

ПРИМЕНЕНИЕ ПОСТОЯННОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ТОКА В МОДЕЛИ ОСТЕОМИЕЛИТА У КРЫС*

Кубрак Н.В.¹, Дюрягина О.В.¹, Овчинников Е.Н.¹

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

Рост частоты встречаемости остеомиелита требует дальнейшей разработки эффективных способов профилактики и ликвидации остеомиелитического процесса. В настоящее время перспективным направлением является использование постоянного электрического тока, обладающего антимикробным эффектом. Однако его применение в медицинской практике ограничено ввиду отсутствия четких рекомендаций. Исследование проведено на 18 крысах (Wistar), разделенных на 3 группы: контрольную и 2 опытные. Крысам всех групп моделировали остеомиелит бедренной кости путем введения в костномозговой канал *Staphylococcus aureus* (1×10^8 КОЕ, MSSA) с установкой интрамедуллярного металлического имплантата, закрепленного наружным фиксирующим устройством. Животным опытных групп в послеоперационном периоде проводили сеансы местного электровоздействия (в опытной группе 1 - на 0, 2, 4, 6 сутки, в опытной группе 2 - на 7, 9, 11, 13 сутки) постоянным электрическим током силой 150 мАм в течение 1 минуты, используя в качестве электродов фиксирующие элементы. Крысам контрольной группы сеансы электровоздействия не проводили. Наблюдение за животными осуществляли в течение 21 суток. Во всех группах животных выявлены клинические и рентгенологические признаки воспалительного процесса в области оперативного вмешательства: отек мягких тканей, истечение экссудата, изменение температуры и массы тела, лизис и резорбция костной ткани вокруг спицевых фиксаторов, периостальная реакция и неравномерность толщины корковой пластинки кости. У крыс опытной группы 2 отмечалось более пассивное течение инфекции, что привело к уменьшению клинических признаков воспаления и сглаживанию течения процессов деструкции на момент окончания эксперимента. Таким образом, полученные результаты указывают на необходимость дальнейшего изучения влияния постоянного электрического тока на развитие костной инфекции.

Ключевые слова: остеомиелит, крыса, металлоостеосинтез, *Staphylococcus aureus*, постоянный электрический ток.

**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. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

APPLICATION OF DIRECT ELECTRIC CURRENT IN A MODEL OF OSTEOMYELITIS IN RATS

Kubrak N.V.¹, Diuriagina O.V.¹, Ovchinnikov E.N.¹

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

The increase in the incidence of osteomyelitis requires further development of effective methods for the prevention and elimination of the osteomyelitis process. Currently, a promising direction is the use of direct electric current, which has an antimicrobial effect. However, its use in medical practice is limited due to the lack of clear recommendations. The study was carried out on 18 rats (Wistar), divided into 3 groups: control and 2 experimental. In rats of all groups, osteomyelitis of the femur was simulated by introducing *Staphylococcus aureus* (1×10^8 CFU, MSSA) into the medullary canal with the installation of an intramedullary metal implant secured with an external fixation device. In the postoperative period, the animals of the experimental groups underwent sessions of local electric exposure (in experimental group 1 - on days 0, 2, 4, 6, in experimental group 2 - on days 7, 9, 11, 13) with a constant electric current of 150 mA for 1 minutes, using fixing elements as electrodes. The rats of the control group did not undergo electrical stimulation sessions. Animals were observed for 21 days. In all groups of animals, clinical and radiological signs of an inflammatory process in the area of surgical intervention were revealed: soft tissue edema, exudate outflow, changes in temperature and body weight, lysis and resorption of bone tissue around pin fixators, periosteal reaction, and uneven thickness of the cortical bone plate. In rats of the experimental group 2, a more passive course of the infection was noted, which led to a decrease in the clinical signs of inflammation and a smoothing of the course of destruction processes at the end of the experiment. Thus, the obtained results indicate the need for further study of the effect of direct electric current on the development of bone infection.

Keywords: osteomyelitis, rat, metallic osteosynthesis, Staphylococcus aureus, direct electrical current.

