

На правах рукописи

Искалиев Евгений Айдарханович

**СТИМУЛЯЦИЯ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА С
ПРИМЕНЕНИЕМ КОЛЛАПАНА-Л И ТИМОГЕНА У КРЫС**

4.2.1. Патология животных, морфология, физиология,
фармакология и токсикология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена на кафедре внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Костромская государственная сельскохозяйственная академия» (ФГБОУ ВО «Костромская ГСХА»)

Научный руководитель – Решетняк Владимир Вячеславович,
кандидат ветеринарных наук, доцент.

Официальные оппоненты: Шакирова Фаина Владимировна,
доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана», профессор кафедры хирургии, акушерства и патологии мелких животных;

Чернигова Светлана Владимировна,
доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина», профессор кафедры диагностики, внутренних незаразных болезней, фармакологии, хирургии и акушерства.

Ведущая организация – ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина».

Защита диссертации состоится «30» ноября 2023 года в 11.00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.034.02 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д.5, тел. (812) 388-36-31

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д. 5, и на официальном сайте <https://spbguvvm.ru>

Автореферат разослан «___»_____2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета

Хватов Виктор Александрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Ветеринарные хирурги наиболее часто регистрируют патологии, связанные с нарушениями опорно-двигательного аппарата, особенно среди мелких домашних животных. С каждым годом количество таких случаев увеличивается. Так, по данным Ватникова, Ю. А., 2004; Леоновой, С. В., 2006; Сахно, Н. В., 2012; Бочкарева, В. В., 2016 на долю травм конечностей приходится около 10 – 12% от общего числа хирургических заболеваний.

К настоящему времени накоплен достаточно большой объем способов их лечения. Однако несмотря на изученность данной проблемы и большое разнообразие препаратов, применяемых для стимуляции остеогенеза после остеосинтеза, нередко регистрируют замедленное сращение костных отломков, формирование ложных суставов (Дочилова, Е. С., 2015; Бочкарев, В. В., 2016; Ходжанов, И. Ю., 2021).

В последнее время в ветеринарной хирургии при лечении переломов костей формируются два новых перспективных направления, первое из которых основано на применении биокompозитных материалов для замещения костных дефектов и стимуляции процессов репаративной регенерации тканевой структуры, второе – на использовании препаратов, обладающих иммуностропным действием (Виденин, В. Н., 2005; Бочкарев, В. В., 2015; Кореньков, А. В., 2015; Кочарян, Е. З., 2016; Берченко, Г. Н., 2017; Петленко, С. В., 2017; Газимагомедов, С. М., 2018; Кесян, Г. А., 2019; Стекольников, А. А., 2018, 2019; Смахтин, М. Ю., 2019, 2020, 2021).

Наиболее широко сведения о них отражены в медицинской литературе (Козлов, Н. А., 2002; Гажев, А. Х., 2011; Кесян, Г. А., 2012; Белохвостикова, Т. С., 2013, 2018; Берченко, Г. Н., 2013, 2017; Петленко, С. В. 2017; Кудрявцева, Т. А., 2019; Смахтин, М. Ю., 2021; Хавинсон, В. Х., 2020, 2021; Богданова, Е. А., 2022), в то время как в области ветеринарии ограничены отдельными сообщениями (Логвинов, И. И., 2011; Сахно, Н. В., 2012; Бочкарев, В. В., 2016; Стекольников, А. А., 2018, 2019). Как правило, в своих работах специалисты описывают практику применения каждого из этих средств в отдельности, а вопрос о сочетанном (комплексном) использовании остается открытым.

Наряду с этим, до настоящего времени нет единого мнения о наиболее оптимальных сроках начала применения биорегулирующей терапии.

Таким образом, поиск новых методов стимуляции остеогенеза на разных его стадиях при оперативной хирургии патологий опорно-двигательного аппарата является весьма актуальным.

Степень разработанности темы. Проблеме стимуляции репаративной регенерации костной ткани посвящено много сообщений (Леонова, С. В., 2006; Логвинов, И. И., 2011; Котомцев, В. В., 2012; Сахно, Н. В., 2012; Мечов, М. П., 2015; Бочкарев, В. В., 2016; Вишневикий, А. А., 2016; Анастасиева, Е. А., 2017; Добринская, М. Н., 2018; Усачев, В. А., 2019; Предеин, Ю. А., 2019; Коробейникова, Д. А., 2020; Кормилина, А. Р., 2021; Смахтин, М. Ю., 2021). Несмотря на изученность данной проблемы и большое разнообразие

препаратов, применяемых для стимуляции остеогенеза после остеосинтеза, нередко регистрируют замедленное сращение костных отломков, формирование ложных суставов (Бочкарев, В. В., 2016; Ходжанов, И. Ю., 2021).

Для стимуляции остеогенеза в ортопедии чаще всего используют биокомпозиционные материалы на основе фосфатов кальция. К ним относят гидроксипатит, трикальцийфосфат и др. (Берченко, Г. Н., 2006, 2009, 2017; Бочкарев, В. В., 2015, 2016; Попова, А. А., 2017; Земскова, Л. А., 2020; Богданова, Е. А., 2022; Rohanizadeh R., 2010; Campion C., 2011; Jing W., 2015; Fernandes Patricio TM., 2020; Bal Z., 2021; Tateiwa D., 2021). В последнее время многие исследователи отдают предпочтение отечественному препарату – коллапану, состоящего из гидроксипатита, коллагена и антибиотика (Берченко, Г. Н., 2006, 2009, 2017; Кореньков, А. В., 2015; Кочарян, Е. З., 2016; Газимагомедов, С. М., 2018; Кесян, Г. А., 2019; Решетняк, В. В., 2021;). С этой целью в практике стали применять и некоторые иммуностимулирующие препараты – тимоген, тималин, Т-активин и др. (Петленко, С. В., 2017; Смахтин, М. Ю., 2019, 2020, 2021; Стекольников, А. А., 2018, 2019).

В связи с этим поиск новых средств и способов повышения терапевтической эффективности течения процессов костной регенерации – актуальный вопрос настоящего времени.

С учетом вышеизложенного перед нами стояла цель:

Цель исследований – определить влияние отдельного и комбинированного применения коллапана-Л и тимогена для стимуляции репаративного остеогенеза при лечении экспериментальных переломов трубчатых костей у крыс.

