

## Антимикробная эффективность постоянного электрического тока при протекании через металлические имплантируемые изделия

### Аннотация

Проведена оценка антимикробного эффекта постоянного электрического тока, подаваемого через металлические имплантируемые медицинские изделия. В исследовании *in vitro* обнаружено, что по отношению к *S. aureus* максимальный антимикробный эффект достигался при силе тока 300 мкА в течение 1 мин, составляя в среднем 54,2 % (процент подавления роста микроорганизма); для *E. coli* – при 150 мкА в течение 3 мин, составляя в среднем 57,3 %; для *P. aeruginosa* – при 150 мкА в течение 1 мин, составляя в среднем 40,8 %. Проведенное исследование показало, что использование имплантируемых металлических медицинских изделий в качестве электродов вызывает антимикробный эффект по отношению к различным патогенным микроорганизмам, что может быть применено как элемент антибактериальной терапии в практике ортопедии.

### Введение

В практике ортопедии и травматологии для лечения многих заболеваний широко используют различные металлические имплантируемые изделия, причем номенклатура таких изделий постоянно растет [1]-[4]. Однако риски применения таких изделий остаются все те же и включают в себя различные осложнения, возникающие на границе взаимодействия металла с тканями (аллергия, инфицирование, остеолит, металлоз) [5]-[7]. В связи с этим исследования, посвященные модификации металлических имплантатов с целью повышения их биосовместимости и остеоинтеграции, остаются достаточно актуальными [8], [9]. Одним из направлений такой модификации является получение антимикробных характеристик металлических имплантируемых изделий [10], так как инфицирование вокруг имплантируемых металлических изделий – самое частое из встречающихся осложнений их применения [11]-[13].

Одним из возможных вариантов снижения числа инфицирований, связанных с имплантацией медицинских изделий в практике травматологии и ортопедии, по нашему мнению, является применение постоянного тока. Так, имеющиеся работы демонстрируют возможности применения электростимуляции с использованием спиц аппарата Илизарова в качестве электродов, в частности на модели distractionного остеогенеза [14]. Можно полагать, что такое воздействие может обладать антимикробными свойствами.

**Цель исследования** – оценка антимикробного эффекта постоянного электрического тока, подаваемого через металлические имплантируемые медицинские изделия.

### Материалы и методы

Для оценки антимикробных свойств использовали коллекционные штаммы: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (грамотрицательная бактерия). Тест-микроорганизмы культивировали на мясо-пептонном агаре (МПА) при температуре 37 °С в течение 18...24 ч. Рабочую суспензию тест-культур готовили из культуры данного тест-штамма, выращенного на плотной питательной среде (МПА) при температуре 37 °С в течение 18...24 ч. Для приготовления инокулята использовали метод прямого суспендирования в стерильном изотоническом растворе колоний чистой 18...24-часовой культуры бактерий, выросшей на плотной неселективной питательной среде (МПА). Для инокуляции применяли стандартную микробную взвесь, эквивалентную 0,5 по стандарту МакФарланда, разведенную в 1000 раз.

Процедура оценки антимикробной активности: по 7 мл инокулята вносили в контейнер, содержащий микробную взвесь титрованного микроорганизма (отдельно *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Инокулом был внесен в контейнеры с разведениями не позднее 15 мин с момента приготовления.

Далее на тест-микроорганизмы проводилось воздействие постоянного электрического тока посредством оригинального устройства (рис. 1). Устройство выполнено по модульному принципу на основе микропроцессора «AVR® ATmega32u4», который является основой для всего измерительного комплекса, связывая и контролируя работу периферийных устройств.

