiogenesis / M.Presta, G. Andrés, D. Leali, P. Dell'era et al. // *Eur Cytokine Netw.* – 2009. – Vol. 20. No.2 – P. 39-50
234. Pruitt, B.A. Jr. Vietnam (1972) to Afghanistan (2014): the state of military trauma care and research, past to present / B.A. Jr.Pruitt, T.E.Rasmussen // *J Trauma Acute Care Surg.* – 2014. – Vol.77(3 Suppl 2). – P.57-65.
235. Qiao, Y. Stimulation of bone growth following zinc incorporation into biomaterials / Y. Qiao , W.Zhang, P.Tian // *Biomaterials.* - 2014. - Vol. 35 (25). - P.6882-6897
236. Qiu, S.L. Influence of chitosan and basic fibroblast growth factor on wound healing. / S.L. Qiu, M. Feng, P.P. Zhang, W. Zhao et al. // *J. Clin. Rehab. Tissue Eng. Res.* – 2008. – Vol. 12, No.10. – P. 1823 – 1826
237. Qiu, X.S. Antibiotic-impregnated cement spacer as definitive management for osteomyelitis / X.S. Qiu, X. Zheng, H.F. Shi, Y.C. Zhu et al. // *BMC Musculoskelet Disord.* – 2015.- Sep 14. – P.16-254.
238. Rajasekaran, S. Early versus delayed closure of open fractures / S. Rajasekaran // *Injury.* - 2007. - Vol. 358.- P.890-895.
239. Recknagel, S. Conversion from external fixator to intramedullary nail causes a second hit and impairs fracture healing in a severe trauma model / S. Recknagel , R.Bindl, T.Weohner // *J Orthop Res.* - 2013. - Vol. 31, No.3. - P.465-471
240. Reuss, B.L. Effect of delayed treatment on open tibial shaft fractures / B.L. Reuss, J.D. Cole // *Am J Orthop .* - 2007. - Vol. 36.- P.215-220.
241. Ricordy, R. Impairment of cell cycle progression of aflatoxin B1 in human cell lines / R. Ricordy, G. Gensabella, E. Cacci, G.Augusti-Tocco // *Mutagenesis.* – 2002. – Vol. 17. – P.241-249.
242. Roberts, C.S. Are the less common compartment syndromes less of a problem? / C.S. Roberts, L.Feher // *Injury.* - 2015. - Feb;46(2) - P.173-175
243. Roberts, C.S. Damage control orthopaedics: Evolving concepts in the treatment of patients who have sustained orthopaedic trauma / C.S. Roberts ,

- H.C.Pape, A.L.Jones, A.L.Malkani, J.L.Rodriguez, P.V.Giannoudis // Instr Course Lect . - 2005. - Vol. 54. - P.447-462
244. Robson, M.C. The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores. / M.C. Robson, L.G. Phillips, W.T. Lawrence, J.B. Bishop et al. // Ann. Surg. – 1992. – Vol. 216. – P. 401–408
245. Rodrigues, F.L. Bone tissue repair in patients with open diaphyseal tibial fracture treated with biplanar external fixation or reamed locked intramedullary nailing / F.L. Rodrigues , L.C.de Abreu, V.E.Valenti, A.L.Valente // Injury. - 2014. - Vol. 45, Nov., Suppl 5. - P.32-35
246. Rüedi, Thomas P. AO Principles of Fracture Management. / Thomas P. Rüedi, William M. Murphy.- New York: Thieme Stuttgart, 2000. - 864 p.
247. Ryan, S.P. Pugliano V. Controversies in Initial Management of Open Fractures / S.P.Ryan, V. Pugliano // Scand J Surg. - 2014. - Apr 15, Vol.103, No.2. - P.132-137
248. Salem, A.K. Recent progress on the development of gene-activated scaffolds encoding PDGF for enhanced bone regeneration / A.K. Salem // Regen Med. - 2014. - Vol. 9, No.3. - P.253-254
249. Sánchez-González, M.C. FGF-23: just a phosphate metabolism regulator or something else? / M.C. Sánchez-González, L. Salanova, P. Ruano // Reumatol Clin. – 2011. – Sep;7 Suppl 2. – P. 5-7
250. Sarkhel, S. Condylar orientation plating incomminuted intraarticular fractures of adult distal humerus / S.Sarkhel, S.Bhattacharyya, S.Mukherjee // Indian J Orthop. – 2015. - Vol.49, No.5. - P.523-528.