Для реализации цели исследований были определены следующие **задачи**:

1. представить динамику морфологических и биохимических показателей крови экспериментальных животных при стимуляции репаративного остеогенеза коллапаном-Л, тимогеном и их комбинациями;

2. на основании рентгенографических исследований изучить особенности стадийности формирования костной мозоли в зоне перелома на фоне стимуляции репаративного остеогенеза;

3. показать сравнительный анализ морфологической структуры костной мозоли в контрольной и подопытных группах;

4. определить влияние коллапана-Л, тимогена и их комбинаций на прочность костной ткани интактной и оперированной бедренной кости;

5. дать сравнительную оценку разработанных нами способов стимуляции репаративного остеогенеза, основанных на применении коллапана-Л, тимогена и их комбинаций, в зависимости от сроков начала биокорректирующей терапии.

Научная новизна полученных результатов. Впервые изучена эффективность отдельного и комбинированного применения коллапана-Л и тимогена с целью стимуляции репаративного остеогенеза при лечении экспериментальных переломов трубчатых костей у крыс.

Нами определены морфологические и биохимические показатели крови при экспериментальном переломе трубчатых костей у беспородных белых крыс на фоне стимуляции репаративного остеогенеза коллапаном-Л, тимогеном и их комбинациями.

Дана комплексная (морфо-биохимическая, рентгенологическая и гистологическая) оценка общего состояния организма животного и процессов репаративной регенерации костной ткани на фоне стимуляции остеогенеза.

Впервые определена прочность кости на разрыв при переломе бедренной кости на фоне применения препаратов и их комбинаций.

Представлены нами оптимальные сроки начала биокорректирующей терапии в экспериментальных условиях при переломе бедренной кости у крыс.

На основании рентгенологических, гистологических исследований и данных прочности костной мозоли на разрыв научно обоснована наиболее высокая терапевтическая эффективность комплексного применения коллапана-Л и пятидневного курса тимогена сразу после операции (как стимуляторов репаративной регенерации костной ткани) при лечении экспериментального перелома бедренной кости.

Теоретическая и практическая значимость. Выявлена перспектива и возможность применения сочетания препаратов при лечении переломов трубчатых костей. Предложен и научно обоснован комбинированный метод их лечения при переломах трубчатых костей с использованием биокомпозиционного материала коллапана-Л и иммуностропного препарата тимоген.

Разработан способ лечения открытого перелома трубчатой кости, позволяющий улучшить прочностные характеристики костной мозоли и снизить негативное влияние переломов на организм животного – Патент РФ на изобретение, опубликованный в Бюллетене № 26 16.09.2021г. Результаты исследований могут послужить основой в разработке методов стимуляции репаративного остеогенеза при лечении переломов трубчатых костей у разных видов животных.

Методология и методы исследования. Для достижения поставленной цели и объективной оценки стимуляции репаративного остеогенеза коллапаном-Л, тимогеном и их комбинациями при лечении экспериментальных переломов трубчатых костей у крыс проведен комплекс исследований: гематологических, биохимических, гистологических, рентгенологических, определения устойчивости кости к механическому воздействию (на разрыв). Проведена обработка полученных данных с применением методов математической статистики с использованием программы «Microsoft Office Excel 2010».

Положения, выносимые на защиту:

1. Гематологические, биохимические, рентгенологические и гистологические показатели при экспериментальном переломе бедренной кости на фоне стимуляции репаративного остеогенеза коллапаном - Л, тимогеном в зависимости от их сочетаний и сроков применения;

2. Устойчивость костной мозоли к механическому воздействию на разрыв при различных способах стимуляции репаративного остеогенеза;

3. Сравнительная оценка разработанных схем лечения переломов трубчатых костей у крыс, основанных на стимуляции репаративного остеогенеза коллапаном-Л, тимогеном и их комбинациями.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты исследований доложены и обсуждены на международной научно-практической конференции «Теория и практика клинической биохимии и лабораторной диагностики», посвященной 100-летию кафедры биохимии и физиологии СПбГАВМ, Санкт-Петербург, 2019; Национальной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГАВМ, Санкт-Петербург, 2020; 71-й международной научно-практической конференции ФГБОУ ВО Костромской ГСХА, посвященной 75-летию костромской породы крупного рогатого скота «Актуальные проблемы науки в АПК», Караваево, 2020; X юбилейной международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны», посвященной году науки и технологий, Санкт-Петербург, 2021; Международной научно-практической конференции «Ветеринарная хирургия – сегодня и завтра», посвященной 100-летию кафедры общей и частной хирургии СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 2022; 74-й Всероссийской (национальной) научно-практической конференции ФГБОУ ВО Костромской ГСХА «Современная наука: актуальные вопросы и достижения в эпоху трансформационных процессов», Караваево, 2023.

Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе и научно-исследовательской деятельности на кафедрах ФГБОУ ВО Белгородского ГАУ имени В. Я. Горина, ФГБОУ ВО Верхневолжского ГАУ, ФГБОУ ВО Вятского ГАТУ, ФГБОУ ВО Орловского ГАУ.

Публикации результатов исследования. По теме диссертационной работы опубликовано 15 печатных работ в сборниках материалов всероссийских и международных конференций, центральных журналах и отдельных изданиях, в том числе девять в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ для опубликования основных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук. Патент РФ № 2755513 С1, МПК G09В 23/28, А61В 17/56 (RU2755513 С1)

Личный вклад соискателя. Представленная диссертационная работа – итог шестилетних исследований автора. Диссертант самостоятельно проанализировал научную литературу, определил цели, задачи и составил план работы, провел необходимые экспериментальные операции и послеоперационную реабилитацию подопытных животных, выполнил гематологические, биохимические, гистологические, рентгенологические исследования, определил прочность костной мозоли, а также обобщил, провел анализ и статистическую обработку полученных результатов. Личный вклад соискателя составляет 85%.

Соответствие работы паспорту научной специальности. Работа соответствует паспорту научной специальности 4.2.1. Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология, пунктам 4, 8, 10, 11, 15.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 141 страницах машинописного текста и содержит введение, обзор литературы, главу материалы и методы исследований, а также главы, отражающие результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, практические предложения, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, перечень сокращений и условных обозначений, список использованной литературы, приложения. Иллюстрационный материал диссертации включает 23 рисунка и 8 таблиц. Список использованной литературы состоит из 290 наименований, в том числе 30 иностранных источников.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Работа выполнена в период с 2016 по 2022 гг. на кафедре «Внутренние незаразные болезни, хирургия и акушерство», ветеринарной клинике ФГБОУ ВО «Костромская ГСХА». Биохимические исследования проведены в ветеринарной лаборатории ООО «Веттест» (г. Москва), рентгенологические – ОГБУ Костромская СББЖ, гистологические – лаборатории Центра доклинических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир).

В качестве препаратов использованы: коллапан-Л – из группы биокомпозиционных материалов (производитель ООО «Интермедапатит», Россия, в статьях зашифрован под названием РВИ) и тимоген – иммуностимулирующий синтетический препарат (разработан ЗАО «МБНПК «Цитомед», производитель ООО «Компания «Деко», Россия, в статьях зашифрован под названием РВ-2).