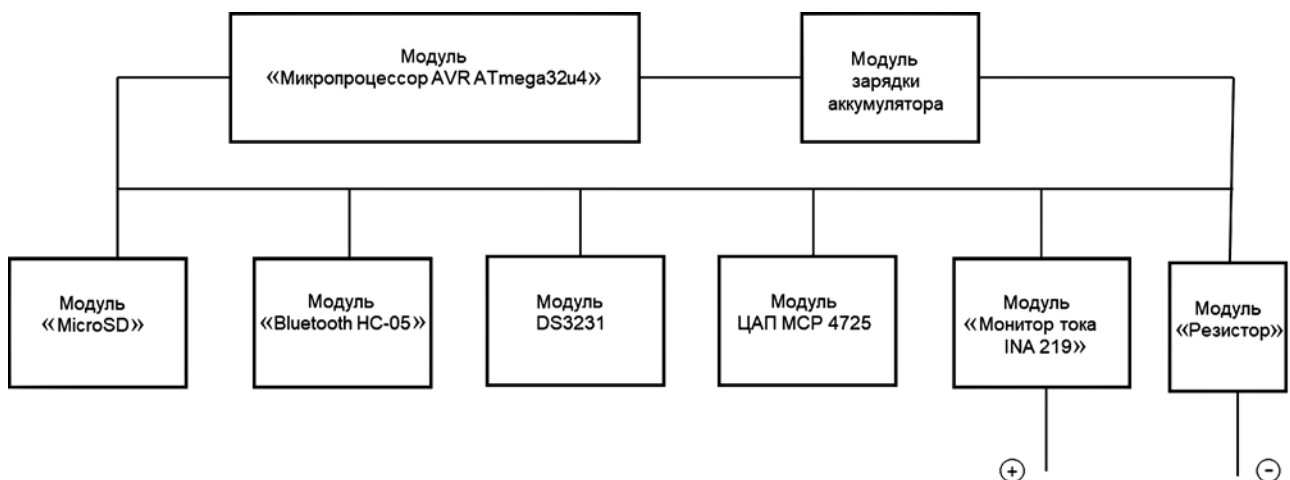


Рис. 1. Блок-схема оригинального устройства

Модули «MicroSD», «Bluetooth HC-05», DS3231 обеспечивают сервисную работу устройства: запись данных, управление через смартфон и часы реального времени. Модуль ЦАП MCP 4725 задает точное выходное напряжение, а монитор тока INA 219 управляет величиной тока. Модуль резисторов обеспечивает корректную работу операционного усилителя. К выводам полярности «+» и «-» подключаются непосредственно электроды, выполненные из стали марки 12Х18Н9 по ГОСТ 5632–2014, диаметром 1,5 мм и длиной 100 мм, которые помещали в микробную взвесь, как показано на рис. 2.

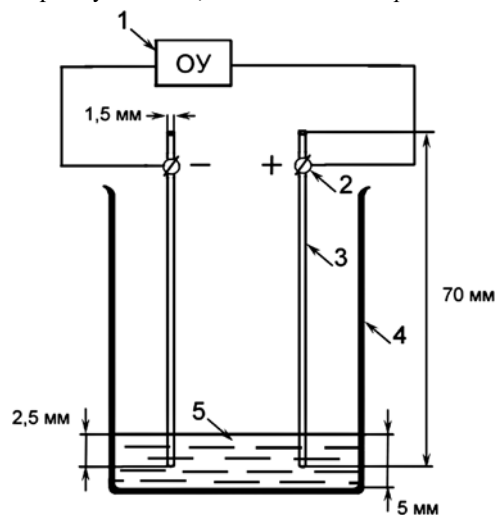


Рис. 2. Схема экспериментального стенда: 1 – оригинальное устройство (ОУ); 2 – электрическая клемма; 3 – электрод; 4 – контейнер; 5 – микробная взвесь

После воздействия током выполняли высев по 50 мкл инокулюма для каждого тестируемого микроорганизма на чашки с МПА. Чашки помещали в термостат при температуре 37 °С для инкубации в течение 24 ч. После окончания инкубации подсчитывали число колоний на чашках Петри и вычисляли концентрацию бактерий в колониеобразующих единицах (КОЕ/мл).

Для каждой постановки эксперимента проводили контроль роста тест-культур, для этого на чашку Петри со средой МПА высевали по 50 мкл приготовленной суспензии тестируемого штамма без воздействия электрическим током. В каждой серии экспериментов было выполнено 6 параллельных опытов.

## Результаты

На первом этапе оценивали зависимость антимикробного эффекта от силы тока в культурах микроорганизмов при времени экспозиции в 60 с. Результаты исследования *in vitro* обнаружили, что антимикробный эффект постоянного электрического

тока зависел от силы тока, при этом разные виды микроорганизмов по-разному реагировали на его действие (рис. 3).

