

## КЛИНИКО-РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТЕОМИЕЛИТА В УСЛОВИЯХ ВНЕШНЕГО МЕТАЛЛООСТЕОСИНТЕЗА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Кубрак Н.В.<sup>1</sup>, Дюрягина О.В.<sup>1</sup>, Овчинников Е.Н.<sup>1</sup>, Дьячков А.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курган, e-mail: kubrak2@mail.ru

Неуклонный рост частоты встречаемости остеомиелита в последние годы связан с расширением рекомендаций по применению остеосинтеза с использованием металлоконструкций при патологии костно-мышечной системы. Изучение особенностей развития остеомиелита у экспериментальных животных позволяет разрабатывать и совершенствовать стратегии профилактики, диагностики и лечения данного заболевания. Исследование проведено на 13 лабораторных крысах линии Вистар, разделенных на 2 группы: опытную и контрольную. Крысам опытной группы на границе верхней и средней трети диафиза бедренной кости формировали трепанационное отверстие с последующей инокуляцией в костномозговой канал  $1 \times 10^8$  КОЕ *Staphylococcus aureus* и интрамедуллярным введением спицевого фиксатора. На уровне нижней трети бедренной кости осуществляли консольное введение второй спицы. Далее обе спицы соединяли между собой методом армирования и заливки самотвердеющей пластмассой. Крысам контрольной группы выполняли аналогичные этапы оперативного вмешательства, но не проводили инфицирования костномозгового канала. Оценка состояния животных осуществляли по клиническим и рентгенологическим параметрам в течение 21 суток. В контрольной группе клинических и рентгенологических признаков остеомиелита не выявлено. В опытной группе клинические признаки инфекционного процесса включали локальный отек мягких тканей, выделение гнойного экссудата из спицевых каналов, нарушение функции коленного сустава. Рентгенологические признаки воспаления на 15-е сутки были ограничены интрамедуллярным пространством, а к 21-м суткам воспалительный процесс распространялся на все структурные элементы кости. Таким образом, клиничко-рентгенологическая картина развития воспалительного процесса у крыс в условиях эксперимента соответствовала картине остеомиелита, наблюдаемой у человека.

Ключевые слова: остеомиелит, инфекционные осложнения, крыса, *Staphylococcus aureus*, металлоостеосинтез, рентгенографическое исследование.

## CLINICAL-AND-ROENTGENOLOGICAL CHARACTERISTIC OF OSTEOMYELITIS UNDER METAL OSTEOSYNTHESIS (AN EXPERIMENTAL STUDY)

Kubrak N.V.<sup>1</sup>, Dyuryagina O.V.<sup>1</sup>, Ovchinnikov E.N.<sup>1</sup>, Dyachkov A.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBI National Ilizarov Medical Research Centre, Kurgan, e-mail: kubrak2@mail.ru

The steady increase in the incidence of osteomyelitis in recent years is associated with the expansion of recommendations for the use of osteosynthesis using metal structures in the pathology of the musculoskeletal system. The study of the characteristic features of osteomyelitis development in experimental animals allows us to develop and perfect strategies for the prevention, diagnostics and treatment of this disease. The study was performed in 13 laboratory Wistar rats, divided into 2 groups: experimental and control. A trepanation hole was formed in the rats of the experimental group on the border of the upper and middle thirds of the femoral diaphysis, followed by inoculation into the medullary canal with  $1 \times 10^8$  CFU of *Staphylococcus aureus* and intramedullary insertion of a wire fixator. The cantilever insertion of the second wire was performed at the level of the lower third of the femur. Further, both wires were interconnected by the method of reinforcement and pouring with self-hardening synthetic resin. The rats of the control group underwent similar stages of surgery, but the bone marrow canal was not infected. The condition of the animals was assessed according to clinical and X-ray parameters for 21 days. In the control group, clinical and X-ray signs of osteomyelitis were not revealed. In the experimental group, the clinical signs of the infectious process included local soft tissue edema, discharge of purulent exudate from the wire tracts, dysfunction of the knee joint. X-ray signs of inflammation on Day 15 were limited to the intramedullary space, and by Day 21 the inflammatory process spread to all structural elements of the bone. Thus, the clinical and X-ray picture of the development of the inflammatory process in rats under experimental conditions corresponded to the osteomyelitis picture observed in humans.