Рост числа высокоэнергетических травм в гражданских условиях, а также в условиях боевых действий, ведет к росту числа случаев использования металлических имплантатов в ортопедо-травматологической практике [1]. Одним из наиболее опасных осложнений, связанных с хирургической установкой ортопедических устройств (устройства для фиксации переломов, протезы суставов), является остеомиелит, который вызывается инфекционными микроорганизмами и приводит к прогрессирующему разрушению и потере костной ткани [2]. Несмотря на совершенствование технологий лечения, количество таких осложнений продолжает неуклонно расти [3; 4], что требует дальнейшей разработки эффективных способов профилактики и ликвидации остеомиелитического процесса. В настоящее время среди разрабатываемых методов перспективным является применение постоянного электрического тока. В клинической практике его использование обусловлено положительным остеогенным эффектом при сращении переломов и лечении ортопедической патологии [5]. Кроме того, в экспериментальных исследованиях *in vitro* определены параметры тока, позволяющие получить антимикробный эффект по отношению к некоторым патогенным микроорганизмам [6], а *in vivo* установлено, что локальное воздействие электрического тока без сопутствующей антимикробной терапии является эффективным методом лечения остеомиелита [7]. Однако показания к применению данной методики в клинической медицине отсутствуют, так как не существует четких рекомендаций относительно времени начала воздействия, параметров тока, длительности и периодичности проведения процедур.

Цель исследования - изучить особенности течения остеомиелита у крыс в условиях местного воздействия постоянным электрическим током.

Материал и методы исследования. Исследование проведено на 18 крысах (Wistar) обоего пола в возрасте 11-12 месяцев, средней массой $396 \pm 17,6$ г. Все исследования были выполнены в соответствии с требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и Директивы 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».

Животные случайным образом были разделены на 3 группы – 2 опытные и контрольную. Всем крысам в условиях операционной выполняли моделирование остеомиелита бедренной кости путем введения в костномозговой канал 50 мкл бактериальной суспензии (1×10^8 КОЕ Staphylococcus aureus; MSSA, музейный штамм) с

последующей установкой стабильно фиксированного интрамедуллярного металлического имплантата из нержавеющей стали [8; 9]. На протяжении всего эксперимента крыс содержали в индивидуальных клетках, доступ к пище и воде не ограничивали; обработку операционной раны не проводили, антимикробные средства не применяли. Содержание и уход за животными осуществляли в соответствии с ГОСТ 33216-2014, ГОСТ 33215-2014, СанПиН 3.3686-21.

В послеоперационном периоде крысам опытных групп 1 и 2 проводили сеансы электровоздействия на внутрикостный канал бедренной кости, используя прибор «Биопотенциометр БМП-2». Катод (+) присоединяли к спице, введенной на уровне нижней трети бедренной кости, анод (-) - к спице, введенной в интрамедуллярный канал. Процедуру осуществляли постоянным электрическим током силой 150 мАм в течение 1 минуты. Животным опытной группы 1 электровоздействие выполняли на 0, 2, 4 и 6 сутки после операции; животным опытной группы 2 - на 7, 9, 11 и 13 сутки. Крысам контрольной группы сеансы электровоздействия не проводили.

Оценка состояния животных проводилась ежедневно на протяжении всего эксперимента и включала клинические наблюдения, определение массы тела, измерение общей температуры тела (электронный термометр DT-622 с гибким нетравмирующим наконечником, 1 минута) и местной температуры обеих тазовых конечностей в области середины бедра (инфракрасный медицинский электронный термометр WF-5000, В.Well). Анализ изменения массы тела проводили по контрольным точкам: день до операции, 7, 14 и 21 сутки после операции. Общую температуру тела и местную температуру тканей в области оперированного и контрлатерального сегментов анализировали в аналогичные сроки.

Рентгенографическое исследование области бедра (плоскопанельный детектор для ветеринарии CANON CXDI-401C COMPACT (Япония); рентгеновская трубка TOSHIBA (Rotanode) Model E7239. N: 10G749 (Япония); 2,5-3,2 mA, 43-44 kV, фокусное расстояние 90 см, выдержка автоматическая) в прямой и боковой проекциях выполняли в день операции, а также через 21 сутки наблюдения.

Наркотизированных животных подвергали эвтаназии на 21 сутки после операции.