Экспериментальной моделью являлись беспородные белые крысы, подобранные по принципу пар-аналогов с учетом возраста (5 – 6 месяцев) и массы тела (180 – 250 г). Животных контрольных и подопытных групп содержали в виварии ветеринарной клиники ФГБОУ ВО «Костромская ГСХА» в одинаковых зоогигиенических условиях на стандартном пищевом рационе в соответствии с «Европейской директивой 2010/63/ЕС по защите животных, используемых в научных целях» и Международным стандартом ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур»).

Крыс распределяли на шесть групп (контрольную и пять подопытных, n=18 в каждой) и под общей анестезией (золетил 100 в дозе 5 мг/100г живой массы) моделировали поперечный перелом правой бедренной кости, с последующим интрамедуллярным остеосинтезом. Операционную рану ушивали послойно и обрабатывали тетрациклин аэрозоль спреем. Животным

вводили ветбицин-5 в дозе 10 Ед/кг живой массы, обладающим антибактериальным действием.

Крысам контрольной группы коллапан-Л и тимоген не применяли. В 1-й подопытной группе во время остеосинтеза в пространство между концами бедренной кости по линии перелома на 2/3 заполняли гранулами коллапана-Л, во 2-й сразу после операции пятидневным курсом инъецировали тимоген в дозе 10 мкг на 1 кг живой массы; в 3-й инъецировали тимоген в дозе 10 мкг на 1 кг живой массы на пятый день после операции в течение 5 дней; в 4-й использовали совместно коллапан-Л и тимоген в дозе 10 мкг на 1 кг живой массы сразу после операции, в течение 5 дней; в 5-й использовали совместно коллапан-Л и тимоген в дозе 10 мкг на 1 кг живой массы на пятый день после операции в течение 5 дней.

Отбор крови проводили под эфирным наркозом из сердца, для морфологических исследований в пробирки с антикоагулянтом «IMPROMINI с ЭДТА К3» («Guangzhou Improve Medical Instruments Co., Ltd, Китай»), а для биохимических – без антикоагулянта.

Гематологические показатели определяли на автоматическом анализаторе Vet Scan HM5 (компании Awareness Technology, США), а биохимические – на автоматическом анализаторе Catalyst One компании IDEXX.

Рентгенологические исследования до операции, 7, 14, 21, 28 и 45-е сутки после операции проводили на диагностическом переносном аппарате 10Л6–01 системы цифровой радиографии Vita GR (США).

Образцы для гистологических исследований отбирали на 45-е сутки после эвтаназии крыс. Декальцинацию проводили в декальцинирующей жидкости; проводку – в гистопротекторе TLP-720; заливку – на станции для заливки ESD-2800. Срезы толщиной 5-8 мкм готовили на ротационном полуавтоматическом микротоме RMD-3000 с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином по Маллори, по Ван-Гизону в стейнере ALS-96 (ООО «Креоника», Россия). Гистопрепараты исследовали с использованием микроскопа Микмед-6; калибровку измерительной шкалы видеокамеры – объект-микрометра проходящего света ОМП (ЛОМО, Россия); измерение и фотодокументирование – видеокамеры E31S PM и программного обеспечения TourView («Hangzhou Tourtek Photonics Co.,Ltd», Китай).

Прочность костной ткани на разрыв (в ньютонах) определяли на разрывной машине ИР-5046-05. Материал – бедренную кость (интактную и оперированную), отбирали на 45-е сутки после эвтаназии.

Эвтаназию животных осуществляли диоксидом углерода в соответствии с «Европейской директивой 2010/63/ЕС по защите животных, используемых в научных целях».

В работе использовано 108 крыс. Проведено исследований: 1680 – морфологических, 3060 – биохимических; 30 – гистологических, 180 – рентгенологических, 80 – определение прочности костной мозоли на разрыв.

Цифровой материал подвергнут статистической обработке с использованием программы «Microsoft Office Excel 2010», учитывая среднюю

арифметическую и ее ошибку ($M \pm m$), а также критерий достоверности по Стьюденту.

2.2 Результаты исследований

2.2.1 Влияние коллапана-Л, тимогена и их комбинаций на гематологические показатели крыс

Гематологические показатели у животных всех групп на протяжении опыта находились в пределах физиологической нормы.

На 7-е сутки после операции у крыс контрольной, 1, 2, 3 и 5-й подопытных групп (исключая 4-ю), регистрировали незначительное снижение количества эритроцитов (на 3,75; 1,27; 2,56; 12,20; 7,50%, соответственно), уровня гемоглобина и гематокрита на 2,03; 3,97; 1,96; 4,52; 4,12; 3,33% и на 5,19; 4,04; 0,46; 14,26; 5,57; 5,24%, соответственно. Вероятно, это могло быть обусловлено кровопотерями во время хирургического вмешательства.

На 14-е сутки динамика показателей крови носила разнонаправленный характер, в то время как на 21-е количество эритроцитов не имело существенных различий с исходными, при незначительном превышении на 2,60 и 3,70% во 2-й и 3-й подопытных группах, обработанных тимогеном. В то же время превышали исходные показатели количество гемоглобина, среднего его содержания и концентрации в эритроцитах, а также ширина распределения популяций и наоборот, на фоне более низкого уровня гематокрита и среднего объема эритроцитов (кроме 1-й подопытной).

На ранних стадиях остеогенеза в первую и вторую фазу формирования костной мозоли у крыс 1, 2, 3 и 5-й подопытных групп выявлено увеличение уровня лейкоцитов, абсолютного числа лимфоцитов и гранулоцитов, но на фоне снижения данных показателей в 4-й, где использована комбинация коллапана-Л и тимогена сразу после операции. Такая динамика, вероятно, обусловлена воспалительной реакцией, протекающей в первую и вторую фазы заживления костной ткани.

В последующие сроки действия препаратов носили разнонаправленный характер.

Сравнивая заключительные данные опытов следует отметить, что показатели абсолютного числа лейкоцитов, лимфоцитов и гранулоцитов от исходного уровня в контрольной группе достигали 91,20; 84,30 и 89,50%, в 1-й – 87,04; 91,78 и 80,65%, во 2-й – 113,40; 113,20 и 79,40%, в 3-й – 105,30; 103,20 и 75,00%, в 4-й – 71,64; 64,00; 96,67%, в 5-й – 121,10; 102,90; 200,00%, соответственно. Наиболее существенные изменения регистрировали в отношении клеток MID увеличение которых в контрольной, 2-й и 3-й подопытных группах, где применяли тимоген сразу и на пятый день после операции составило в 2,5; 7 и 3,8 раза, и, наоборот, уменьшение в 1, 4 и 5-й подопытных в 2; 1,33 и 2,5 раза

Таким образом, динамика гематологических показателей свидетельствует о том, что применение коллапана-Л или его комбинации с пятидневным курсом

тимогена сразу после операции (1-я и 4-я подопытные) в большей степени проявляет тенденцию к их нормализации.