Keywords: osteomyelitis, infectious complications, rat, *Staphylococcus aureus*, metallic osteosynthesis, X-ray study.

Остеомиелит на протяжении длительного времени остается серьезной проблемой здравоохранения. Согласно выводам Международного консенсусного совещания 2018 г. по скелетно-мышечным инфекциям, частота возникновения остеомиелита колеблется от 0,1% до 30% [1, 2] и продолжает неуклонно расти [3]. На сегодняшний день существующие методы лечения широко варьируют и не принимаются повсеместно [4, 5], что требует дальнейшего поиска эффективных терапевтических стратегий для решения данной проблемы.

Необходимым звеном в исследовании остеомиелита является использование животных моделей, позволяющих создать воспроизводимую, контролируемую модель патологии, которой можно манипулировать для создания различных проявлений болезни. Наиболее эффективными моделями для изучения остеомиелита являются крысы [6]. Существуют различные способы моделирования остеомиелита у экспериментальных животных, в том числе основанные на бактериальной инокуляции и использовании дополнительных способов индукции инфекции (таких как склерозирующие агенты, фибриновый клей, герметики, внедрение инородных тел) [7]. Частое использование в качестве бактериального агента *Staphylococcus aureus* обусловлено его ведущей позицией в видовом спектре возбудителей остеомиелита [4, 8]. Лучшая воспроизводимость моделей остеомиелита отмечена в случае применения погружных металлических костных фиксаторов, при этом, как правило, чаще всего используются накостные пластины, интрамедуллярные стержни или ортопедические винты [9, 10]. Однако использование модели остеомиелита, воспроизводимой в условиях внешней аппаратной чрескостной фиксации, также позволяет получить однотипные клиничко-рентгенологические изменения, идентичные патологическому процессу, наблюдаемому у человека.

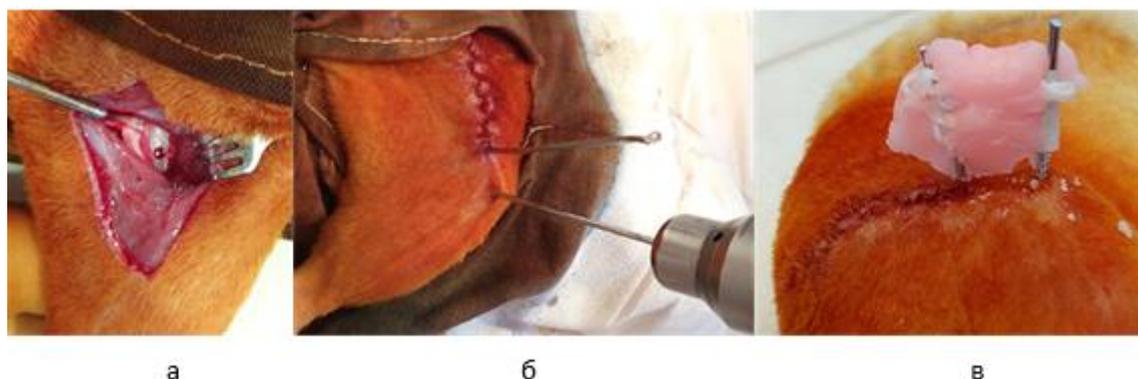
Цель исследования – изучить особенности клиничко-рентгенологической картины при моделировании остеомиелита у крыс в условиях внешнего металлоостеосинтеза.

**Материал и методы исследования.** Исследование проведено на 13 крысах линии Вистар обоего пола в возрасте 13–16 месяцев с массой тела 320–360 г (самки) и 430–520 г (самцы). Все экспериментальные исследования и манипуляции были выполнены в соответствии с требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, а также были одобрены Комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ ТО им. академика Г.А. Илизарова». Содержание и уход за животными осуществляли в соответствии с ГОСТ 33216-2014.