Все количественные данные были описаны как среднее (M) ± стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили с использованием программы AtteStat 13.1 (Россия). Достоверность различий полученных значений определяли критерием Вилкоксона. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты исследования и их обсуждение

Клиническая картина остеомиелита зависит от анатомической локализации патологического процесса, временного интервала между микробной инокуляцией и

проявлением инфекции, а также от вида микроорганизма [10]. В проведенном исследовании интрамедуллярное введение культуры *S. aureus* не повлияло на общую выживаемость животных.

У всех животных контрольной группы (n=8) был выявлен отек мягких тканей в области оперированного сегмента. У 62,5% крыс отек отмечали только в раннем послеоперационном периоде (1-5 сутки), у 25% крыс регистрировали непродолжительные рецидивирующие отеки в разные сроки наблюдения, у 12,5% крыс отек сохранялся на протяжении всего эксперимента. У 100% крыс контрольной группы с 8 по 21 сутки наблюдали выделение гнойного или гнойно-геморрагического экссудата из спицевых каналов. Также у 50% крыс было выявлено нарушение функции коленного сустава оперированной конечности. Кроме того, отмечали единичные случаи образования непродолжительного отека в области тазобедренного сустава, атрофии четырехглавой мышцы бедра и образование абсцесса на медиальной поверхности бедра. Металлоконструкция, фиксирующая интрамедуллярный металлический имплантат, оставалась стабильной на протяжении всего эксперимента у 25% крыс; у 50% животных нестабильность фиксации определяли к 13-16 дню наблюдения; у 25% крыс стабильность конструкции была нарушена вследствие механического воздействия на 5 сутки после операции.

В опытной группе 1 (n=6) отек мягких тканей в области оперативного вмешательства отмечали только в раннем послеоперационном периоде у 83,3% животных. Истечение гнойного экссудата из спицевых каналов наблюдали у 100% животных преимущественно с 8 суток, однако оно было либо непродолжительным, либо носило эпизодический характер. Нарушения функций суставов оперированной конечности не выявлено ни у одной крысы. Нестабильность металлоконструкции выявлена у 66,7% крыс на 7-16 сутки эксперимента.

В опытной группе 2 (n=6) у 33,3% крыс на 8-13 сутки после операции выявлена нестабильность металлоконструкции и произведен ее демонтаж, вследствие чего сеансы воздействия электрическим током были проведены частично. Указанные животные были исключены из экспериментального исследования. У крыс, получивших полный курс электровоздействия и учтенных в результатах, отек мягких тканей в области операционной раны отмечали с 1 по 7 сутки. У 50% животных с 6 суток после операции и до окончания эксперимента происходило скудное выделение густого гнойного экссудата из спицевых каналов. У 25% крыс появление гнойного отделяемого отмечено в более поздние сроки (с 15 суток), еще у 25% выделения экссудата зарегистрировано не было. У 25% крыс наблюдали резкое ограничение функции коленного сустава, у 75% крыс опытной группы 2 суставы оперированной конечности не имели патологии.

Наиболее часто используемыми индикаторами воспаления, применяющимися при проведении экспериментальных исследований, являются такие физиологические параметры, как масса тела и температура [11]. В послеоперационном периоде у животных всех групп наблюдалось изменение массы тела (рис. 1а). На момент завершения эксперимента в контрольной группе значительное уменьшение веса относительно исходных значений отмечено у 62,5% крыс, в опытных группах 1 и 2 - у 100%. Максимальная потеря массы составила в контрольной группе 7,7%, в опытных группах 1 и 2 - по 6%, в среднем - 2,8%, 5,1% и 3,3% соответственно. Однако у всех животных опытной группы 2 после 14 суток эксперимента наблюдалась тенденция к увеличению массы тела, в отличие от контрольной и опытной группы 1, в которых вес стабильно снижался на протяжении всего периода исследования.