251. Schenk, R.K. Bone response to grafts and implants / R.K. Schenk // Perspect. Biomater.: Proc. Int. Symp.Biomater., 25-27 Febr., 1985, Taipei (Taiwan).-Amsterdam e.a., 1986. - P.123-136.
252. Schlatterer, D.R. Negative Pressure Wound Therapy in Grade IIIB Tibial Fractures: Fewer Infections and Fewer Flap Procedures? / D.R. Schlatterer,



- A.G.Hirschfeld, L.X.Webb // Clin Orthop Relat Res. – 2015. – Vol.473, No.5. – P.1802-1811.
253. Schottle, P.B. Two-stage reconstruction with free vascularized soft tissue transfer and conventional bone graft for infected nonunions of the tibia: 6 patients followed for 1.5 to 5 years / P.B.Schottle, M.Werner, C.E.Dumont // Acta Orthop. - 2005. - Vol. 76, № 6. P. 878-883
254. Seligson, D. Antibiotic-laden PMMA bead chains for the prevention of infection in compound fractures: current state of the art / D. Seligson, S. Berling // Eur J Orthop Surg Traumatol. – 2015. – Vol.25, No.6.–P.969-974.
255. Shao, Y. Meta-analysis of reamed versus unreamed intramedullary nailing for open tibial fractures / Y. Shao, H.Zou, S.Chen, J.Shan // J Orthop Surg Res. - 2014. - Vol. 23, No.9. - P.74
256. Sheehan, A.J. Soft tissue and wound management of blast injuries / A.J. Sheehan, S.M. Tintle, P.C.Rhee // Curr Rev Musculoskelet Med. – 2015. – Vol 8(Sep). – P.-265-271.
257. Sherman, R. Timing of wound coverage in extremity war injuries / R. Sherman, S. Rahban, A.N. Pollak // J Am Acad Orthop Surg. / 2006. - Vol. 14, Suppl. 10.- P. 57-61
258. Sigurdson, U. Conversion of external fixation to definitive intramedullary nailing in experimental tibial fractures / U. Sigurdson , O.Reikeras, S.E.Utvag // J Invest Surg. - 2010. - Vol. 23, No.3. - P.142-148
259. Sigurdson, U. The Effect of timing of conversion from external fixation to secondary intramedullary nailing in experimental tibial fractures / U. Sigurdson, O.Reikeras, S.E.Utvag // J Orthop Res. - 2011. - Vol. 29, No.1. - P.126-130
260. Singla, D. Fibroblast growth factor-9 activates c-kit progenitor cells and enhances angiogenesis in the infarcted diabetic heart / D. Singla, J.Wang // Oxid Med Cell Longev. - 2016. - doi: 10.1155/2016/5810908. - Epub 2015 Nov 22.
261. Sîrbu, P.D. Transarticular approach and retrograde plate osteosynthesis (TARPO) using implants with angular stability -- a series of 17 cases of complex distal femoral fractures type C3/AO. / P.D. Sîrbu, R. Asaftei, T. Petreuş, C.

- Lupaşcu, B. Puha, S.Luncă // *Chirurgia (Bucur)*. – 2014. – Vol.109, No.2. – P.233-237.
262. Song, D. Thinned chimeric radial collateral artery perforator flap in complex distal thumb reconstruction / D. Song, X. Deng, Y. Chen, S. Xie, X.Zhou // *Arch Orthop Trauma Surg*. – 2015. – Vol.135(Nov). – P.1623-1631.
263. Sungaran, J. The effect of time to theatre on infection rate for open tibia fractures / J. Sungaran, I. Harris, M. Mourad // *ANZ J Surg*. - 2007. - Vol. 77.- P.886-888.
