

## Лечение открытых переломов с помощью метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов

В.А. Копылов, В.А. Миханов, А.А. Сафронов

ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России, г. Оренбург

## Treatment of open fractures using *Bacillus subtilis* 804 metabolites containing the fibroblast growth factor

V.A. Kopylov, V.A. Mikhanov, A.A. Safronov

SBEI HPE The Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

**Цель.** Усовершенствовать методы лечения открытых переломов с помощью локального стимулирующего воздействия на остеогенез метаболитами *Bacillus subtilis* 804, содержащими фактор роста фибробластов. **Материалы и методы.** В работе мы использовали модель открытого перелома бедра. Через доступ 1 см 112 крысам была выполнена остеотомия средней трети бедра с последующим интрамедуллярным остеосинтезом спицей. 56 крысам опытной группы в область перелома вводилось 0,2 мл метаболитов *Bacillus subtilis* 804, 56 животным группы контроля было введено 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Выполнялись клинические наблюдения и гистологические исследования. **Результаты и заключение.** Обнаружено, что метаболиты *Bacillus subtilis* 804 обладают стимулирующим действием на репаративный остеогенез и ускоряют консолидацию переломов в эксперименте.

**Ключевые слова:** открытый перелом, фактор роста фибробластов, остеогенез.

**Purpose.** To improve the methods of treatment of open fractures by local stimulating impacting osteogenesis with *Bacillus subtilis* 804 metabolites containing the fibroblast growth factor. **Materials and methods.** In their work the authors used a model of open femoral fracture. They performed osteotomy of the middle femoral third via 1-cm approach with further intramedullary osteosynthesis using a wire in 112 rats. They infused 0.2 ml of *Bacillus subtilis* 804 metabolites into the fracture zone of 56 rats of the experimental group, 0.2 ml of 0.9% sodium chloride solution – into the fracture zone of 56 rats of the control group. Clinical observations and histological investigations performed. **Results and conclusion.** As it was found, *Bacillus subtilis* 804 metabolites possessed a stimulating effect on reparative osteogenesis and accelerated fracture consolidation in experimental animals.

**Keywords:** open fracture, fibroblast growth factor, osteogenesis.

### ВВЕДЕНИЕ

Травматизм является одной из ведущих причин заболеваемости взрослого населения [1]. Значительное место среди травм занимают открытые переломы. Актуальность проблемы лечения открытых переломов конечностей определяется высокой частотой гнойно-некротических осложнений, ложных суставов и посттравматических дефектов тканей [3, 4].

Одной из причин неблагоприятных исходов открытых переломов является нарушение механизмов репаративного гистогенеза. Спектр причин этого достаточно широк. Например, возрастающее количество высокоэнергетических травм, при которых нарушается кровоснабжение костных отломков, повышается риск инфицирования, замедленной консолидации и несращения перелома [2]. Другой причиной является то, что большое число пациентов имеют сопутствующие заболевания либо субклинические формы последних. Следовательно, у таких пострадавших изначально имеются предпосылки для расстройств нормальных механизмов регенерации тканей. Нарушение нормального остеогенеза также часто отмечается при политравме.

При регенерации тканей при переломах играют роль различные факторы роста (тромбоцитарный, эпидермальный, фибробластический, инсулиноподобный) [5]. Одним из наиболее изученных ростовых факторов является группа факторов роста фибробластов.

Факторы роста фибробластов (ФРФ) – семейство полипептидов, участвующих в процессах репаративного гистогенеза [7]. 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 [10]. 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. Технология получения проста, легко воспроизводима, не требует больших материальных вложений. Существенный научный и практический интерес представляет изучение влияния метаболитов *Bacillus subtilis* 804, содержащих фактор роста фибробластов, на процессы регенерации костей при лечении открытых переломов.

