

Wpływ stymulacji impulsowym prądem jednokierunkowym na gojenie złamanej kości udowej u królików

TADEUSZ S. GAŹDZIK, PAWEŁ WŁASZCZUK*, TOMASZ BIELECKI, MAREK BOŻEK, JAN MARCINIAK**

Katedra i Oddział Kliniczny Ortopedii Wydziału Lekarskiego w Zabrze Śląskiej AM, pl. Medyków 1, 41-200 Sosnowiec

*Katedra i Zakład Patomorfologii Wydziału Lekarskiego w Katowicach Śląskiej AM, ul. Medyków 19, 40-096 Katowice

**Centrum Inżynierii Biomedycznej Politechniki Śląskiej, ul. Akademicka 2a, 44-100 Gliwice

Gaździk T. S., Właszczyk P., Bielecki T., Bożek M., Marciniak J.

Influence of unidirectional pulsed electrical current stimulation on femur fracture healing in rabbits

Summary

The failure of the therapy of fractures in the form of a delayed union of the fractured bone or lack of this union, gave rise to research on the best conditions that are essential for a successful regeneration of the bone. The aim of this study was to present a semi-invasive stimulation method in vivo. The femur in 20 rabbits was sawed, and then stabilized by the Mikro-Zespol method. Electrostimulation was not used in the control group. Pulsed unidirectional electrical current of 70 micro A, 25% filled and 1 Hz (mean value 17.5 micro A) was applied in the experimental group to stimulate the fracture area. The animals were clinically and radiologically assessed. Bones of the sacrificed animals were sampled for histological examination. The bone repair process was more advanced in the experimental group in comparison to the control group in early research periods. Any pathologic findings related to cytotoxicity and carcinogenesis were not observed in livers and kidneys of the animals. This is an animal study and further clinical trials are needed to determine whether semi-invasive electrical stimulation method will be able to reduce the rate of bone healing disturbances.

Keywords: electrical field, femur fracture

Procesy gojenia złamań definiuje się jako lawinowy ciąg reakcji komórkowych i biochemicznych zainicjowanych urazem, których celem jest odtworzenie ciągłości i przywrócenie pierwotnej struktury uszkodzonej kości. Przyczyny zaburzeń gojenia kości są zróżnicowane (5, 15, 16, 22). Wśród nich najważniejsze znaczenie odgrywają: niewystarczające ukrwienie i nieadekwatna stabilizacja odłamów. Do pozostałych czynników zalicza się: obecność zbyt szerokiej szczeliny przełomu spowodowanej nadmierną dystrakcją odłamów, nieprawidłową ich pozycję, ubytki kostne, złamanie z fragmentem pośrednim oraz infekcje. Do zakażeń tkanek miękkich i kości dochodzi najczęściej po złamaniach otwartych z powodu zabrudzenia odłamów kostnych i otaczających tkanek miękkich florą bakteryjną (5, 11, 19). Procesy regeneracji tkanki kostnej mogą zaburzać również choroby metaboliczne (cukrzyca) i endokrynologiczne (10, 13, 17, 19).

Do zaburzeń procesu gojenia tkanki kostnej zalicza się: zrost opóźniony, brak zrostu oraz staw rzekomy. Pierwszy polega na przekroczeniu przeciętnego czasu gojenia tj. 6 miesięcy, przy widocznym stałym i wolnym postępie procesów naprawczych. Definicja