264. Suzuki, T. Safety and efficacy of conversion from external fixation to plate fixation in humeral shaft fractures / T. Suzuki, D.J.Hak, P.F.Stahel, S.J.Morgan, W.R.Smith // *J Orthop Trauma*. - 2010. - Vol. 24, No.7. - P.414-419
265. Takayama, M. The exudate of pressure ulcers contains a substantial amount of vascular endothelial growth factor. / M. Takayama, Y. Kuramoto, R. Okuyama, K. Yamasaki et al. // *Tohoku J Exp Med*. – 2010. – Vol. 221, No.4. – P. 315-319
266. Takikawa, M. Improved angiogenesis and healing in crush syndrome by fibroblast growth factor-2-containing low-molecular-weight heparin (Fragmin)/protamine nanoparticles / M. Takikawa, S. Nakamura, M. Ishihara, et al.// *J Surg Res*. – 2015. – Vol.196(2). – P.247-257.
267. Tarkin, I.S. An update on the management of high-energy pilon fractures / I.S. Tarkin, M.P.Clare, A. Marcantonio, H.C.Pape // *Injury*. - 2008. - Vol. 39. - P.142-154
268. Templeman, D.C. Update on the management of open fractures of the tibial shaft / D.C. Templeman, B. Gulli, D.T. Tsukayama, R.B. Gustilo // *Clin Orthop Relat Res*. - 1998. - Vol. 350.- P.18-25.
269. ter Boo ,G.J. Antimicrobial delivery systems for local infection prophylaxis in orthopedic- and trauma surgery / G.J. ter Boo, D.W. Grijpma, T.F. Moriarty, R.G. Richards, D. Eglin // *Biomaterials*. - 2015 – Vol.52, Jun. – P. 113-125.

270. Thomas, D.B. Tobramycin-impregnated calcium sulfate prevents infection in contaminated wounds / D.B.Thomas, D.E.Brooks, T.G.Bice, et al. // *Clin. Orthop. Relat. Res.* - 2005. - Vol. 441. - P. 366-371
271. Torres, J. The benefit of a human bone marrow stem cells concentrate in addition to an inorganic scaffold for bone regeneration: an in vitro study / J. Torres , A.Lopes, M.A.Lopes // *Biomed Res Int.* - Epub 2015 Jan 22. - doi: 10.1155/2015/240698
272. Vlodavsky, Cao R. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. / Cao R. Vlodavsky, E.Bråkenhielm, R.Pawliuk, D.Wariaro, M.J.Post, E.Wahlberg, P.Leboulch, Y. Cao // *Nature Med.* – 2003. –Vol.9(5). - P.604–613.
273. Wan, Y. Effectiveness of digital customized steel plate in treatment of complex fractures of limbs / Y. Wan, N. Zhuo, Y. Yang, J. Ge, X. Lu // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian WaiKe Za Zhi.* – 2015. – Vol.29, No.4. – P.402-405.
274. Wang, S. Antibiotic-impregnated cement temporary spacer for surgical treatment of osteomyelitis and nonunion of bone caused by intramedullary nailing/ S.Wang // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* - 2011 – Vol.25,No.8. – P.972-975.
275. Wang, X. The initial pin site of external fixation conversion to internal fixation / X. Wang, S.M.Chang, G.R.Yu // *J Orthop Trauma.* - 2011. - Vol. 25, No.3. - P.31-32
276. Webb, L.X. Analysis of surgeon-controlled variables in the treatment of limb-threatening type-III open tibial diaphyseal fractures / L.X. Webb, M.J. Bosse, R.C. Castillo, E.J. MacKenzie // *J Bone Joint Surg Am.* - 2007. - Vol. 89.- P.923-928.
277. Wei, S.J. A comparison of primary and delayed wound closure in severe open tibial fractures initially treated with internal fixation and vacuum-assisted wound coverage: a case-controlled study / S.J. Wei, X.H. Cai, H.S. Wang, B.W. Qi, A.X.Yu // *Int J Surg.* –2014. –Vol.12, No.7. – P. 688-694.

278. Weigle, W.O., Cochrane G., Dixon F.L. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in the guinea pig and rabbit / W.O.Weigle, G.Cochrane, F.L. Dixon // *J. Immun.* - 1960. - Vol.85. - P.469-477.
279. Wilcke, I. VEGF165 and bFGF protein-based therapy in a slow release system to improve angiogenesis in a bioartificial dermal substitute in vitro and in vivo. / I. Wilcke, J.A. Lohmeyer, S. Liu, P. Mailander et al. // *Langenbeck's Arch. Surg.* – 2007. – Vol. 392, No.3. – P. 305 – 314
280. Wogan, G.N. Environmental and chemical carcinogenesis / G.N. Wogan, S.S. Hecht, J.S. Felton, A.H. Conney, L.A. Loeb // *Seminars in Cancer Biology.* – 2014. – Vol.14. – P.473-486.