**Цель исследования** – усовершенствовать методы лечения открытых переломов с помощью локального стимулирующего воздействия на остеогенез метаболитами *Bacillus subtilis* 804, содержащими фактор роста фибробластов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Характеристика используемого вещества.* Ранее проведенными исследованиями профессора В.И. Никитенко [10] было установлено, что метаболиты жизнедеятельности бактерий штамма *Bacillus subtilis* 804 содержат неизвестный фактор роста фибробластов. Обнаруженный фактор роста фибробластов – это комплекс четырех термостабильных (до 128 °С) 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 % fetalная сыворотка (стандарт). Фактор роста чувствителен к протеолизу под действием трипсина, имеет изоэлектрическую точку в области 9,2-9,3. Мы применяли метаболиты штамма *Bacillus subtilis* 804 в виде стандартизированного препарата под названием «Винфар». Препарат представляет собой стерильную прозрачную жидкость, содержащую 5 % метаболитов с новым фактором роста фибробластов и воду. Содержание белка в нем не менее 0,1 %, а количество фактора роста – не менее 10 нанограмм в мл. РН препарата равен 7,1±0,2.

*Экспериментальная модель.* Все манипуляции с животными выполнены в соответствии с требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985), Хельсинской декларации 2000 г. «О гуманном отношении к животным» и приложения № 8 «Правил гуманного отношения к лабораторным животным», правил лабораторной практики в РФ (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003).

Эксперименты выполнены на 112 белых крысах-самцах линии «Wistar» массой 185 – 215 г. Для наркоза 1 % раствор тиопентала натрия вводился внутривенно в дозе 40 мг на 1 кг массы животного. 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. Крысы контрольной группы получали раствор натрия хлорида 0,9 % в том же количестве.

Ежедневно у животных этих двух групп оценивалось клиническое состояние ран, регистрировались потребление корма и воды, особенности поведения, масса тела животных.

*Клинические наблюдения.* 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 14-18 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 воз-

росла до нормальной через 9-13 дней.

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.

*Методики морфологических исследований.* Фрагменты отломков костей с костной мозолью фиксировали в 10 % нейтральном формалине (на фосфатном буфере) с последующей декальцинацией, 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 CD 34 (маркер эндотелиоцитов), CD 68 (маркер макрофагов, хондро- и остеокластов) и collagen I использовались соответственно антитела anti-CD 34 и anti-CD 68 («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 ×300 на площади соответствующего среза (поля зрения – п.з.), равной 0,077 мм<sup>2</sup>, 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 ×300 минимум в 5 полях зрения (микрофотографий) для каждого показателя.

Плоскости срезов были ориентированы продольно костным отломкам с целью включения в каждый срез обоих отломков и всех слоев костной мозоли, толщину которой измеряли по цифровым микрофотографиям.

Статистическая обработка производилась на персональном компьютере с помощью лицензированного пакета прикладных программ приложения Microsoft Office в операционной системе Microsoft Windows 7. Для оценки достоверности различий между количественными показателями групп использовали однофакторный дисперсионный анализ. Различия считали достоверно значимыми при уровне вероятности  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

росла 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 (рис. 1, 2).

*Результаты морфологических исследований.* При сравнении средней толщины периостальной костной мозоли у животных контрольной и опытной групп наглядны различия в динамике репаративного остеогенеза (табл. 1).



Рис. 1. Рана через сутки после операции



Рис. 2. Рана на 14 сутки после операции

Таблица 1

Средняя толщина центральной части периостальной мозоли в зоне перелома, мм

Сроки	Контрольная группа	Опытная группа
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

Наглядно динамика изменения толщины костной мозоли отражена на рисунке 3.

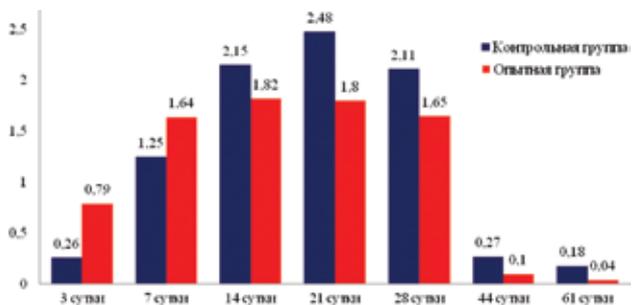


Рис. 3. Динамика изменения толщины периостальной костной мозоли (мм)

На всех сроках исследования наблюдается достоверное различие ( $p \leq 0,05$ ) между показателями толщины