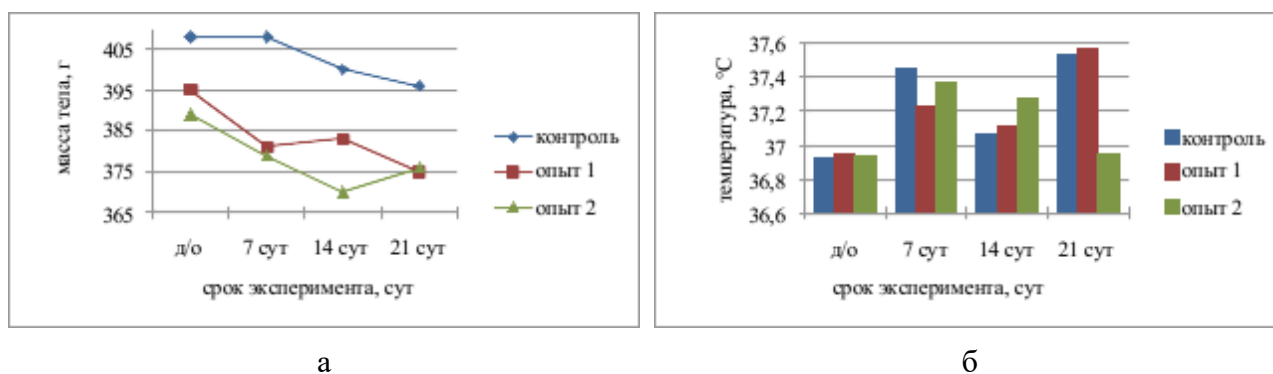


Рис. 1. Динамика массы и общей температуры тела экспериментальных животных

При анализе изменений общей температуры тела выявлено, что она была достоверно выше дооперационных значений в контрольной группе на 7 ($p=0,018$) и 21 ($p=0,04$) сутки наблюдения, в опытной группе 2 - на 14 сутки ($p=0,037$). В опытной группе 1 на 21 сутки также отмечено значительное повышение общей температуры, однако ее значения достоверно не отличались от дооперационных значений ($p=0,05$) (рис. 1б).

Анализ показателей, характеризующих местную температуру тканей тазовых конечностей у крыс контрольной группы, не выявил достоверных отличий между симметричными участками оперированной и контрлатеральной конечностей (таблица). В опытной группе 1 на 21 сутки после бактериальной инокуляции температура оперированной конечности была достоверно выше ($p=0,043$), чем на симметричном участке интактной конечности. В опытной группе 2 достоверно более высокие значения температуры инфицированной конечности (относительно аналогичного участка второй конечности) отмечены на 14 сутки наблюдения ($p=0,031$), однако к 21 суткам произошло существенное ее снижение и статистически значимой разницы между местной температурой конечностей на данном сроке установлено не было.

Локальная температура симметричных участков тазовых конечностей, °С

Группа / срок эксперимента		Местная температура оперированного сегмента	Местная температура контрлатерального сегмента	Достоверность различий между сегментами
контрольная группа	д/о**	37,12±0,34	37,18±0,39	p=0,91
	7 сут.	36,27±0,19	36,82±0,34	p=0,2
	14 сут.	36,53±0,16	36,65±0,2	p=0,63
	21 сут.	36,96±0,21	36,98±0,22	p=0,97
опытная группа 1	д/о**	36,97±0,39	37±0,44	p=0,98
	7 сут.	37,1±0,18	36,73±0,18	p=0,19
	14 сут.	37,2±0,05	36,92±0,13	p=0,09
	21 сут.	37,02±0,13	36,6±0,12	p=0,043*
опытная группа 2	д/о**	37,42±0,21	37,5±0,29	p=0,97
	7 сут.	37,03±0,32	36,75±0,22	p=0,51
	14 сут.	37,28±0,14	36,78±0,09	p=0,031*
	21 сут.	36,38±0,06	36,6±0,18	p=0,3

* - p<0,05, ** - до операции.

Рентгенография является одним из наиболее доступных визуализирующих методов исследования, необходимых для изучения остеомиелита [12]. На рентгенограммах, полученных через 21 сутки после индукции остеомиелита, оценивали диафизарно-периостальную реакцию, симптомы костной деструкции и изменение мягких тканей в области оперированного сегмента (рис. 2).

У 50% крыс контрольной и опытной группы 1, а также у 33,3% крыс опытной группы 2 на рентгенограммах в боковой проекции отмечали участки истончения корковой пластинки в средней части диафиза. У 100% животных опытных групп 1 и 2 вокруг интермедулярного участка проксимальной спицы определялась зона просветления, свидетельствующая о лизисе костной ткани. В контрольной группе зона просветления отмечалась только в области контакта проксимальной спицы и корковой пластинки.