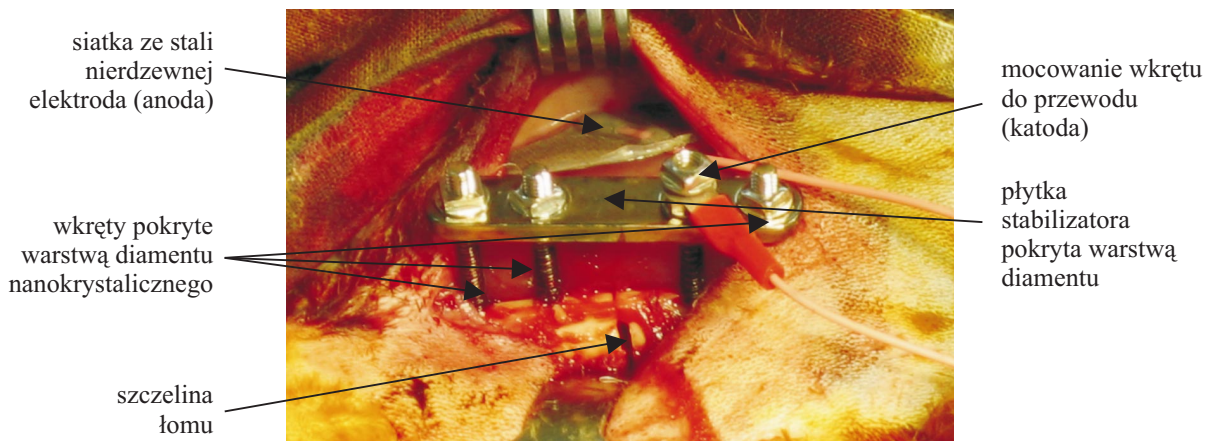
braku zrostu nie została precyzyjnie sformułowana. Ostatnio uważa się, że mamy z nim do czynienia, jeśli nie pojawiają się cechy zrostu, a czas gojenia jest dłuższy od 4-9 miesięcy (5, 11, 22). Stawem rzekomym nazywa się utrwalony brak zrostu. Jego pojawienie jest niezaprzeczalnym dowodem wyczerpania się procesów osteo- i angiogenezy (11). Niepowodzenia leczenia złamań pod postacią zrostu opóźnionego i braku zrostu dotyczą 5-10% złamań u ludzi (5, 16). Dlatego nadal poszukuje się skutecznych metod promujących osteogenezę.

Celem naszych badań było określenie przydatności wspomaganie procesów gojenia tkanki kostnej u królików za pomocą stymulacji impulsowym prądem jednokierunkowym.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono u 20 królików rasy szynszyl. W warunkach sali operacyjnej w znieczuleniu ogólnym przepiłowywano kość udową, a następnie zespolono ją metodą Mikro-Zespol (Micro-Med, Dąbrowa Górnicza, Polska). Wszystkie wkrety pokryto powłoką diamentu nanokrystalicznego (Instytut Technologii Eksploatacji, Radom, Polska).

Króliki podzielono na 2 grupy: kontrolną i doświadczalną po 10 osobników. W pierwszej nie stosowano elektrostymulacji, a w drugiej zrost stymulowano impulsowym prądem jednokierunkowym. Katodę stanowił wkręt znajdujący się w pobliżu



Ryc. 1. Technika zespolenia kości udowej królika aparatem Mikro-Zespol oraz implantacji elektrod

szpary przełomu, którego fragmentu znajdującego się wewnątrz kości udowej nie pokryto warstwą diamentu, a anodę – siatka ze stali nierdzewnej umieszczona pod skórą (ryc. 1).

Okolice złamania była nieprzerwanie stymulowana polem elektrycznym od momentu wszczęcia stymulatora (ryc. 2). Zasilany on był akumulatorkiem i wytwarzał prąd impulsowy jednofazowy z odcięciem składowej stałej o natężeniu 70 μ A, wypełnieniu 25% i częstotliwości 1 Hz (ITAM, Zabrze, Polska). Średnie natężenie prądu wynosiło 17,5 μ A.

W 1., 2., 4., 6., i 24. tygodniu wykonywano badania kliniczne, radiologiczne i histopatologiczne. Eliminacja zwierząt następowała poprzez przedawkowanie Pentobarbitalu po 2 króliki z każdej grupy w danym okresie badawczym. Badania radiologiczne przeprowadzono w Centralnej Zwierzętarzni ŚAM w Katowicach aparatem Multigraph firmy Siemens. Badania histopatologiczne wykonywano w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii ŚAM w Katowicach. Do badań histopatologicznych pobierano fragment wątroby i nerki oraz wycinek kości udowej z miejsca zespolenia; walec o długości 1 cm obejmował okolice złamania pomiędzy najbliższymi położonymi wkrętami. Fragmenty tkanki kostnej utrwalano i odwapniano za pomocą płynu buforowego Tris, a następnie zatapiano w parafinie. Po skrojeniu skrawki barwiono hematoksyliną i eozyną. Preparaty oceniano w mikroskopie Labophot 2 firmy Nikon pod powiększeniem $\times 100$, $\times 200$, i $\times 400$.