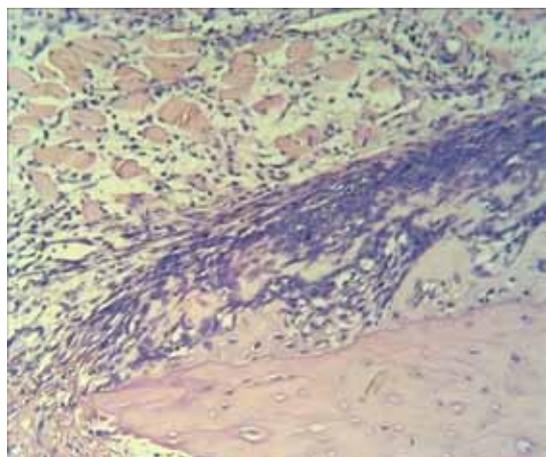


Рис. 4. Контрольная группа. Область перелома бедренной кости, 3 сутки. Гематоксилин-эозин. Ув. 150

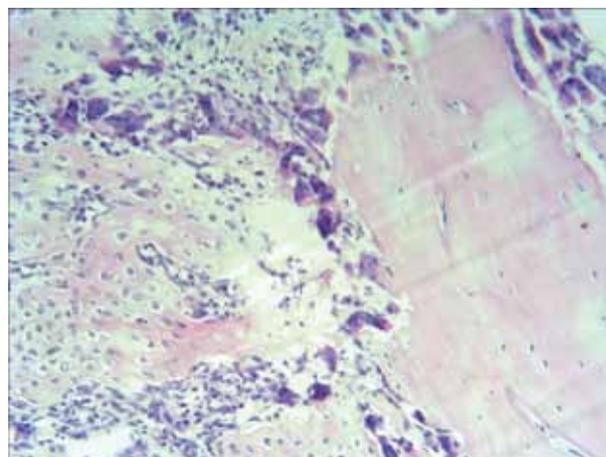


Рис. 5. Опытная группа. Область перелома бедренной кости, 3 сутки. Гематоксилин-эозин. Ув. 150

периостальной костной мозоли животных опытной и контрольной групп. У крыс опытной группы отмечается более быстрый рост мозоли на 7-е сутки, но в целом её толщина значительно меньше, чем в контрольной группе. Это говорит о большей стабильности перелома у животных опытной группы. Так как метод остеосинтеза у всех животных был одинаковый – интрамедуллярный остеосинтез, то большая стабильность перелома достигалась за счёт лучшего формирования эндостальной костной мозоли. Это доказано при гистологическом исследовании, результаты которого приводятся далее.

На 3 сутки у животных контрольной группы в интермедиарной зоне перелома выражена воспалительная реакция: отёк, лейкоцитарная инфильтрация, появление грануляционной ткани, отсутствие остеокластов (рис. 4). 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, 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 клетки остеогенного типа – остеобласты и остециты (рис. 5). У животных опытной группы на 3 сутки наблюдалась значительная активация неоангиогенеза (АЧП эндотелиоцитов  $42,0 \pm 6,0$ /п.з., в контрольной группе данный показатель равен  $7,0 \pm 2,0$ /п.з.).

*Контрольная группа, 7 сутки.* В интермедиарной зоне перелома на фоне развитой грануляционной ткани заметна пролиферация клеток мезенхимального происхождения, абсолютная численная плотность (АЧП) которых равна  $195,0 \pm 13,0$  на поле зрения. В небольшом количестве появляется волокнистый матрикс, в котором относительная объёмная плотность (ООП) коллагена I типа составляет  $4,83 \pm 1,02$  % (рис. 6), также отмечаются группы остеобластов (АЧП остеобластов  $33,0 \pm 5,0$ /п.з.). Остеокласты единичны (АЧП 1-2 п.з.), резорбция костных отломков не выражена.