2.2.2 Влияние коллапана-Л, тимогена и их комбинаций на биохимические показатели крови крыс

На 7-е сутки во всех группах по сравнению с исходными показателями отмечали повышение концентрации общего белка на 22,90; 5,30; 13,50; 24,40; 10,50 и 19,30%, соответственно.

Аналогичную динамику отмечали и на 14-е и 21-е, с некоторым снижением на 28-е сутки по сравнению с исходными данными.

Следует отметить, что протеинемия была обусловлена глобулинемией в то время как уровень альбуминов на всех этапах эксперимента не претерпевал ярко выраженных изменений на протяжении всего периода эксперимента.

На 45-е сутки в 3, 1 и 5-й подопытных и контрольной группах регистрировали наиболее высокий уровень общего белка по отношению к исходно содержащему: на 30,65; 20,68; 17,89 и 16,02% выше, на фоне более низкого показателя во 2-й и 4-й группах превышающего лишь на 13,04 и 12,64%, соответственно.

На 7-е сутки уровень концентрации мочевины в контроле, 4-й и 5-й (при сочетании препаратов) увеличилась на 6,50; 2,60 и 7,50% по сравнению с исходными данными, в то время как в 1, 2 и 3-й подопытных группах отмечали снижение на 28,00; 3,10 и 5,70%, соответственно.

Можно предположить, что данные в период с седьмых суток по 14-е и 21-е указывает на то, что комбинированное применение коллапана-Л и тимогена по схемам 4-й и 5-й подопытных групп способствует усилению метаболических процессов по сравнению с контролем (снижение показателя в 4-й, 5-й и контрольной группах относительно предыдущих значений на 14,24; 35,63 и 9,11%, соответственно). В то же время в 1, 2 и 3-й подопытных группах установлено увеличение концентрации мочевины в 1,65; 1,49; 1,77 раза, соответственно.

Динамика креатинина носила разнонаправленный характер. Так, на 7-е сутки отмечали его снижение относительно исходного в контроле – на 6,90%, а также в 1-й подопытной группе, где применяли коллапан-Л – на 9,40%, и наоборот, увеличение во 2, 3, 4 и 5-й подопытных на 3,60; 5,20; 25,60 и 39,00%, соответственно. На 14-е сутки в 1, 2, 3 и 4-й подопытных группах регистрировали его повышение по сравнению с фоновыми на 22,95; 23,37; 33,37 и 34,60%. Необходимо подчеркнуть, что в контрольной и в 5-й подопытной группах повышение концентрации креатинина отмечалось только на 21-е сутки, с максимальным значением на 28-е – на 48,67 и 67,24%, соответственно.

Операция во всех группах сопровождалась выраженной гипергликемией.

На 7-е сутки у крыс контрольной 1, 3, 4 и 5-й подопытных групп регистрировали понижение активности AST по сравнению с исходными на 33,45; 18,84; 7,69; 10,69 и 38,32% и повышение на 4,36% во 2-й подопытной.

Динамика ALT носила более выраженный разнонаправленный характер при повышении ее активности в контрольной, 1-й и 2-й подопытных на 6,21; 30,18 и 9,61% и снижение в 3, 4 и 5-й подопытных на 23,80; 15,31 и 54,46%, соответственно.

На заключительном этапе опыта на 45-е сутки активность AST во всех группах была ниже фоновых показателей, особенно во 2-й и 3-й подопытных группах, где применяли тимоген на 87,41 и 78,18%, в меньшей степени – в контрольной, 1, 4 и 5-й – 67,41; 55,90; 67,07; 51,10%, соответственно. Рост активности ALT отмечали в контрольной, 1-й и 4-й подопытных группах на 4,05; 23,09 и 30,90%, снижение – во 2, 3 и 5-й на 3,79, 3,49 и 51,69%, соответственно.

Известно, что щелочная фосфатаза относится к группе маркеров костного метаболизма, отражающих процесс остеорегенерации (Добринская М.Н., 2018).

На 7-е сутки после операции отмечали рост ее активности в контрольной группе на 5,72% на фоне снижения в 1, 2, 3, 4 и 5-й подопытных на 11,68; 12,16; 7,04; 6,79; 18,89%, соответственно. И наоборот, к концу эксперимента на 45-е сутки активность во всех группах превышала исходные данные.

Можно предположить, что показатели соотношения за 21 и 28-е сутки к 14-м могут служить ориентировочным критерием определения эффективности лечения и прогноза формирования костной ткани, о чем свидетельствуют данные рисунка 1.

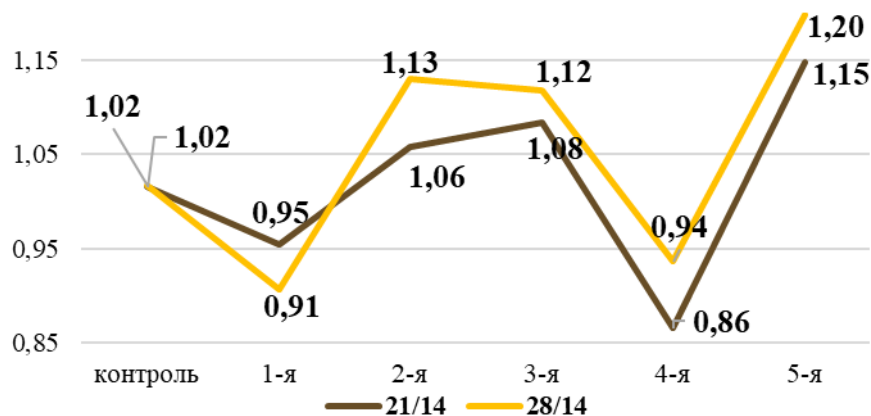


Рисунок 1 – Соотношения щелочной фосфатазы за 21 и 28-е сутки к 14-м после операции

Так, значения ниже единицы в 1-й и 4-й подопытных группах свидетельствуют об активном процессе репаративной регенерации костной ткани, выше во 2, 3 и 5-й – о менее интенсивном заживлении и формировании костной мозоли. Контрольная группа занимает промежуточное место.

Данное предположение согласуется с результатами рентгенологических, гистологических исследований и определения прочности костной мозоли на разрыв.