Животные случайно были разделены на 2 группы – опытную (n=8) и контрольную (n=5). Оперативное вмешательство выполняли в условиях операционной, под общим наркозом, адаптированным по весу (Рометар 2% – 1–2 мг/кг, Биовета, Чехия; Золетил 100 – 10–15 мг/кг, «Virbac Sante Animale», Франция). Всем крысам через вертикальный разрез кожи и подкожной клетчатки выполняли доступ к передней поверхности бедренной кости и производили трепанацию диафиза кости на границе верхней и средней трети высокоскоростным сверлом диаметром 1,0 мм. Затем крысам опытной группы интрамедуллярно вводили 50 мкл суспензии, содержащей  $1 \times 10^8$  КОЕ *Staphylococcus aureus* (MSSA, музейный штамм). Животным контрольной группы инфицирования не проводили. Далее всем крысам в костномозговой канал вводили конец крючкообразно изогнутой спицы диаметром 1,0 мм на глубину 7 мм. Операционную рану ушивали послойно наглухо рассасывающимся шовным материалом (Vicryl 4-0, ETHICON).

Следующим этапом на уровне нижней трети бедренной кости осуществляли консольное введение спицы диаметром 0,6 мм. Затем обе спицы соединяли между собой методом армирования и заливали самотвердеющей пластмассой «Протакрил-М» (рис. 1).

Во избежание искажения результатов исследования обезболивающие и антимикробные средства животным в послеоперационном периоде не применяли, обработку спиц и операционной раны не проводили. На протяжении всего периода наблюдения крыс содержали в индивидуальных клетках с неограниченным доступом к пище и воде.



*Рис. 1. Этапы оперативного вмешательства: а – трепанационное отверстие в диафизе бедренной кости; б – введение консольной спицы; в – соединение спиц самотвердеющей пластмассой*

Клинические наблюдения проводили ежедневно на протяжении всего эксперимента. Во время осмотра отмечали общее состояние животных, особенности поведения и изменение функционального состояния оперированного сегмента, визуально оценивали состояние мягких тканей в области оперативного вмешательства и мест входа спиц.

Рентгенографическое исследование области бедра (аппарат TOSHIBA (Rotanode) Model E7239. N: 10G749 (Япония); 2,0 mA, 42-43 kV, фокусное расстояние 90 см, выдержка автоматическая) проводили сразу после операции для подтверждения позиционирования металлоконструкции, а также на 15-е и 21-е сутки наблюдения. Снимки выполняли в прямой и боковой проекциях.

Эвтаназию осуществляли на 21-е сутки эксперимента методом декапитации наркотизированных животных и производили забор патматериала для дополнительных исследований.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Клиническая картина остеомиелита определяется, главным образом, объемом поражения кости. В представленной работе общее состояние животных обеих группы, состояние слизистых оболочек и кожного покрова на протяжении всего эксперимента оценивалось как хорошее. Состояние кожи в области оперативного вмешательства соответствовало нормальному физиологическому. Заживление операционной раны протекало без особенностей, по первичному натяжению. Опороспособность оперированной конечности была сохранена у всех животных (100%).

У животных контрольной группы отека в области оперированного сегмента и выделения экссудата из спицевых каналов, нарушения функций тазобедренного и коленного сустава не было выявлено.

У крыс опытной группы в 1–3-и сутки после операции наблюдалось снижение потребления корма и воды. Отек в области оперированного сегмента у 5 крыс (62,5%) регистрировался на 1–5-е сутки после оперативного вмешательства, у 1 крысы (12,5%) – в 1–3-и и 14-е сутки, у 1 крысы (12,5%) – на 2-е, 8-е и 20-е сутки; у 1 крысы (12,5%) отек образовывался со 2-х суток и сохранялся до конца периода наблюдения. Признаки болезненности по срокам в основном совпадали с отеком.