Рентгенологические признаки резорбции костной ткани вокруг дистальной спицы в контрольной группе отмечали в 83,3% случаев, в опытных группах 1 и 2 - в 100%. При этом в опытной группе 1 на 83,3% рентгенограмм зоны резорбции были окружены участками склероза костной ткани, а в опытной группе 2 в 33,3% случаев края кости в зоне резорбции были плотные и имели четкий контур.

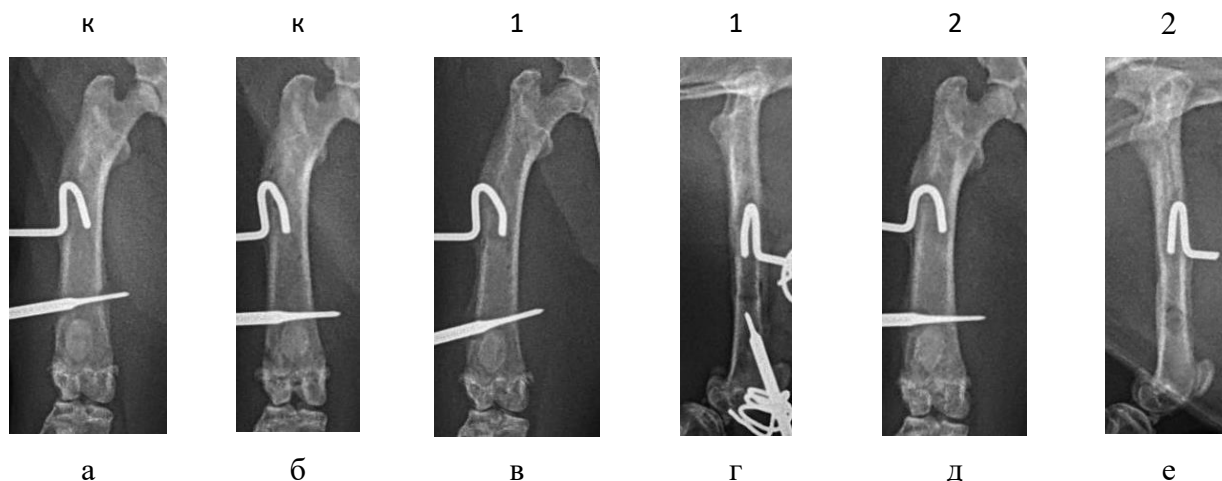


Рис. 2. Рентгенограммы области бедра крысы в прямой (а, б, в, д) и боковой (г, е) проекциях на 21 сутки эксперимента: а, б – контрольная группа, в, г – опытная группа 1, д, е – опытная группа 2

У 33,3% крыс контрольной группы и у 100% крыс опытной группы 1 на снимках определялись периостальные наслоения средней рентгенологической плотности. В контрольной группе они располагались на краниальной и латеральной поверхностях кости и по толщине были меньше или равны толщине корковой пластинки. В опытной группе 1 отмечены их циркулярное расположение в средней трети диафиза и толщина, равная или превышающая толщину корковой пластинки. В опытной группе 2 периостальные наслоения, выявленные у 50% животных, имели низкую рентгенологическую плотность, располагались в основном на латеральной поверхности диафиза и по толщине были равны толщине корковой пластинки.

Наличие рыхлых эндостальных теней разной степени выраженности, распространяющихся по всей длине диафиза, в контрольной и опытной группе 1 отмечали в 100% случаев, в опытной группе 2 - в 33,3%.

На рентгенограммах животных контрольной и опытной группы 1 в проекции костномозгового канала отмечали округлые единичные зоны просветления (полости) небольшого размера. В опытной группе 2 аналогичных очаговых изменений выявлено не было. Также у 100% животных всех групп мягкие ткани в зоне инфицирования имели равномерную рентгенологическую плотность без признаков уплотнений или образования полостей.

Таким образом, в проведенном исследовании наиболее ярко выраженные клинические признаки воспалительного процесса [10] отмечены в контрольной группе. В опытной группе 1 признаки воспалительной реакции носили менее выраженный характер, но

со временем имели тенденцию к усугублению. В опытной группе 2 также были выявлены признаки воспаления, но к окончанию периода наблюдения их проявление уменьшалось.

Рентгенологическая картина, характерная для воспалительного процесса кости [13], была обнаружена во всех группах животных. Однако изменения, отмеченные в опытной группе 2, свидетельствовали о более пассивном течении инфекции, что привело к большей сохранности костной ткани бедренной кости к концу наблюдений.