Так, по отношению к *S. aureus* обнаружился стабильный антимикробный эффект для всех исследованных значений силы тока, максимум ингибирования роста достигался при 300 мкА и составлял в среднем 54,15 %. Для *E. coli* при 50 мкА подавления роста не было, максимум ингибирования достигался при 450 мкА и составлял в среднем 55,06 %. Наиболее устойчивой к воздействию постоянного тока оказалась *P. aeruginosa*, максимум ингибирования роста которой достигался при 150 мкА и составлял в среднем 40,78 %.

Во всех пробах при воздействии током силой 450 мкА после 10 с воздействия отмечался электролиз на электродах. Единичные явления электролиза наблюдались и в пробах всех микроорганизмов при силе тока 300 мкА. Эти данные позволяют отметить, что сила тока в 300...450 мкА не является безопасной. Таким образом, учитывая явление электролиза, можно заключить, что для *S. aureus* оптимум бактериостатической эффективности постоянного тока находится в границах 50...300 мкА, для *E. coli* – 150...300 мкА, для *P. aeruginosa* – около 150 мкА.

В связи с этим для достижения большей антимикробной эффективности следующим этапом исследования стало определение наиболее безопасного режима экспозиции. Изменения антибактериальной активности в зависимости от времени экспозиции представлены на рис. 4. Обнаружено, что при силе тока в 150 мкА с увеличением времени экспозиции антимикробный эффект возрастал по отношению к *S. aureus* и *E. coli* при оптимальном времени экспозиции 120 и 180 с соответственно. Повышения антимикробной активности с ростом времени экспозиции для *P. aeruginosa* не отмечено.

Таким образом, воздействие постоянного электрического тока дало в целом положительные результаты в части антимикробной активности. Важным наблюдением оказалось то, что разные штаммы микроорганизмов обладают разной устойчивостью к воздействию тока – как к его силе, так и ко времени экспозиции. Выявлен безопасный режим воздействия тока: 150 мкА в течение 2...3 мин.

На последнем этапе мы оценивали антимикробную активность на различных полюсах на плотной питательной среде. Для этого на свежеприготовленный газон суточной микробной тест-культуры воздействовали электрическим током, подводимым через электроды. В качестве среды использовали агар Мюллера-Хинтона. Время между приготовлением газона микробной культуры и установкой электродов составляло не более 15 мин. Инкубацию проводили при температуре 37 °С в течение 24 ч при обычной атмосфере. Результат оценивали по зоне подавления роста тест-микроорганизмов вокруг электродов. Учет результатов проводили в отраженном свете. Диаметр зон задержки роста измеряли с точностью до 1 мм. При каждой постановке эксперимента проводили контроль роста тест-культуры на чашке Петри со средой Мюллера-Хинтона, без воздействия электрическим током.

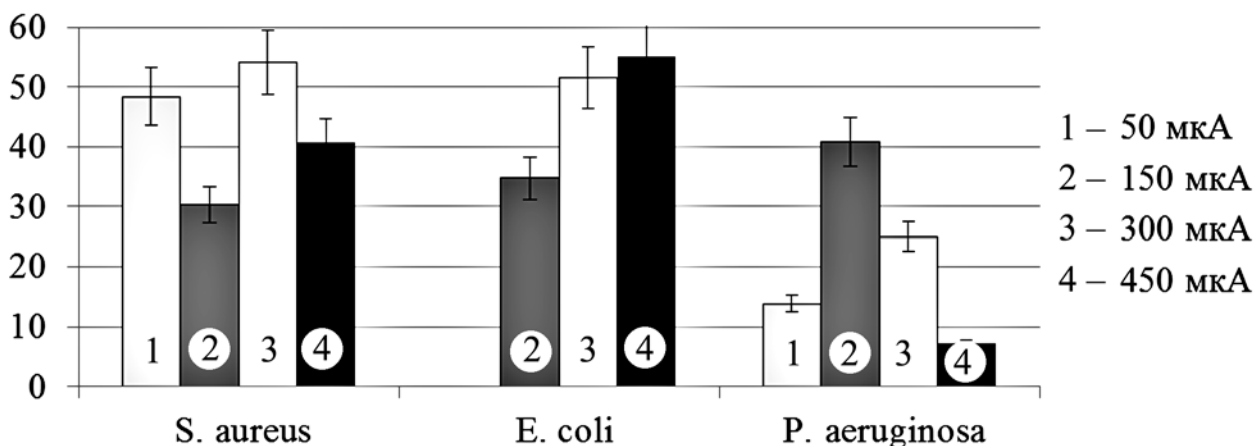


Рис. 3. Зависимость антимикробного эффекта (% по оси OY) от силы тока в культурах микроорганизмов

Анализ результатов экспериментов показал различия для популяций *S. aureus* и *P. aeruginosa* (табл. 1).