Dla oceny stopnia zaawansowania procesów gojenia w badaniu histopatologicznym wprowadzono punktową skalę: 1 – faza tworzenia krwiaka, 1,5 – faza tworzenia krwiaka z cechami indukcji gojenia, 2 indukcja kościotworzenia, 2,5 – faza 2 z ogniskowo występującą fazą zapalną, 3 – faza zapalna, 3,5 – faza zapalna z ogniskowo występującą fazą tworzenia kostniny miękkiej, 4 – faza tworzenia kostniny miękkiej, 4,5 – faza tworzenia kostniny miękkiej z ogniskowo występującą fazą 5, tj. tworzenia kostniny twardej, 5,5 – faza 5 z cechami fazy 6, tj. remodelowania (przebudowy). Wycinki z narządów wewnętrznych (nerka, wątroba) zatapiano w parafinie, a uzyskane skrawki barwiono hematoksyliną i eozyną. Badanie nerek i wątroby miało na celu wykluczenie zmian patologicznych w tych narządach, bowiem mogą one być przyczyną zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz produkcji białek niezbędnych w trakcie gojenia złamań.

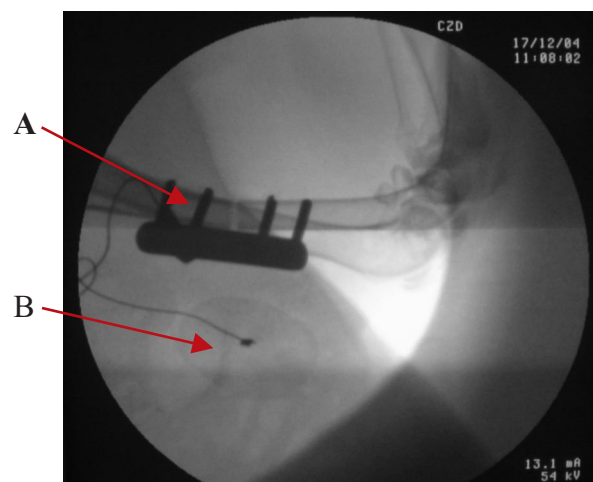
Wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej. Bazę danych utworzono w arkuszu kalkulacyjnym Excel XP firmy Microsoft. Ocenę statystyczną dokonano przy użyciu programu Statistica for Windows wersja 6.1, stosując test Manna-Whitneya (Statsoft, Kraków, Polska).



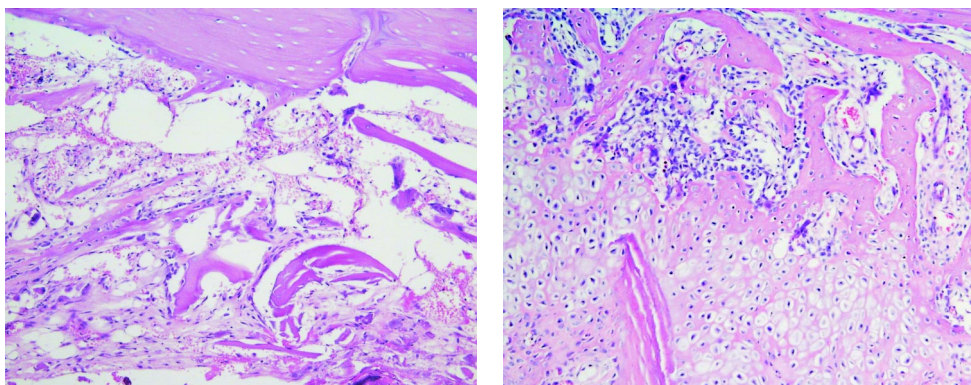
Ryc. 2. Sposób mocowania elektrostymulatora do skóry na grzbiecie królika

Wyniki i omówienie

Zwierzęta przyjmowały wodę i pokarm bez ograniczeń oraz przybierały na wadze. Rany operacyjne u 18 królików wygoiły się bez powikłań. Jedynie u 2 zwierząt w grupie doświadczalnej pojawił się powierzchowny ropień. U wszystkich królików (badanych i kontrolnych) z tygodniowym okresem przeżycia nie stwierdzono zrostu kostnego (ryc. 3). Po 2 tygodniach po