281. Wu, W. Osteogenic performance of donor matched human adipose and bone marrow mesenchymal cells under dynamic culture / W. Wu , A.Le, J.J.Mendez // *Tissue Eng Part A.* – 2015. – Vol.21, No.9-10. – P.1621-1632.
282. Wu, Z. In vitro degradability, bioactivity and cell responses to mesoporous magnesium silicate for the induction of bone regeneration / Z. Wu , T.Tang, H.Guo // *Colloids Surf B Biointerfaces.* - 2014. - Vol. 120. - P.38-46
283. Xu, P. Fibroblast growth factor 21 attenuates hepatic fibrogenesis through TGF- $\beta$ /smad2/3 and NF- $\kappa$ B signaling pathways / P. Xu, Y. Zhang, Y. Liu, Q. Yuan, L. Song, M. Liu, Z. Liu, Y. Yang, J. Li, D. Li, G. Ren // *ToxicolApplPharmacol.* – 2016. –Vol.290(Jan 1). - P.43-53.
284. Yan, R.J. One-stage compound grafting of antibiotic-impregnated calcium sulfate and autogenous cancellous bone for the treatment of chronic calcaneal osteomyelitis / R.J. Yan, C.Zhang, Q.F. Guo, J.W. Lu // *Zhongguo Gu Shang.* – 2014. – Vol.27, No.10. – P.854-857.
285. Yang, W. Performance of different three-dimensional scaffolds for in vivo endochondral bone generation / W. Yang , S.K.Both, G.J. van Osch // *Eur Cell Mater.* - 2014. - Vol. 27 (Jun 10). - P.350-364
286. Ye, G. Application of one stage vacuum sealing drainage combined with bi-pedicle sliding flap transplantation for open tibiofibular fracture and soft tissue

- defects of the lower leg / G. Ye, G. Fu, J. Qi // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* - 2015. – Vol. 29, No.8. - P.955-958.
287. Ye, X. Long-lasting hypoglycemic effect of modified FGF-21 analog with polyethylene glycol in type 1 diabetic mice and its systematic toxicity / X. Ye, J. Qi, Q. Wu, D. Yu, S. Li, Y. Wu, D. Li // *Eur J Pharmacol.* – 2016. – Vol.781 (Jun 15). – P.198-208.
288. Yildirim, S. Soft tissue reconstruction of the foot with free rectus abdominis muscle flap: case report / S. Yildirim // *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* - 2009. - Vol. 15, No.5. - P.511-514
289. Zalavras, C.G. Local antibiotic therapy in the treatment of open fractures and osteomyelitis / C.G. Zalavras, M.J. Patzakis, P. Holtom // *Clin Orthop Relat Res.* - 2004. - Vol. 427.- P.86-93.
290. Zalavras, C.G. Management of open fractures / C.G.Zalavras, MJ.Patzakis, P.D.Holtom, R.Sherman // *Infect Dis Clin North Am.* - 2005. - Vol. 19, No.4. - P.915-929
291. Zalavras, C.G. Management of open fractures and subsequent complications / C.G. Zalavras, R.E. Marcus, L.S. Levin, M.J. Patzakis // *J Bone Joint Surg Am.* - 2007. - Vol. 89. - P. 884-895
292. Zalavras, C.G. Open fractures: Evaluation and management / C.G. Zalavras, M.J. Patzakis // *J Am Acad Orthop Surg.* - 2003. - Vol. 11.- P.212-219.
293. Zhang, Q.X. Minimally invasive percutaneous plate osteosynthesis versus open reduction and internal fixation for distal tibial fractures in adults: a meta-analysis / Q.X. Zhang, F.Q. Gao, W. Sun, Y.T. Wang, Y.R. Yang, Z.Li // *Zhongguo Gu Shang.* – 2015. – Vol.28, No.8. – P.757-762.
294. Zhou, Q.I. The promotional effect of mesenchymal stem cell homing on bone tissue regeneration / Q.I. Zhou , C.Yang, P.Yang // *Curr Stem Cell Res Ther.* - 2015, Feb 11. - [Epub ahead of print], PMID: 25670062.