Таблица 1

**Диаметр (мм) зоны подавления роста микроорганизмов возле спиц в зависимости от их полярности при воздействии постоянным электрическим током 150 мкА в течение 1 мин (Ме, интерквартильный размах Q1-Q3)**

Штамм	«+» (диаметр, мм)	«-» (диаметр, мм)	Контроль
<i>S. aureus</i>	4,0 (3,8...4,0)*	3,5 (2,3...4,3)*	19 (15...29)
<i>P. aeruginosa</i>	17 (12...33)#	8 (0...13)*	29 (24...33)

Примечания – \* – значимость отличий по отношению к контролю (антибиотики);  $p < 0,05$ ; # – значимость отличий по отношению к «-»,  $p < 0,05$ .

Обнаружено, что антимикробный эффект по отношению к *S. aureus* на обоих полюсах был одинаков и не превышал 4,3 мм. При этих же параметрах было выявлено подавление микробной культуры *P. aeruginosa*. При этом для *P. aeruginosa* более существенный эффект отмечался на положительном электроде. Диаметр полного подавления роста составлял от 12 до 33 мм. Учитывая, что *S. aureus* относится к грамположительным бактериям, а *P. aeruginosa* – к грамотрицательным, можно говорить о том, что зависимость антимикробного эффекта от полюса электрода характерна для грамотрицательных микроорганизмов.

### Заключение

Проведенное исследование показало, что использование имплантируемых металлических медицинских изделий в качестве электродов вызывает антимикробный эффект по отношению к различным патогенным микроорганизмам. При этом обнаружено, что величина такого эффекта зависит от времени экспозиции и вида микроорганизма. Выполненные модельные исследования пока не позволяют определить эффективность такого воздействия *in vivo*, так как оно будет зависеть от параметров среды окружающих тканей. Однако, по нашему мнению, очевидным выводом выполненного исследования является то, что режим воздействия постоянным электрическим током мал по времени (эффектом разрушения изделия можно пренебречь), но достаточен для ингибирования роста бактериальных биопленок вокруг изделий. Эти данные делают возможным применение слабых токов для целей профилактики инфекционных имплант-ассоциированных осложнений в практике ортопедии и травматологии при применении металлических изделий.

Работа выполнена в рамках государственного задания на осуществление научных исследований и разработок ФГБУ «НМИЦ ТО им. академика Г.А. Илизарова» Минздрава России по теме «Персонализация методов диагностики и лечения больных костно-суставной патологией осложненной гнойной инфек-

цией, обеспечивающих стойкое подавление гнойного процесса и восстановление ортопедического статуса».