Заключение. Локальное воздействие на кость постоянного электрического тока на модели остеомиелита у крыс в разные сроки после микробной инокуляции показало минимальный терапевтический эффект между исследуемыми группами. В проведенном исследовании размер выборки был относительно небольшим, а срок наблюдения за животными - недостаточным для оценки развития, прогрессирования или затухания костной инфекции. Результаты эксперимента указывают на необходимость дальнейшего изучения влияния данного метода на инфекционный процесс, протекающий в костной ткани, с учетом полученных сведений.

Список литературы

1. Fleming M.E. Osteoarthritis a significant source of disability and morbidity after combat related periarticular tibia fracture. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2015. V. 23. P. A412. DOI: 10.1016/j.joca.2015.02.765.
2. Billings C., Anderson D.E. Role of Animal Models to Advance Research of Bacterial Osteomyelitis. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022. V. 9. DOI: 10.3389/fvets.2022.879630.
3. Миронов С.П., Цискарашвили А.В., Горбатюк Д.С. Хронический посттравматический остеомиелит как проблема современной травматологии и ортопедии (обзор литературы) // *Гений ортопедии*. 2019. Т. 25. № 4. С. 610-621. DOI: 10.18019/1028-4427-2019-25-4-610-621.
4. Римашевский Д.В., Ахтямов И.Ф., Федуличев П.Н., Wessam Zaalaa, 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.
5. Овчинников Е.Н., Стогов М.В. Стимуляция остеогенеза постоянным электрическим током (обзор литературы) // *Травматология и ортопедия России*. 2019. Т. 25. № 3. С. 185-191. DOI: 10.21823/2311-2905-2019-25-3-185-191.
6. Schmidt-Malan S.M., Karau M.J., Cede J., Greenwood-Quaintance K.E., Brinkman C.L., Mandrekar J.N., Patel R. Antibiofilm activity of low-amperage continuous and intermittent direct

electrical current. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015. V. 59. № 8. P. 4610-4615. DOI: 10.1128/AAC.00483-15.

7. Schmidt-Malan S.M., Brinkman C.L., Karau M.J., Brown R.A., Waletzki B.E., Berglund L.J., Schuetz A.N., Greenwood-Quaintance K.E., Mandrekar J.N., Patel, R.. Effect of Direct Electrical Current on Bones Infected with *Staphylococcus epidermidis*. *JBMR plus*. 2019. V. 3. № 5. P. e10119. DOI: 10.1002/jbm4.10119.

8. Кубрак Н.В., Дюрягина О.В., Овчинников Е.Н., Дьячков А.Н. Клинико-рентгенологическая характеристика остеомиелита в условиях внешнего металлоостеосинтеза (экспериментальное исследование) // *Современные проблемы науки и образования*. 2022. № 2. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=31621> (дата обращения: 11.12.2022).

9. Овчинников Е.Н., Дюрягина О.В., Стогов М.В., Силантьева Т.А., Киреева Е.А. Модель остеомиелита у крыс // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2022. № 3. С.395-399. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-173-3-395-399.

10. Zimmerli W. Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. *Journal of internal medicine*. 2014. T. 276. №2. P. 111-119. DOI: 10.1111/joim.12233.

11. Lu M., Liao J., Dong J., Wu J., Qiu H., Zhou X., Li J., Jiang D., He T., Quan Z. An effective treatment of experimental osteomyelitis using the antimicrobial titanium/silver-containing nHP66 (nano-hydroxyapatite/polyamide-66) nanoscaffold biomaterials. *Scientific reports*. 2016. V. 6. № 1. P. 1-14. DOI: 10.1038/srep39174.

12. Веркеева К.Д., Круглова М.Г., Нечаева А.С., Смирнова А.Д., Умницына М.Д. Диагностические возможности визуализирующих методов диагностики в зависимости от фазы воспаления при остром гематогенном остеомиелите у детей // *FORCIPE 2022*. T. 5. № S1. С. 39.

13. Liu Y., Liang A., Li X., Ma Z., Zhang D. Efficacy Evaluation of Ciprofloxacin-Loaded Poly (Trimethylene Carbonate) Implants in the Treatment of Chronic Osteomyelitis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022. V. 10. DOI: 10.3389/fbioe.2022.864041.