Уровень общего билирубина у животных на протяжении всего периода наблюдений был выше фоновых значений, превосходя их на 45-е сутки в контрольной, 1, 2, 3, 4 и 5-й подопытных группах в 2,86; 1,46; 1,46; 1,34; 1,77 и 2,62 раза, соответственно.

Концентрация кальция на 7-е сутки превышала исходные показатели в контрольной, 3, 4, и 5-й подопытных группах на 0,44; 8,21; 5,56 и 10,42%, были ниже в 1-й и 2-й на 14,04 и 6,61%, соответственно.

На 14-е и 21-е регистрировали увеличение уровня кальция во всех группах на 1,78; 6,81; 14,10; 23,08; 3,70% (исключая 5-ю подопытную) и 15,56; 11,06; 18,06; 32,82; 14,35; 2,08%, на фоне снижения на 28-е сутки (исключая 4-ю), к концу эксперимента превышающий исходный.

Динамика фосфора носила разнонаправленный характер и в группах на протяжении всего времени наблюдений была выше фоновых значений. Наиболее существенные изменения в сторону повышения уровня его содержания регистрировали: раньше всех на 7-е сутки в 4-й и 5-й подопытных группах в 1,96 и 2,55 раза, несколько позже на 14-е – контрольной и 3-й в 1,63 и 1,69 раза, на 28-е – 1-й и 2-й подопытных в 1,30 и 1,38 раза с последующим снижением к концу опыта в группах, за исключением групп где применяли комбинацию препаратов.

В качестве маркера костного метаболизма можно использовать отношение абсолютных показателей концентрации кальция и фосфора на 45-е сутки после операции (рисунок 2). Установлено, что его значение меньше 1,5 ед в 4-й и 1-й подопытных и контрольной группах. – 1,40; 1,48; 1,49 свидетельствовали об интенсивном процессе формировании костной мозоли, выше 1,6 ед. – о медленном процессе репаративной регенерации. Данное предположение, как и при щелочной фосфатазе было подтверждено другими методами исследований.

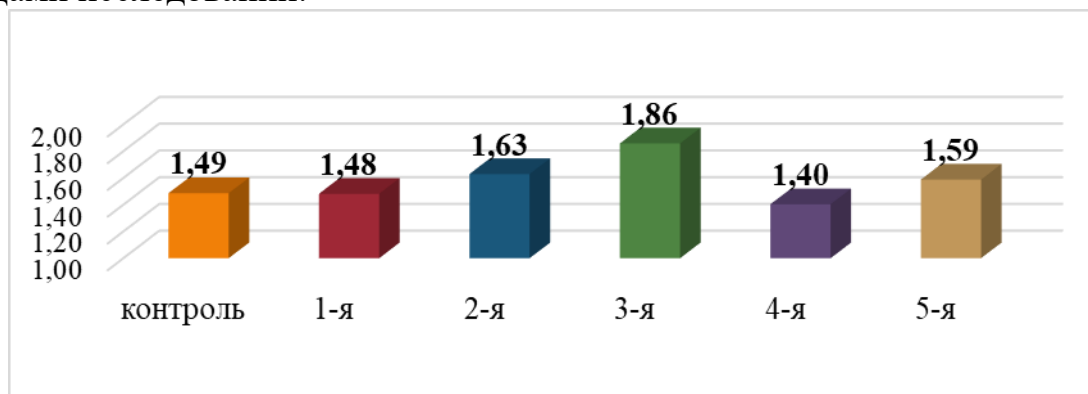


Рисунок 2 – Соотношение концентрации кальция к фосфору на 45-е сутки после операции

Можно предположить, что положительная динамика данной группы макроэлементов обусловлена повышением метаболических процессов в тканях.

2.2.3 Результаты рентгенологического исследования

Установлено, что сразу после операции у животных всех групп прослеживалась линия простого поперечного перелома тела кости, отломки которой были иммобилизованы внутрикостными штифтами.

На 7-е сутки, признаки консолидации отсутствовали при четкой визуализации линии перелома.

Данные рентгенограмм 2 и 3-й недель после операции показали, что контуры отломков сохраняли прерывистость. Одновременно с этим на 14-е

сутки регистрировали наличие периостальной краевой регенеративной реакции в группах, в которых использовали коллапан-Л и его сочетание с тимогеном в день операции и на 5-й после (1, 4 и 5-й подопытных, соответственно). В то время как в контрольной, также 2 и 3-й подопытных подобную картину наблюдали на неделю позже.

На 28-е сутки на рентгенограммах по сравнению с предыдущим периодом исследования существенных различий не обнаружено.

Результаты, полученные на 45-е сутки эксперимента, представлены на рисунке 3.

При рентгенологическом исследовании у крыс во всех группах отмечали сформированную периостальную мозоль веретенообразной формы с неоднородной структурой, что проявлялось различной рентгеноконтрастностью, обусловленной процессом ремоделирования вторичной мозоли в костную ткань. При этом у животных контрольной группы и 1-й подопытной на рентгеновских снимках между отломками кости прослеживалась линия перелома. Во 2, 3 и 5-й подопытных она имела более выраженный характер, а в 4-й группе, где применяли комбинацию препаратов коллапана-Л и тимогена сразу после операции, была едва заметна.

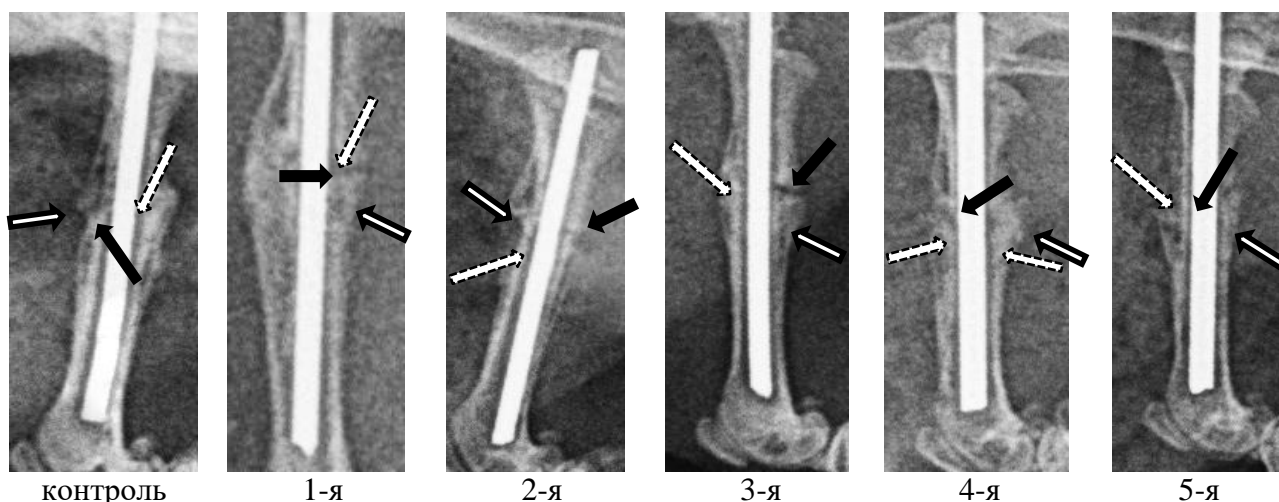


Рисунок 3 – Рентгенограмма бедренной кости крыс на 45-е сутки после перелома

Примечание: ↑ – линия перелома; ⇨ – формирование пластинчатой кости; ↑ – костная мозоль)