### Список литературы:

- Бушнев С.В., Загородний Н.В., Бурцев А.В., Стогов М.В., Овчинников Е.Н., Губин А.В. Импортзамещение изделий для травматологии и ортопедии в Российской Федерации. Вызовы и нерешенные проблемы // Гений ортопедии. 2020. Т. 26. № 2. С. 161-165.
- Goriainov V., Cook R., Latham J.M., Dunlop D.G., Oreffo R.O.C. Bone and metal: An orthopaedic perspective on osseointegration of metals // Acta Biomater. 2014. Vol. 10. № 10. PP. 4043-4057.
- Katsuura Y., Qureshi S.A. Additive manufacturing for metal applications in orthopaedic surgery // J. Am. Acad. Orthop. Surg. 2020. Vol. 28. № 8. PP. e349-e355.
- Kaur M., Singh K. Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 2019. Vol. 102. PP. 844-862.
- Guillory R.J. 2nd, Sikora-Jasinska M., Drelich J.W., Goldman J. In vitro corrosion and in vivo response to zinc implants with electropolished and anodized surfaces // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2019. Vol. 11. № 22. PP. 19884-19893.
- Hallock K., Vaughn N.H., Juliano P., Marks J.G.Jr. Metal hypersensitivity and orthopedic implants: Survey of orthopedic surgeons // Dermatitis. 2017. Vol. 28. № 1. PP. 76-80.
- Rony L., Lancigu R., Hubert L. Intraosseous metal implants in orthopedics: A review // Morphologie. 2018. Vol. 102. № 339. PP. 231-242.
- Kumar S., Nehra M., Kedia D., Dilbaghi N., Tankeshwar K., Kim K.H. Nanotechnology-based biomaterials for orthopaedic applications: Recent advances and future prospects // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 2020. Vol. 106. P. 110154.
- Lewallen E.A., Riester S.M., Bonin C.A., Kremers H.M., Dudakovic A., Kakar S., Cohen R.C., Westendorf J.J., Lewallen D.G., van Wijnen A.J. Biological strategies for improved osseointegration and osteoinduction of porous metal orthopedic implants // Tissue Eng. Part B Rev. 2015. Vol. 21. № 2. PP. 218-230.
- Tran P.A., O'Brien-Simpson N., Palmer J.A., Bock N., Reynolds E.C., Webster T.J., Deva A., Morrison W.A., O'Connor A.J. Selenium nanoparticles as anti-infective implant coatings for trauma orthopedics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *epidermidis*: In vitro and in vivo assessment // Int. J. Nanomedicine. 2019. Vol. 14. PP. 4613-4624.
- Гаюк В.Д., Ключин Н.М., Бурнашов С.И. Воспаление мягких тканей вокруг чрескостных элементов и спицевой остеомиелит: литературный обзор // Гений ортопедии. 2019. Т. 25. № 3. С. 407-412.

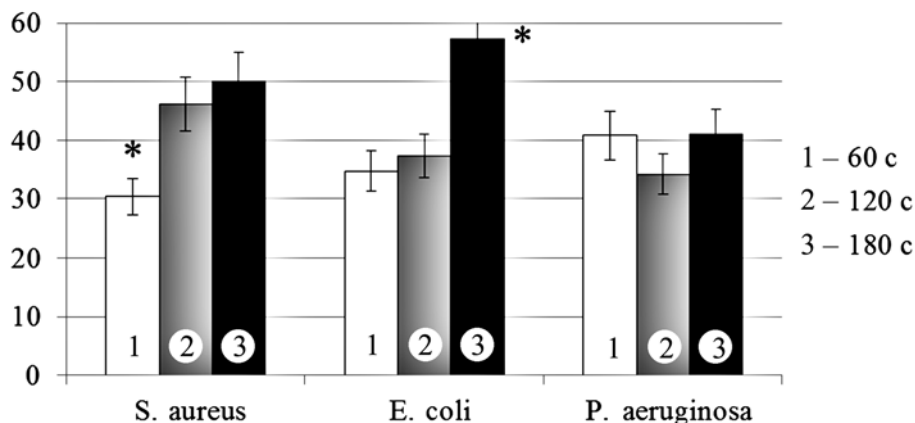


Рис. 4. Зависимость антимикробного эффекта (% по оси OY) от времени экспозиции при 150 мкА в культурах микроорганизмов (\* – статистически значимые отличия от других режимов при  $p < 0,05$ )

12. Солдатов Ю.П., Стогов М.В., Овчинников Е.Н., Губин А.В., Городнова Н.В. Аппарат внешней фиксации конструкции Г.А. Илизарова. Оценка клинической эффективности и безопасности (обзор литературы) // Гений ортопедии. 2019. Т. 25. № 4. С. 588-599.
13. Haseeb M., Butt M.F., Altaf T., Muzaffar K., Gupta A., Jallu A. Indications of implant removal: A study of 83 cases // Int. J. Health Sci. (Qassim). 2017. Vol. 11. № 1. PP. 1-7.
14. Peña-Martinez V., Lara-Arias J., Vilchez-Cavazos F., Álvarez-Lozano E., Montes de Oca-Luna R., Mendoza-Lemus Ó. Interosseous electrostimulation in a model of lengthening with external fixation // Cir. Cir. 2017. Vol. 85. № 2. PP. 127-134.