Выделение геморрагического экссудата из обоих спицевых каналов отмечали в 1-е сутки после операции у 5 крыс (62,5%). При дальнейшем наблюдении характер экссудата и сроки его выделения из спицевых каналов у животных в пределах группы имели некоторые отличия. У 2 крыс (25%) на 7–9-е сутки регистрировали выделение серозного экссудата; на 9–10-е сутки экссудат становился гнойным. Его выделение из спицевых каналов продолжалось у 1 крысы до момента демонтажа аппарата по причине его нестабильности (13-е сутки), у другой – до окончания эксперимента, несмотря на то, что аппарат был демонтирован на 15-е сутки (рис. 2). Выделение экссудата отмечали из проксимального и дистального каналов попеременно. Кроме того, у одной из этих крыс уже на 7-е сутки

зафиксированы атрофия четырехглавой мышцы бедра и кратковременное ограничение функции коленного сустава на 14-е сутки.



*Рис. 2. Внешний вид животного на этапе эксперимента. Отделение гнойного экссудата из спицевых каналов, срок эксперимента 15 суток*

У 2 крыс (25%) на 5-е сутки произошел самопроизвольный демонтаж металлоконструкции вследствие неосторожного передвижения животных в клетке. С 6–8-х суток у данных животных началось выделение гнойного экссудата из проксимального канала, которое продолжалось до окончания срока наблюдения, причем у одной из крыс на 21-е сутки экссудат характеризовался как гнойно-геморрагический. Нарушения функции суставов оперированной конечности у этих животных зафиксировано не было.

У 1 крысы (12,5%) впервые выделение гнойного экссудата из дистального спицевого канала было отмечено на 15-е сутки. На 16-е сутки зарегистрированы ограничение функции коленного сустава и нестабильность аппарата, произведен его демонтаж. К 20-м суткам экссудат приобрел серозный характер.

У 3 крыс постоянные гнойные выделения либо из проксимального, либо из дистального канала регистрировали с 9–10-х до 17–20-х суток. У одной из крыс с 3-х по 13-е сутки после операции в паховой области определялось плотное ограниченное образование округлой формы, с 14-х по 21-е сутки отмечались его размягчение и флюктуация. На основании клинической картины был диагностирован абсцесс, локализованный на медиальной поверхности бедра. Нестабильность аппарата определена на 15-е сутки, произведен его демонтаж. Амплитуда движений в тазобедренном суставе сохранялась в полном объеме на протяжении всего эксперимента; функция коленного сустава была резко ограничена с 3-х по 17-е сутки. Еще у одной крысы нарушение функции коленного сустава выявлено на 8–10-е и 16-е сутки, на 14-е сутки отмечался кратковременный отек тканей в области сустава.

Таким образом, у животных обеих групп не было выявлено выраженных признаков интоксикации. В опытной группе отек в области оперированного сегмента в разные сроки наблюдения был зарегистрирован у 100% животных. Демонтаж аппарата по причине его нестабильности был произведен у 4 крыс (50%) на 13–16-е сутки после операции, у 2 крыс (25%) произошел самопроизвольный демонтаж конструкции вследствие механического воздействия на ранних сроках эксперимента, у 2 крыс (25%) нестабильности металлоконструкции не выявлено. Гнойные выделения из спицевых каналов наблюдались у 100% животных, преимущественно с 8–10-х до 17–21-х суток. Нарушение функции коленного сустава определено у 4 крыс (50%), патологии функции тазобедренного сустава не было выявлено ни у одного животного (0%).

В целом данные, полученные при клиническом наблюдении за экспериментальными животными, согласуются с результатами других исследований и зависят от способа моделирования остеомиелита, количества инокулированного инфекционного материала и использованной животной модели [11-13].

*Рентгенографическое исследование.* Одним из основных методов диагностики остеомиелита является рентгенография [14]. В проведенном исследовании рентгенологические критерии диагностики и оценки тяжести патологического процесса основывались на ранее описанных критериях остеомиелита. На рентгенограммах пораженного сегмента оценивали характер, выраженность и распространенность структурных изменений кости [13, 14].

У всех животных контрольной группы на 15-е и 21-е сутки эксперимента наблюдали схожую рентгенологическую картину. Контуры бедренной кости оставались ровными, четко очерченными. Кортикальная пластинка имела равномерную толщину и рентгенологическую плотность. Рентгенологическая тень интермедуллярного канала была равномерная, очаги просветления отсутствовали. Места введения спиц имели четкий контур без зон просветления (рис. 3а, 3б).