Таким образом, на основании рентгенологических исследований можно констатировать, что наиболее интенсивно процессы репаративного остеогенеза протекали в 4-й подопытной группе, где было использовано сочетание коллапана-Л с пятидневным курсом тимогена сразу после операции, в меньшей степени в 1-й – только коллапана-Л. У животных указанных групп созревание и начало процессов ремоделирования костной мозоли отмечали раньше, чем у других.

2.2.4 Гистологические исследования костной мозоли

У животных контрольной группы в области контакта отломков костей сформирована костная мозоль, представленная оформленной грубоволокнистой

соединительной тканью (рисунок 4). На границе контакта костных отломков обнаружены хаотично ориентированные костные пластинки, с большим количеством фибробластов на их поверхности.

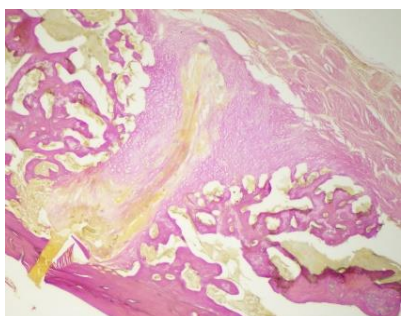


Рисунок 4 – Формирование костной мозоли, окр. по Ван-Гизону. Ув. х40

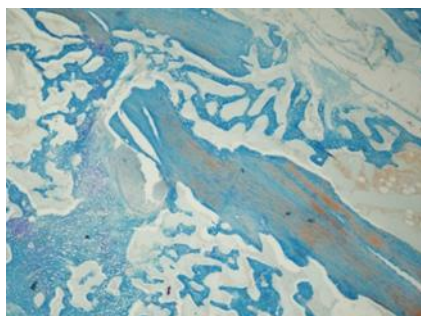


Рисунок 5 – Формирование костной мозоли, окр. по Маллори. Ув.х40



Рисунок 6 – Структуры костной мозоли, окр. по Маллори. Ув.х40

В 1-й подопытной группе костная мозоль отличалась менее выраженной морфологической структурой (рисунок 5). Интермедиарная зона состояла из пучков крупноячеистой губчатой костной ткани. Костномозговая полость в зоне сращения заполнена миелоидным костным мозгом с артериями разного калибра. У животных данной группы установлено менее интенсивное формирование молодых костных пластинок, при этом доля костной ткани в месте дефекта была достоверно ниже ($P < 0,05$) и составляла $42,43 \pm 3,62\%$,

Во 2-й подопытной группе костная мозоль представлена плотной оформленной волокнистой соединительной тканью. В области совмещения отломков костей – единичные беспорядочно ориентированные костные пластинки (рисунок 6). Отмечена более низкая доля костной ткани по сравнению с контролем ($44,60 \pm 2,96$), а доля соединительной была выше ($38,94 \pm 2,92$ ($P < 0,05$)).

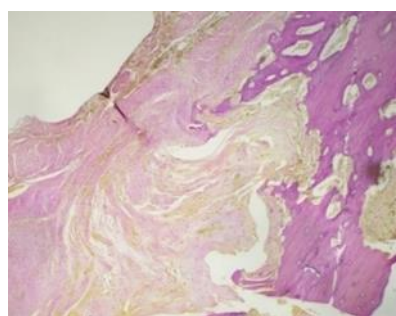


Рисунок 7 – Костная мозоль, окр. по Ван-Гизону. Ув.х40

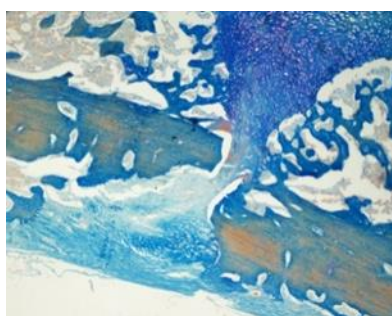


Рисунок 8 – Кость, окр. по Маллори. Ув.х40

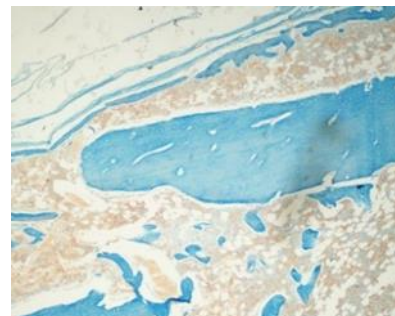


Рисунок 9 – Костная мозоль, окр. по Маллори. Ув. х40

В 3-й подопытной группе костная мозоль хорошо выражена. Преобладание грубоволокнистой соединительной ткани демонстрирует менее интенсивные фуксинофильные свойства при окрашивании по Ван-Гизону, что свидетельствует о более рыхлом расположении волокон (рисунок 7). В хрящевой мозоли хондроциты расположены редко, с преобладанием

базофильного межклеточного вещества. На периферии хрящевой мозоли формируются костные пластинки, имеющие незрелый характер.

В 4-й подопытной группе отмечена хорошо сформированная грубоволокнистая соединительнотканная мозоль. Соединительная ткань окрашена более интенсивно, что указывает на более плотное расположение волокон в костной мозоли. В ее толщине отмечено наличие очагово расположенной хрящевой ткани, которая коммутировала между собой костные отломки (рисунок 8). На периферии хрящевая мозоль подвергалась энхондральной оссификации с замещением грубоволокнистыми костными трабекулами с элементами появления пластинчатой костной ткани с гаверсовыми каналами в центре. Доля костной ткани увеличена до $60,21 \pm 2,62\%$, что достоверно превышает аналогичный показатель как контрольной группы на $4,90\%$, так и всех подопытных групп: 1-й на $17,78\%$; 2-й – $15,61\%$; 3-й на $19,57\%$; 5-й – $27,10\%$ ($P < 0,05$). Низкое содержание соединительной ткани и высокая доля костной ткани свидетельствуют о более активно протекающих процессах остеогенеза и репаративной регенерации в сравнении с другими группами.