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

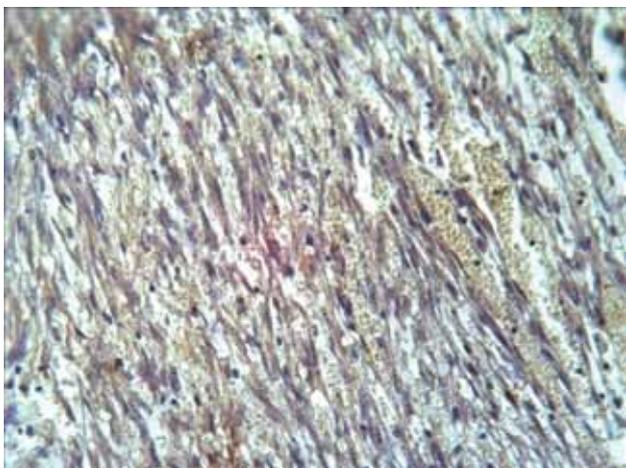


Рис. 6. Контрольная группа, 7 сутки. Иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии коллагена I типа. Ув. 300

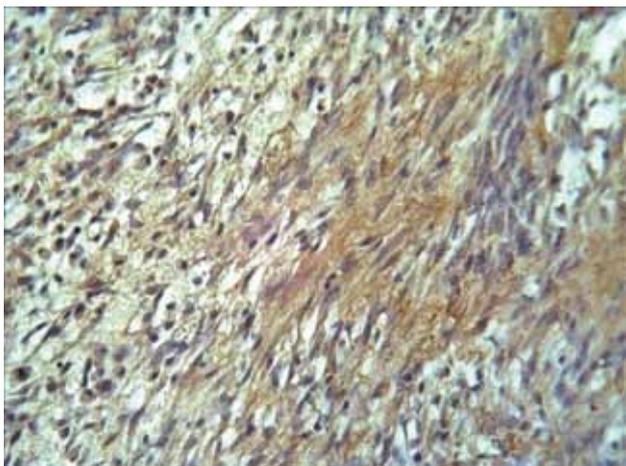


Рис. 7. Опытная группа, 7 сутки. Иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии коллагена I типа. Ув. 300

*Контрольная группа, 14 сутки.* На 14 сутки различия между двумя группами становятся ещё более заметными. В интермедиарной зоне перелома у животных контрольной группы на фоне остатков редуцирующейся грануляционной ткани только появляется волокнистый матрикс (ООП коллагена I типа составляет  $9,24 \pm 2,14$  %) с группами пролиферирующих остеобластов с АЧП  $93,0 \pm 8,0$ /п.з.

*В опытной группе на 14 сутки* интермедиарная костная мозоль представлена остатками деградирующего хряща и очагами формирования ретикулофиброзной кости, состоящими из пучков беспорядочно расположенных коллагеновых фибрилл. На фоне уменьшения числа остеобластов (АЧП =  $108,0 \pm 9,0$ /п.з.), по сравнению с предыдущим сроком, значительно увеличивается число остеоцитов (АЧП =  $91,0 \pm 6,0$ /п.з.), окруженных минерализующимся остеоидом, с непосредственно прилегающим к остецитам узким слоем минерализованного грубоволокнистого костного матрикса. При этом центральный отдел интермедиарной мозоли представлен небольшим участком волокнистого матрикса, ООП коллагена I типа в котором составляет  $15,61 \pm 2,89$  %.

*На 21 сутки в контрольной группе* интермедиарная костная мозоль по-прежнему представлена очагами редуцирующейся грануляционной ткани и широкими участками волокнистого матрикса (ООП коллагена I типа составляет  $11,25 \pm 2,12$  %) с группами пролиферирующих остеобластов (АЧП =  $27,0 \pm 4,0$ /п.з.). АЧП остеокластов  $4,0 \pm 1,0$ /п.з.

*У животных опытной группы* на этом сроке вся площадь (периферические и центральные отделы) интермедиарной костной мозоли представлена остатками деградирующего хряща и широкими очагами ретикулофиброзной кости, включающей значительное число остеобластов (АЧП =  $155,0 \pm 12,0$ /п.з.), окруженных минерализующимся остеоидом с беспорядочным расположением толстых пучков коллагеновых волокон (ООП коллагена I типа =  $20,7 \pm 3,71$  %). На данном сроке отмечаем и наибольшую активность остеокластов (АЧП =  $8,0 \pm 2,0$ /п.з.), обеспечивающих резорбцию новообразованной костной ткани.

*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 остеоидный 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. Из балок пластинчатой кости, хаотично расположенных на более ранних сроках, начинают формироваться компактное и губчатое вещество. В составе компактного вещества присутствует небольшое количество костномозговых полостей. Экспрессия коллагена I типа (ООП  $42,43 \pm 2,21$  %) на этом сроке возрастает на четверть.

