

парнокопытных// Материалы по биоморфологии животных и человека. Алма - Ата: Издательство Академии наук Казахского ССР, 1963. - С.56-58.

4. Попкова Г.А. Сравнительная морфология спинного мозга с.-х. Животных// Научный отчет института экспериментальной биологии АН Казахской ССР. Алма - Ата, 1963. - С.163-168.

5. Фасахутдинова А.Н. Морфология спинного мозга кролика в возрастном аспекте: Диссертация канд. биол.наук. Ульяновск, 2002. - 239с.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ  
БАКТЕРИОФАГОВ В КАЧЕСТВЕ  
АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ В  
СОЧЕТАНИИ С БИОКОМПОЗИТНЫМ  
МАТЕРИАЛОМ «ЛИТАР» ПРИ ЛЕЧЕНИИ  
ПЕРЕЛОМОВ КОНЕЧНОСТЕЙ У ЖИВОТНЫХ  
STUDY OF THE POTENTIAL APPLICATIONS OF THE  
PHAGES AS ANTIMICROBIAL PREPARATIONS COMBINED  
WITH THE BIOCOMPOSITE MATERIALS «LITAR» FOR  
THE TREATMENT OF THE FRACTURES OF ANIMALS

*Пичугин Ю.В., Золотухин С.Н., Ковалева Е.Н., Шевалаев Г.А.*  
*Pichugin U.V., Zolotukhin S.N., Kovaleva E.N., Shevalaev G.A.*  
*Межкафедральный научный центр ветеринарной медицины*  
*Ульяновская ГСХА*

*In the article there is given information about potential applications of the phages as antimicrobial preparations combined with the biocomposite materials «LitAr» for the treatment of the fractures of animals. The good therapeutic effect was obtained.*

В процессе лечения патологии костной ткани в медицинской практике вполне оправдано применение биодеградируемых материалов, которые за определенный период времени резорбируются в организме, а на их месте формируется новая здоровая костная ткань. К ним относятся натуральные костные имплантаты, материалы на основе альгинатов или коллагена и фосфатов кальция и гидроксосолей биогенных элементов[1].

В последние годы имеет место активное внедрение в медицинскую практику различных кальций-фосфатных материалов[2-4]: «Коллапан», «Церасорб», «Хронос», «Остим», «ЛитАр».

Одной из основных проблем, связанных с послеоперационными осложнениями являются раневые инфекции. В настоящее время для их лечения и профилактики широко используются антибиотики.

В связи с появлением антибиотико-резистентных штаммов микроорганизмов и отрицательным влиянием антибиотиков на организм (аллергические реакции, снижение иммунной реактивности) возникла

необходимости изыскания новых экологически безвредных антимикробных средств. Такими препаратами являются специфические бактериофаги [7].

**Цель работы:** исследование влияния препарата ЛитАр на активность специфических бактериофагов и скорость восстановления костной ткани.

**Материалы и методы:**

Биоматериал «ЛитАр» включен в государственный реестр медицинских изделий РФ (Регистрационное удостоверение № ФС 01263011/3308-06 от 05 июля 2006г.). По составу материал близок к костной ткани: коллаген (белок) – 20 – 30% и гидроксиллапатит  $(Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6)$  – 70 – 80% вес, не обладает антигенной активностью, не отторгается, обладает большой скоростью биодеградации, составляющий 15 – 20 дней, при этом резорбция ауто-, аллокости происходит в течение года и более. Материал имеет 70% пористости, что обеспечивает его быструю васкуляризацию в зоне операции (12 – 15 дней).

Необходимо отметить, что после укладки кусочков материала «ЛитАр», снижается кровоточивость. По данным авторов препарата «ЛитАр», он с успехом применяется для тампонады кровотока ран туловища и конечностей, для остановки кровотечения мягких тканей головы, кровотечений из синусов твердой мозговой оболочки, при ликворрее. Гемостатический эффект основан на агрегации тромбоцитов на разветвленной сети коллагеновых волокон пластины [5,6].

Объектом исследования являлся энтерококковый бактериофаг EF – 4 УГСХА, выделенный из объектов внешней среды; биокомпозитный материал «ЛитАр». В качестве индикаторного использовали штамм *E.faecalis* № 189, полученный из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской ГСХА.

Литическую активность бактериофага определяли методами Аппельмана (метод серийных разведений в жидких питательных средах) и Грациа (метод агаровых слоев на плотных питательных средах).