В 5-й подопытной группе – костная мозоль выражена незначительно, с периферии представлена рыхло расположенными пучками грубоволокнистой соединительной ткани, с различимыми в глубине островками хрящевой (рисунок 9). В периостальной зоне – зачатки костных трабекул, образующиеся путем замещения ретикулофиброзной ткани. Содержание объемной доли костной ткани было самое низкое из всех представленных групп и составило $33,11 \pm 2,14$.

2.2.5 Результаты исследования прочности костной

Оценку результатов опытов по определению устойчивости кости к механическому воздействию на разрыв учитывали в виде процентного отношения нагрузки, которую выдерживала кость больной (после операции) конечности к нагрузке интактной (здоровой), выраженной в процентах и по отношению показателей подопытных групп к контролю. Полученные результаты представлены на рисунках 10 и 11.

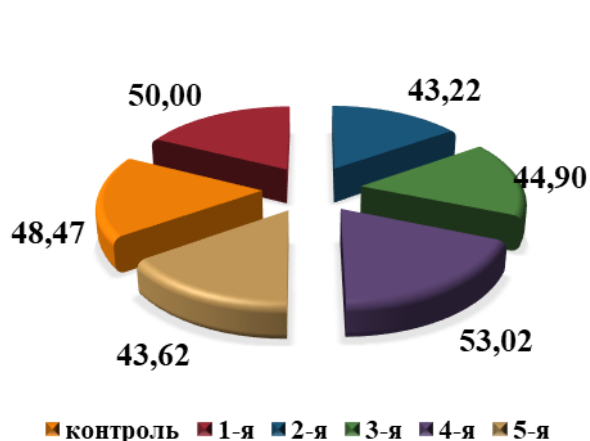


Рисунок 10 – Предельная нагрузка больной кости к здоровой, %

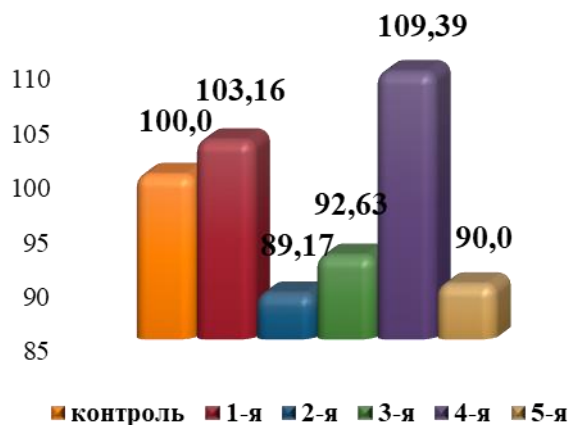


Рисунок 11 – Предельная нагрузка костной ткани по отношению к контролю, %

Данный способ позволяет полностью соблюсти принцип аналогов, нивелировать индивидуальные особенности организма и более достоверно определить прочность кости к механическим нагрузкам.

Таким образом, только в двух подопытных группах – 1-й (обработанных коллапаном-Л) и 4-й (обработанных коллапаном-Л с пятидневным курсом тимогена, начиная сразу после операции) показатели нагрузки конечности к здоровой превышали контрольную, 50,00 и 53,02% против 48,47%. При этом показатели прочности костной мозоли в указанных группах были выше контрольной на 3,16 и 9,39%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований на основании морфо-биохимических, рентгенологических, гистологических исследований и данных прочности костной мозоли на разрыв была установлена наиболее эффективная схема применения препаратов при лечении переломов трубчатой кости у крыс, способствующая более выраженным процессам остеогенеза и повышению прочности костной мозоли к механическому воздействию. Это доказано на примере лечения крыс 4-й подопытной группы, где использовали коллапан-Л и тимоген в дозе 10 мкг на 1 кг живой массы, сразу после операции, курсом пять дней. Подводя итоги данного исследования, мы сделали следующие выводы:

1. Картина крови на 7-е сутки у крыс всех групп характеризовалась снижением числа эритроцитов, гематокрита, гемоглобина на фоне повышения ширины распределения популяций, среднего содержания и концентрации гемоглобина в эритроците; лейко-, лимфо- и гранулоцитозом, кроме 4-й подопытной. На 21-сутки у крыс всех групп показатели эритроцитарного профиля были близки к исходным, в лейкоцитарном отмечали: лейко- и лимфоцитопению (контрольная, 1, 4-я подопытные группы), лейко- и лимфоцитоз (во 2, 3 и 5-й), гранулоцитопению (кроме 5-й), уменьшение клеток MID (1, 4 и 5-я) и их увеличение (контрольная, 2 и 3-я).

2. Динамика показателей белкового, ферментного, минерального, пигментного обменов у крыс всех групп носила однонаправленный характер, проявляя тенденцию к увеличению на 45-е сутки общего белка, глобулина, мочевины, ALT, ALP, глюкозы, билирубина, кальция, фосфора, натрия, калия и уменьшению альбумина, креатинина, AST.

3. Результаты рентгенологического исследования указывают на более интенсивные процессы формирования костной мозоли (созревание и ремоделирование) у крыс в 4-й подопытной группе, где применяли коллапан-Л в сочетании с пятидневным курсом тимогена сразу после операции, в меньшей степени в 1-й подопытной на фоне использования коллапана-Л.

4. Сравнительный анализ гистологических исследований выявил, что сочетание коллапана-Л на фоне пятидневного курса тимогена сразу после операции оказывает наиболее выраженное стимулирующее действие на репаративный остеогенез у крыс. Так, доля образованной костной ткани в

местах совмещения отломков на 45-е сутки составила 60,21%, что достоверно превышает показатели контрольной группы на 4,90% и подопытных: 1-й на 15,61%; 2-й – 17,78%; 3-й на 19,57; 5-й – 27,10%.

5. Анализ установленных биомеханических параметров показал, что костная мозоль бедренной кости крыс на 45-е сутки на фоне применения коллапана-Л в сочетании с пятидневным курсом тимогена сразу после операции превосходит по прочностным характеристикам показатели контрольной группы на 9,39%.

6. Наиболее эффективная схема стимуляции у подопытных животных репаративного остеогенеза при лечении переломов трубчатых костей, основана на применении коллапана-Л в сочетании с пятидневным курсом тимогена сразу после операции внутримышечно в дозе 10 мкг на 1 кг живой массы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Полученные экспериментальные данные расширяют представление о гематологических, биохимических, рентгенологических, гистологических показателях и устойчивости костной мозоли к механическому воздействию у крыс при переломе трубчатой кости на фоне применения биокомпозиционного материала коллапана-Л и иммунокорректора тимогена.