*Евгений Николаевич Овчинников,*  
зам. директора по научной работе,  
*Наталья Викторовна Годовых,*  
мл. научный сотрудник,  
*Ольга Владимировна Дюрягина,*  
канд. ветеринарн. наук,  
зав. экспериментальной лабораторией,

*Максим Валерьевич Стогов,*  
д-р биолог. наук, доцент,  
ведущий научный сотрудник,  
лаборатория биохимии,  
ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр травматологии  
и ортопедии им. акад. Г.А. Илизарова»  
Минздрава России,  
*Дмитрий Николаевич Овчинников,*  
канд. техн. наук, доцент,  
кафедра «Технические системы и сервис  
в агробизнесе»,  
*Николай Васильевич Овчинников,*  
доцент,  
кафедра «Электрификация и автоматизация  
сельского хозяйства»,  
ФГБОУ ВО «Курганская государственная  
сельскохозяйственная академия  
им. Т.С. Мальцева»,  
г. Курган,  
e-mail: stogo\_off@list.ru

---

**А.А. Аристов, Ю.А. Розенбаум, Г.С. Евтушенко**

## **Разработка автоматизированного метода оценки процесса агглютинации эритроцитов для определения группы крови человека**

### **Аннотация**

Представлен новый метод, позволяющий проводить автоматизированную оценку наличия или отсутствия процесса специфической агглютинации эритроцитов при добавлении к исследуемому образцу цельной крови моноклональных антител с целью определения его групповой принадлежности. Исследование проводится путем фотометрии образцов крови с добавленным в нее реактивом-цоликлоном, сформированных в виде лежащих капель. При этом на капельный образец оказывается механическое вибрационное воздействие, которое способствует лучшей агглютинации клеток и перераспределению их по объему образца. Экспериментально показано достоверное различие в величине фотометрических показателей образцов, в которых присутствует агглютинация, и проб, где ее нет. Данная методика может стать базой для создания автоматизированного портативного устройства для типирования крови.

### **Введение**

Группа крови характеризуется набором антигенов, расположенных на поверхности эритроцитов, которые определяют их специфичность [1]. Существует огромное количество таких антигенов, но наиболее значимыми при переливании крови считаются антигены резус-фактора и системы АВО [2], [3]. Перед любым хирургическим вмешательством, трансплантацией органов, переливанием донорской крови реципиенту необходимо определить группу крови по классификации АВО и резус-фактор [4]-[6]. При переливании несовместимой крови в организме реципиента происходит процесс агглютинации эритроцитов. В результате этого процесса клетки теряют свою функциональную способность, что может привести к летальному исходу. Поэтому неправильный результат анализа должен быть исключен.

Основным, широко распространенным в клинической практике методом определения группы крови человека является метод типирования в прямой реакции гемагглютинации с использованием моноклональных антител [7]. В российской лабораторной практике для типирования крови широко используют моноклональные антитела отечественного производства компании «ГЕМАТОЛОГ» – цоликлоны. Цоликлоны представляют собой солевые растворы моноклональных антител

для обнаружения антигенов эритроцитов человека. Каждый реагент строго специфичен соответствующему антигену. Агглютинация эритроцитов с использованием моноклональных антител – давно рекомендованный метод для определения группы крови, но поскольку оценка результатов теста – наличие или отсутствие агглютинации в образцах – обычно проводится визуально медицинским персоналом, возможны ошибки. Так, в случае слабой агглютинации агрегаты клеток могут быть практически неразличимы визуально и картина агглютинации может проявиться лишь спустя длительное время. Соответственно, такие образцы могут быть приняты за разцы, в которых отсутствует агглютинация. В работе [8] показано, что частота ошибок первичного определения группы крови в лечебных отделениях составляет порядка 0,41...1,16 %. Таким образом, субъективный фактор может привести к неверному результату анализа и фатальному исходу хирургического вмешательства. Также недостатками метода являются большой расход реагентов и продолжительность исследования.

Современные автоматические анализаторы для типирования крови являются стационарными, весьма габаритными устройствами, предназначенными для использования в крупных медицинских центрах. Они основаны на использовании специальных гель-карт. Метод гель-карт включает в себя пробо-