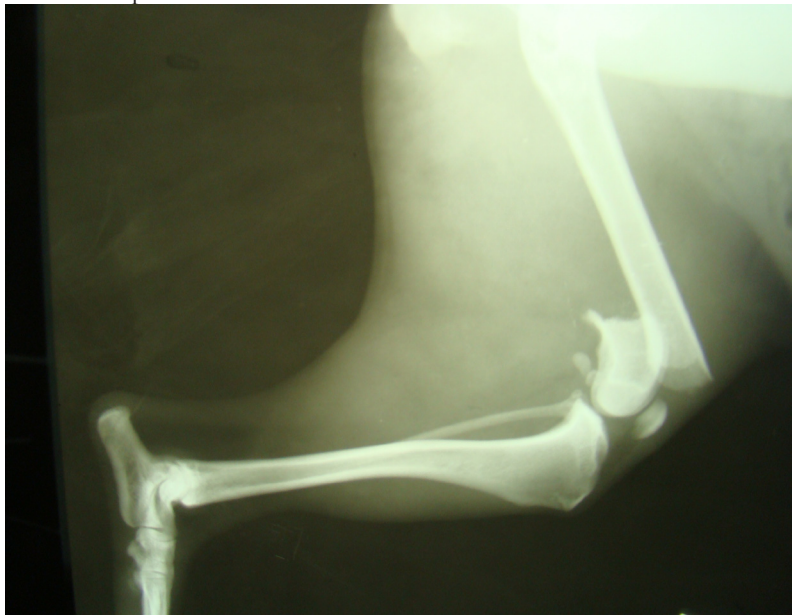
Для определения влияния материала «ЛитАр» на литическую активность энтерококкового бактериофага готовили серию разведений. Для этого двенадцать пробирок, содержащих по 4,5 мл мясоептонного бульона, ставили в штатив в один ряд, в 1-ю пробирку стерильной пипеткой вносили 0,5 мл исследуемого фага и 1 г биокомпозитного материала, содержимое пробирки перемешивали. После 30-минутного контакта фага с материалом (затем после 24-часового) 0,5 мл жидкости из 1-й пробирки переносили во 2-ю, из 2-й – в 3-ю и т.д. до 10-й включительно. Из 10-й пробирки лишние 0,5 мл выливали; 11-я и 12-я пробирки – контрольные.

Во все 10 пробирок приготовленного ряда разведений вносили по 0,2 мл 18-часовой бульонной культуры *E.faecalis*. Пробирка 11-я – контроль культуры, содержит 4,5 мл бульона и 0,2 мл 18-часовой бульонной культуры *E.faecalis*. Пробирка 12-я – контроль на стерильность, содержит 4,5 мл бульона. Штатив с пробирками помещали в термостат при 37°C на 6 часов.

Для определения изменения литической активности бактериофага на плотной питательной среде в чашки Петри разливали 25 – 30 мл 1,5 % мясоептонного агара. Чашки со средой подсушивали 30 мин в термостате или 2 – 3 ч при комнатной температуре.

Готовили в пробирках с мясоептонным бульоном ряд последовательных разведений исследуемого фага, добавив при этом в 1-ю пробирку 1 г

биокомпозитного материала. Время контакта материала с фагом – 30 минут, 24 часа. В пробирки с 2,5 мл 0,7 % мясопептонного агара, расплавленного в водяной бане и остуженного до 44 – 46°C, вносили по 1 мл каждого разведения. Одновременно в каждую пробирку вносили по 0,2 мл 18-часовой бульонной культуры *E. faecalis*. Содержимое пробирок перемешивали, и выливали 2-м слоем в чашки с 1,5 % агаром. Параллельно ставили контроль – изучение литической активности фага EF – 4 УГСХА.



**Рис 1.- Рентгенограмма правой задней конечности на момент поступления в клинику.**

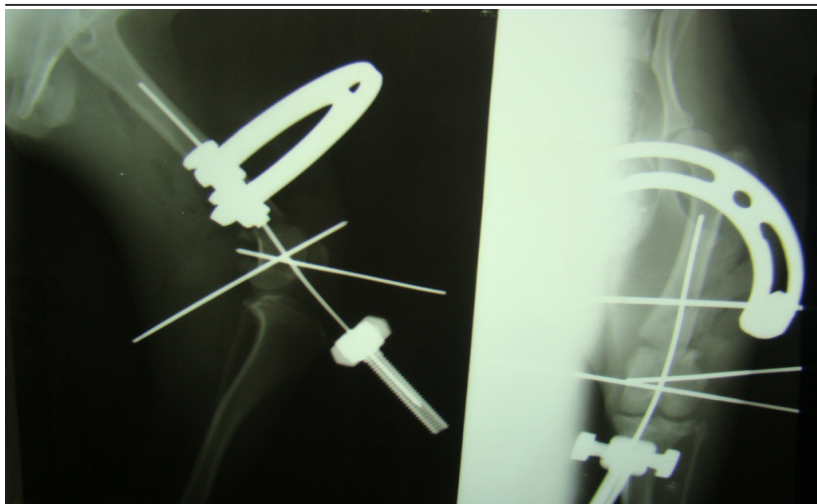
Чашки с посевами инкубировали при 37°C в течение 12 часов.