Разработанный способ лечения открытого перелома трубчатой кости в эксперименте (Патент РФ № 2755513 С1, МПК G09В 23/28, А61В 17/56, RU2755513С1), основанный на стимуляции репаративного остеогенеза коллапаном-Л и тимогеном сразу после операции пятидневным курсом в дозе 10 мкг на 1 кг живой массы, рекомендуем использовать при лечении переломов трубчатых костей.

РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные диссертационной работы показали перспективность сочетанного применения коллапана-Л и тимогена в ветеринарной практике при лечении переломов трубчатых костей у крыс и могут послужить основой при разработке новых методов стимуляции репаративного остеогенеза у других видов животных

Материалы диссертации рекомендуем использовать в учебном процессе студентов высших и среднеспециальных учебных заведений ветеринарного профиля, а также при написании учебных материалов, статей, справочников и др.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ для публикации материалов диссертационных работ:

1. Стекольников, А. А. Динамика белой крови при переломах бедренной кости у крыс на фоне применения иммуномодулятора РВ-2 и биокомпозиционного материала РВИ / А. А. Стекольников, В. В. Решетняк, В. В. Бурдейный, Е. А. Искалиев // *Международный вестник ветеринарии*. – 2019. – № 4. – С. 147-152.

2. Стекольников, А. А. Динамика красной крови при переломах бедренной кости у крыс на фоне применения иммуномодулятора РВ-2 и биокомпозиционного материала РВИ / А. А. Стекольников, В. В. Решетняк, В. В. Бурдейный, Е. А. Искалиев // *Международный вестник ветеринарии*. – 2019. – № 1. – С. 128-132.

3. Стекольников, А. А. Гематологические показатели крыс при автоматизированном анализе и микроскопическом методе / А. А. Стекольников, В. В. Решетняк, В. В. Бурдейный, Е. А. Искалиев // *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. – 2019. – № 76. – С. 185-189. – DOI 10.21515/1999-1703-76-185-189.

4. Стекольников, А. А. Биохимические показатели крови беспородных крыс / А. А. Стекольников, В. В. Решетняк, В. В. Бурдейный, Е. А. Искалиев // *Международный вестник ветеринарии*. – 2020. – № 3. – С. 163-168. – DOI 10.17238/issn2072-2419.2020.3.163.

5. Репаративный гистогенез костной ткани при переломах бедренной кости у крыс при использовании биокомпозиционного материала на фоне иммунокоррекции / В. В. Решетняк, В. В. Бурдейный, В. В. Пронин, Е. А. Искалиев // *Ветеринария сегодня*. – 2021. – № 3(37). – С. 248-253. – DOI 10.29326/2304-196X-2021-3-38-248-253.

6. Стекольников, А. А. Особенности метаболизма у крыс при переломах бедренной кости на фоне иммунокоррекции и применения биокомпозиционного материала. Сообщение 1. Динамика показателей белкового, азотистого и углеводного обменов / А. А. Стекольников, В. В. Решетняк, В. В. Бурдейный, Е. А. Искалиев // *Международный вестник ветеринарии*. – 2021. – № 1. – С. 178-186.

7. Решетняк, В. В. Особенности метаболизма у крыс при переломах бедренной кости на фоне иммунокоррекции и применения биокомпозиционного материала. Сообщение 2. Динамика показателей ферментного и минерального обменов / В. В. Решетняк, В. В. Бурдейный, А. А. Стекольников, Е. А. Искалиев // *Международный вестник ветеринарии*. – 2021. – № 1. – С. 187-196.

8. Искалиев, Е. А. Клинико-экспериментальное обоснование применения коллапана-Л и тимогена, их сочетаний при лечении переломов трубчатых

костей у белых крыс / Е. А. Искалиев // Международный вестник ветеринарии. – 2022. – № 3. – С. 285-289. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2022.3.285.

9. Искалиев Е.А. Консолидация экспериментальных переломов при интрамедуллярном остеосинтезе у крыс при использовании Коллапана-Л и Тимогена / Е. А. Искалиев, А. А. Стекольников, В. В. Решетняк, В. В. Бурдейный // Международный вестник ветеринарии. – 2023. – № 2. – С. 350-359. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2023.2.350.

Основные публикации в журналах, сборниках и материалах конференций:

10. Стекольников, А. А. Перелом бедренной кости у крыс и гематологические показатели / А. А. Стекольников, В. В. Решетняк, В. В. Бурдейный, Е. А. Искалиев // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: сборник научных трудов № 150. – Санкт-Петербург: СПбГАВМ, 2019. – С. 49-53.

11. Искалиев, Е. А. Динамика гематологических показателей при интрамедуллярном остеосинтезе бедренной кости у крыс на фоне применения препаратов РВИ И РВ-2 / Е. А. Искалиев, В. В. Решетняк, В. В. Бурдейный // Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе: Сборник статей 71-й международной научно-практической конференции. В 3-х томах, Караваево, 23 января 2020 года / Под редакцией Т.В. Головковой, Н.Ю. Парамоновой. – Караваево: Костромская ГСХА, 2020. – С. 140-145.

12. Стекольников, А. А. Травматизм мелких домашних животных в городе Кострома / А. А. Стекольников, Е. А. Искалиев, В. В. Решетняк, В. В. Бурдейный // Материалы национальной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГАВМ, Санкт-Петербург, 28–31 января 2020 года. – Санкт-Петербург: СПбГАВМ, 2020. – С. 104-106.

13. Решетняк, В. В. Динамика маркеров метаболических процессов костной ткани на фоне стимуляции остеорегенерации при переломах трубчатых костей у крыс / В. В. Решетняк, В. В. Бурдейный, Е. А. Искалиев // Аграрный вестник Нечерноземья. – 2021. – № 2(2). – С. 12-17. – DOI 10.52025/2712-8679_2021_02_12.

14. Искалиев Е.А. Определение прочности трубчатой кости на фоне применения коллапана-Л и тимогена / Е.А. Искалиев, В.В. Решетняк, В.В. Бурдейный // Материалы X юбилейной международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны», посвященной году науки и технологий. – Санкт-Петербург: СПбГАВМ, 2021. – С. 144 – 145.

Патент на изобретение

15. Патент № 2755513 С1 Российская Федерация, МПК G09В 23/28, А61В 17/56. Способ лечения открытого перелома трубчатой кости в эксперименте: № 2020137958: заявл. 18.11.2020: опубл. 16.09.2021 / В. В. Решетняк, Е. А.

Искалиев, В. В. Бурдейный, Н. М. Попов; заявитель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Костромская государственная сельскохозяйственная академия".