*На 61 сутки у животных опытной группы* 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.

Сравнительные данные о содержании коллагена I типа в области интермедиарной костной мозоли приведены в таблице 2.

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

Сравнительные данные о численности остеобластов и остеоцитов в области костной мозоли представлены в таблице 3.

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, %
7-е сутки	4,83±1,02	7,23±1,02	49,7 %
14 сутки	9,24±2,14	15,61±2,89	68,9 %
21 сутки	11,25±2,12	20,7±3,71	84,0 %
28 сутки	16,23±2,21	29,85±4,01	83,9 %
44 сутки	21,23±4,13	42,43±2,21	99,9 %

Таблица 3

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

Сутки после операции	АЧП остеобластов, кл/п.зр.			АЧП остеоцитов, кл/п.зр.		
	Контрольная группа	Опытная группа	р	Контрольная группа	Опытная группа	р
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

## ОБСУЖДЕНИЕ

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. J. Martí-Carvajal [6], в которых утверждается об эффективности ФРФ при лечении длительно незаживающих ран. К сожалению, данных в литературе о применении факторов роста фибробластов для лечения открытых переломов мы не обнаружили.

Выявлено, что применение метаболитов *Bacillus subtilis* 804 сокращало фазу ранних посттравматических изменений. У животных опытной группы на третьи сутки наблюдалась значительная активация неоангиогенеза. Усиление ангиогенеза при использовании ФРФ для лечения ран получено в экспериментальных работах I. Wilcke [9], M. Takikawa [8].

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 ран-

няя резорбция хряща – на 14 сутки. Благодаря своевременной и надежной фиксации отломков периостальной мозолю в опытной группе интермедиарная мозоль начинала формироваться на 7 сутки (в контрольной группе – на 14 сутки).

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.

## ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что метаболиты *Bacillus subtilis* 804, содержащие фактор роста фибробластов, обладают стимулирующим действием на репаративный остеогенез.

2. При использовании метаболитов *Bacillus subtilis* 804 происходит более раннее формирование периостальной костной мозоли, что приводит к надежной фиксации отломков в первые две недели. В то же время, 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 де-

градирует только к 21 суткам после перелома.

3. Выявлено, что консолидация перелома диафиза бедренной кости при использовании метаболитов *Bacillus subtilis* 804 происходит быстрее, чем в контрольной группе. На 61 день наблюдения сокращение сроков консолидации в опытной группе составило 17 суток.

4. 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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов О.П. Распространенность травматизма среди населения агропромышленного региона // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2012. № 6. С. 13-16.
2. Ключевский В.В. Лечение открытых переломов бедренной кости / В.В. Ключевский, С.М. Сметанин, И.Н.Соловьев // Гений ортопедии. 2012. № 1. С. 11-14.
3. Мартель И.И. Чрескостный остеосинтез по Илизарову в комплексном лечении больных с открытыми повреждениями конечностей // Гений ортопедии. 2011. № 2. С. 44-48
4. 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
5. 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. Res. Int. 2014. Vol. 2014. P. 239356. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/239356>.
6. Growth factors for treating diabetic foot ulcers / A.J. Martí-Carvajal, C. Gluud, S. Nicola, D. Simancas-Racines, L. Reveiz, P. Oliva, J. Cedeño-Taborda, // Cochrane Database Syst. Rev. 2015. Vol. 10. P. CD008548. doi: 10.1002/14651858.CD008548.
7. Sánchez-González M.C., Salanova L., Ruano P. FGF-23: just a phosphate metabolism regulator or something else? // Reumatol. Clin. 2011. Vol. 7, Suppl. 2. P. S5-7.
8. 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, Y. Takabayashi, M. Fujita, H. Hattori, T. Kushibiki, M. Ishihara // J. Surg. Res. 2015. Vol. 196, N 2. P. 247-257.
9. VEGF(165) 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, A. Condurache, S. Krüger, P. Mailänder, H.G. Machens // Langenbecks Arch. Surg. 2007. Vol. 392, N 3. P. 305-314.
10. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* – продуцент фактора роста фибробластов : пат. 2427644 Рос. Федерация. № 2010126404/10 ; заявл. 28.06.2010 ; опубл. 27.08.11, Бюл. № 24.