В **опытной группе** на 15-е сутки после операции в большинстве случаев (67%) кортикальная пластинка кости сохраняла четкий наружный контур и имела равномерную рентгенологическую плотность. У 2 животных (33%) в прямой проекции выявляли истончение и неравномерность структуры кортикальной пластинки на протяжении диафиза кости. Зоны просветления вокруг спицевых фиксаторов отсутствовали. У 1 крысы отмечали наличие гладкой периостальной тени на краниальной поверхности кости. В проекции интермедуллярного канала в 100% случаев как в прямой, так и в боковой проекции отмечали слабо заметные хаотичные округлые участки просветления (рис. 3в, 3г).



*Рис. 3. Рентгенограммы области бедра крысы в прямой (а, в, д) и боковой (б, г, е) проекциях: а, б – контрольная группа, срок эксперимента 21 сутки; в, г – опытная группа, срок эксперимента 15 суток; г, д – опытная группа, срок эксперимента 21 сутки*

На 21-е сутки эксперимента у 50% животных на рентгенограммах в боковой проекции отмечали истончение и размытие контура корковой пластинки в области диафиза. Также в большинстве случаев (83,3%) отмечали рентгенологические признаки обширной резорбции костной ткани в области дистального спицевого канала (рис. 3д) и участок просветления в месте расположения интрамедуллярной спицы (рис. 3е).

У 33,3% крыс на краниальной и латеральной поверхности кости определялись гладкие периостальные наслоения средней рентгенологической плотности. У всех животных отмечали наличие рыхлых эндостальных теней разной степени выраженности, распространяющихся по всей длине диафиза. Костномозговой канал на всем протяжении имел неравномерную структуру низкой рентгенологической плотности (рис. 2г).

Таким образом, результаты рентгенологического исследования показали, что у животных опытной группы уже к 15-м суткам после операции развивались признаки воспаления, ограниченного интермедуллярным пространством, проявляющиеся наличием слабовидимых хаотичных округлых участков просветления.

К 21-м суткам эксперимента происходило распространение воспалительного процесса на все структурные элементы кости, что характеризовалось наличием мелкоочаговых полостей в костномозговом канале, а также признаков процессов деструкции корковой пластинки и резорбции губчатой кости дистального метафиза.

В контрольной группе животных рентгенологических признаков остеомиелита выявлено не было.

Результаты рентгенографического исследования, описанные в данной работе, не противоречат данным других экспериментов по моделированию остеомиелита, вызванного *S. aureus* [13], и аналогичны радиологическим признакам остеомиелита у человека [14].

### **Выводы**

Интрамедуллярная инокуляция  $1 \times 10^8$  КОЕ *Staphylococcus aureus*, являющегося основным патогеном остеомиелита, приводит к развитию инфекционного процесса у крыс, который по клинической и рентгенологической картине соответствует местным патологическим изменениям у пациентов с костной инфекцией. Представленная модель может быть использована для исследования возможных методов терапевтического воздействия.

*Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований в рамках программы НИР государственного задания 2021–2023 гг. ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России.*