#### **Результаты исследований**

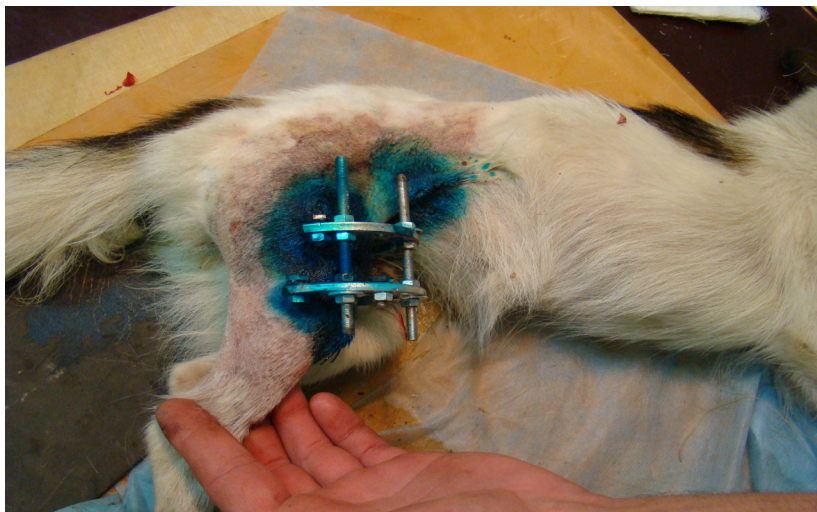
В результате проведенных исследований установлено, что литическая активность энтерококкового бактериофага EF – 4 УГСХА ( $10^9$  по методу Аппельмана и  $4 \times 10^9$  по методу Грациа) не меняется при добавлении к фаголизату биокомпозитного материала ( $10^9$  по методу Аппельмана и  $3 \times 10^9$  по методу Грациа). Время контакта бактериофага с биокомпозитным материалом не повлияло на показатели литической активности.

Таким образом, биокомпозитный материал «ЛитАр» не снижает литическую активность энтерококкового бактериофага, который в свою очередь может быть использован в качестве специфичного антимикробного препарата.

Для изучения клинической эффективности сочетанного применения биокомпозита «ЛитАр» с поливалентным бактериофагом нами была проведена операция по остеосинтезу при переломе костей у собаки.



**Рис 2.- Рентгенограмма правой задней конечности после открытой репозиции и проведения направляющих спиц для фиксации костных**



**Рис 3.- Внешний вид животного сразу после операции.**

В клинику межкафедрального центра ветеринарной медицины была доставлена некрупная беспородная собака предположительно после ДТП.

По результатам осмотра и проведённой рентгенограмме конечности нами был установлен перелом бедренной кости в нижней трети со смещением костных отломков. Животное после предварительной подготовки было

прооперировано и наложен аппарат внешней фиксации. В зону перелома уложен кусочек гидроксиапатитколлагенового биокомпозитного материала «ЛитАр» в сочетании с комплексным жидким пробиотическим препаратом производства ФГУП «НПО Микроген».

В течении первых суток после операции животное не вставало, пищу принимало неохотно, от воды не отказывалось. На третьи сутки самостоятельно встало, от пищи и воды не отказывалось. Собака на 4-е сутки после операции начала передвигаться самостоятельно. Изменений в поведении не наблюдалось. На протяжении лечения в качестве антибактериальной терапии местно применялся комплексный жидкий пробиотический препарат. Явлений воспаления или послеоперационных осложнений не наблюдалось.

**Заключение:** *Применение биокомпозитного материала «ЛитАр» в сочетании с комплексным бактериофагом было вполне оправдано. Нам удалось сократить сроки репаративной регенерации нативной костной ткани в среднем на 20%, без применения антибиотиков.*

#### Литература:

1. Литвинов С.Д., Ершов Ю.А. Материаловедение 2000; 7: 34-38.
2. Берченко Г.Н. Биоактивные кальций-фосфатные материалы (КФМ) и стимуляция репаративного остеогенеза. Сборник тезисов «Биоимплантология на пороге XXI века». Симпозиум по проблемам тканевых банков с международным участием. М., 2001. С. 37-38.
3. Litvinov S. D. et al. //Actualites en biomateriaux. – Paris, 2000. – Vol. 5. – P. 343-347.
4. Краснов А.Ф., Литвинов С.Д. Медицинская практика применения материала «ЛитАр»: история и реальность // Ортопедия, травматология и ортопедия (Харьков). – 2003. - №3. – С. 136 – 142.
5. Краснов А.Ф., Глухов В.Ф., Литвинов С.Д., Капишников А.В.
6. Применение материала «ЛитАр» для замещения постостеомиелитических дефектов длинных трубчатых костей // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, - 2004. - № 4. – С.76 – 79.
7. Куликов А.Н., Литвинов С.Д. Имплантационный материал «ЛитАр» и сочетанная травма // Медицинский вестник МВД. – 2006. - №2 (20).
8. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Ульяновск, 2007. – 39 с.
9. Литвинов С.Д., Серегин А.С., Пуштова Т.Б., Оленникова М.М. Перспективы применения материала «ЛитАр» для восстановления хрящевой перегородки носа у детей // Российская оториноларингология. - № 3(22), 2006. – С. 66 – 70.
10. Литвинов С.Д., Шевалаев Г.А., Демин В.П. Применение материала «ЛитАр» для формирования заднего спондилодеза // Тезисы докладов Международной пириговской научно-практической конференции «Остеосинтез и эндопротезирование». – Москва. 2008. – С. 118.