REFERENCES

1. Baranov O.P. Rasprostranennost' travmatizma sredi naseleniia agropromyshlennogo regiona [Traumatism incidence in the population of an agroindustrial region] // Problemy Sotsial'noi Gigieny, Zdravookhraneniia i Istorii Meditsiny. 2012. N 6. S. 13-16.
2. Kliuchevskii V.V. Lechenie otkrytykh perelomov bedrennoi kosti [Treatment of open femoral fractures] / V.V. Kliuchevskiy, S.M. Smetanin, I.N.Soloviyov // Genij Ortop. 2012. N 1. S. 11-14.
3. Martel I.I. Chreskostnyi osteosintez po Ilizarovu v kompleksnom lechenii bol'nykh s otkrytymi povrezhdeniyami konechnosti [Transosseous osteosynthesis according to Ilizarov in complex treatment of patients with open limb injuries] // Genij Ortop. 2011. N 2. S. 44-48.
4. Prognozirovaniye gnoino-vozpалitel'nykh oslozhnenii pri otkrytykh perelomakh dlinnykh trubchatykh kostei [Predicting pyo-inflammatory complications for open fractures of long tubular bones] / A.M. Miromanov, A.A.Gerasimov, E.V. Namokonov, N.A. Miromanova // Vestn. Khirurgii im. I.I. Grekova. 2009. T. 168, N 3. C. 57-60.
5. 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. Res. Int. 2014. Vol. 2014. P. 239356. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/239356>.
6. Growth factors for treating diabetic foot ulcers / A.J. Martí-Carvajal, C. Gluud, S. Nicola, D. Simancas-Racines, L. Reveiz, P. Oliva, J. Cedeño-Taborda, // Cochrane Database Syst. Rev. 2015. Vol. 10. P. CD008548. doi: 10.1002/14651858.CD008548.
7. Sánchez-González M.C., Salanova L., Ruano P. FGF-23: just a phosphate metabolism regulator or something else? // Reumatol. Clin. 2011. Vol. 7, Suppl. 2. P. S5-7.
8. 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, Y. Takabayashi, M. Fujita, H. Hattori, T. Kushibiki, M. Ishihara // J. Surg. Res. 2015. Vol. 196, N 2. P. 247-257.
9. VEGF(165) 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, A. Condurache, S. Krüger, P. Mailänder, H.G. Machens // Langenbecks Arch. Surg. 2007. Vol. 392, N 3. P. 305-314.
10. Pat. 2427644 RF. Shtamm bakterii *Bacillus subtilis* – produtsent faktora rosta fibroblastov [Bacillus subtilis bacteria strain – a produced agent of fibroblast growth factor]. No 2010126404/10; zaiavl. 28.06.2010; opubl. 27.08.11. Biul. N 24.

Рукопись поступила 04.02.2016.

**Сведения об авторах:**

1. Копылов Вадим Анатольевич – ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России, г. Оренбург, доцент кафедры травматологии и ортопедии, к. м. н.; e-mail: vadkopl@yahoo.com.
2. Миханов Василий Александрович – ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России, г. Оренбург, доцент кафедры патологической анатомии, к. м. н.
3. Сафронов Андрей Александрович – ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России, г. Оренбург, заведующий кафедрой травматологии и ортопедии, д. м. н., профессор.

**Information about the authors:**

1. Kopylov Vadim Anatol'evich – SBEI HPE The Orenburg State Medical University of the RF Ministry of Health, Orenburg, Department of Traumatology and Orthopaedics, an associate professor, Candidate of Medical Sciences; e-mail: vadkopl@yahoo.com.
2. Mikhanov Vasilii Aleksandrovich – SBEI HPE The Orenburg State Medical University of the RF Ministry of Health, Orenburg, Department of Pathological Anatomy, an associate professor, Candidate of Medical Sciences.
3. Safronov Andrei Aleksandrovich – SBEI HPE The Orenburg State Medical University of the RF Ministry of Health, Orenburg, Head of the Department of Traumatology and Orthopaedics, Doctor of Medical Sciences, Professor.