### **Список литературы**

1. Schwarz E.M., Parvizi J., Gehrke T., Aiyer A., Battenberg A., Brown S.A., Callaghan J.J., Citak M., Egol K., Garrigues G.E., Ghert M., Goswami K., Green A., Hammound S., Kates S.L., McLaren A.C., Mont M.A., Namdari S., Obremskey W.T., O'Toole R., Raikin S., Restrepo C., Ricciardi B., Saeed K., Sanchez-Sotelo J., Shohat N., Tan T., Thirukumar C.P., Winters B. 2018 international consensus meeting on musculoskeletal infection: research priorities from the general assembly questions. *Journal of Orthopaedic Research®*. 2019. vol. 37. № 5. P. 997-1006. DOI: 10.1002 / jor.24293.
2. Бузолева Л.С., Пузь А.В., Синебрюхов С.Л., Гнеденков С.В., Ким А.В., Еськова А.И., Пономарева А.Л. Имплантат-ассоциированные инфекции, связанные с проблемой биопленкообразования // *Современные проблемы науки и образования*. 2016. № 5. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25430> (дата обращения: 13.03.2022).
3. Римашевский Д.В., Ахтямов И.Ф., Федуличев П.Н., Wessam Zaalan, Устазов К.А., Abdul Basith, Молдакулов Ж.М., Зиновьев М.П. Патогенетические особенности лечения хронического остеомиелита (обзор литературы) // *Гений ортопедии*. 2021. Т. 27, № 5. С. 628-635. DOI: 10.18019/1028-4427-2021-27-5-628-635.
4. Masters E.A., Trombetta R.P., de Mesy Bentley K.L., Boyce B.F., Gill A.L., Gill S.R., Nishitani K., Ishikawa M., Morita Y., Ito H., Bello-Irizarry S.N., Ninomiya M., Brodell J.D. Jr., Lee C.C., Hao S.P., Oh I., Xie C., Awad H.A., Daiss J.L., Owen J.R., Kates S.L., Schwarz E.M.,

Muthukrishnan G. Evolving concepts in bone infection: redefining "biofilm", "acute vs. chronic osteomyelitis", "the immune proteome" and "local antibiotic therapy". *Bone research*. 2019. vol. 7. № 1. P. 1-18. DOI: 10.1038/s41413-019-0061-z.

5. Баранов С.В., Уснунц А.Р., Зайцев А.Б. Клинико-анатомические особенности остеомиелита травматолого-ортопедического и челюстно-лицевого профилей: систематический обзор // *Кубанский научный медицинский вестник*. 2021. Т. 28. № 1. С. 103–115. DOI: 10.25207/1608-6228-2021-28-1-103-115.

6. Spagnolo N., Greco F., Rossi A., Ciolli L., Teti A., Posteraro P. Chronic staphylococcal osteomyelitis: a new experimental rat model. *Infection and immunity*. 1993. vol. 61. № 12. P. 5225-5230.

7. Patel M., Rojavin Y., Jamali A.A., Wasielewski S.J., Salgado C.J. Animal models for the study of osteomyelitis. *Seminars in plastic surgery*. 2009. vol. 23. № 2. P. 148-154. DOI: 10.1055/s-0029-1214167.

8. Nasser A., Azimi T., Ostadmohammadi S., Ostadmohammadi S. A comprehensive review of bacterial osteomyelitis with emphasis on *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*. 2020. vol. 148. P. 1-14. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104431.

9. Lucke M., Schmidmaier G., Sadoni S., Wildemann B., Schiller R., Stemberger A., Haas N., Raschke M. A new model of implant-related osteomyelitis in rats. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2003. vol. 67. № 1. P. 593-602. DOI: 10.1002/jbm.b.10051.

10. Cobb L.H., Park J., Swanson E.A., Beard M.C., McCabe E.M., Rourke A.S., Seo K.S., Alicia K Olivier A.K., Priddy L.B. CRISPR-Cas9 modified bacteriophage for treatment of *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis and soft tissue infection. *PLoS One*. 2019. vol. 14. № 11. P. e0220421. DOI: 10.1371/journal.pone.0220421.

11. Воротников А.А., Максименко Д.В., Пономарев И.П. Моделирование хронического остеомиелита в эксперименте для исследования методов замещения инфицированных костных дефектов // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2006. Т. 2. № 2. С. 28-30.

12. Assad M., Downey A.M., Cluzel C., Trudel Y., Doyle N., Authier S. Characterization of an Acute Rodent Osteomyelitis Infectious Model Using a Tibial Intramedullary Implant Inoculation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020. vol. 8. DOI: 10.3389/fbioe.2020.567647.

13. Reizner W., Hunter J.G., O'Malley N.T., Southgate R.D., Schwarz E.M., Kates S.L. A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *European cells & materials*. 2014. vol. 27. P. 196–212. DOI: 10.22203/ecm.v027a15.

14. Ковалинин В.В., Клещевникова К.Ю., Джанчатова Б.А. Лучевая диагностика остеомиелита // Российский электронный журнал лучевой диагностики. 2014. Т. 4. №. 3. С. 66-77.