Ryc. 3. Radiogram kości udowej królika w 1. tygodniu doświadczenia. Widoczne zespolenie Mikro-Zespo: katoda (A) i anoda (B)



Ryc. 4. Zaawansowanie procesów przebudowy tkanki kostnej w miejscu złamania w 4. tygodniu doświadczenia. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Powiększenie $\times 100$. A – grupa kontrolna; B – grupa doświadczalna

operacji na radiogramach w grupie doświadczalnej zaobserwowano zacinienie między odłamami kostnymi świadczące o toczącym się procesie gojenia, w grupie kontrolnej tych zmian nie stwierdzono. Po 4 i 6 tygodniach u królików z grupy doświadczalnej w obrazie radiologicznym obserwowano bardziej zaawansowane procesy gojenia niż w grupie kontrolnej. Po 24 tygodniach różnice te uległy zatarciu. W obu badanych grupach zrost kostny z przebudową miejsca złamania pojawił się po 24 tygodniach od operacji. Stopień zaawansowania procesów gojenia tkanki kostnej wyznaczony na podstawie obrazu histopatologicznego został przedstawiony w tabeli 1. Do 6. tygodnia po operacji były one bardziej zaawansowane w grupie doświadczalnej ($p \leq 0,01$) (ryc. 4). W 24. tygodniu obserwacji różnice pomiędzy grupami były nieznaczne ($p = 0,256840$).

W badaniu mikroskopowym nerek i wątroby nie stwierdzono zmian histopatologicznych. Nieznaczne ich przekrwienie należy tłumaczyć sposobem eutanazji. Przedawkowanie Pentobarbitalu prowadzi bowiem do niewydolności krążeniowo-oddechowej, która może być przyczyną powstania w nich przekrwienia.

Istnieje wiele sposobów wspomagania procesów gojenia kości. Można je podzielić na dwie główne grupy: biologiczne i fizyczne (6, 7). Do pierwszej zalicza się podanie do szczeliny złamania czynników wzrostu, białek morfogenetycznych kości lub komórek multipotencjalnych (2). Do drugiej należy stymulacja mechaniczna, elektro- i magnetostymulacja (20, 21).

W 1953 Ivan Yasuda (24) opisał zjawisko występowania potencjału elektrycznego na powierzchni kości w zależności od jej naprężenia. Nazwał je piezoelektrycznością. Basset (1), badając polaryzację kości pod wpływem odkształcenia, stwierdził, że w miejscu jej ściskania powstają ładunki ujemne, a rozciągania – dodatnie. Najnowsze doniesienia próbują wyjaśnić wpływ sił mechanicznych na regenera-

cję kości na poziomie komórkowym (3, 4, 18). W 2003 Petrov i Pollack (18) zaobserwowali, że powtarzane obciążenie stymuluje przepływ płynu kanalikowego wewnątrz osteocytów oraz wzdłuż ich wypustek komórkowych. W przypadku niewystarczającego przepływu jonów osteocyty stymulują funkcję osteoklastów, a przy przepływach o większej intensywności – osteoblastów. Należy jednak pamiętać, że przy zbyt dużym i wczesnym obciążeniu może

dojść do uszkodzenia powstającej kostniny oraz braku zrostu. W warunkach klinicznych określenie wielkości optymalnego obciążenia w trakcie gojenia kości jest bardzo trudne i wymaga ścisłej współpracy chorego z lekarzem (7).

Celem odtworzenia kontrolowanej różnicy napięć na powierzchniach kości powstałych pod wpływem obciążenia mechanicznego zaczęto wykorzystywać

Tab. 1. Punktowa skala dla oceny stopnia zaawansowania procesów gojenia w badaniu histopatologicznym

Grupa kontrolna	Okresy badawcze				
	Lp.	1 (tydzień)	2 (tydzień)	4 (tydzień)	6 (tydzień)
1	2	2,5	2,5	5	5,5
2	2,5	2,5	3	5	6
3	2	2,5	3	5	6
4	2	2,5	2,5	4,5	5,5
5	2	2	2,5	4,5	6
6	2,5	2,5	3	5	6
7	2,5	2,5	3	5	6
8	2	2	2,5	5	5,5
9	2	2,5	3	5	6
10	2	2,5	2,5	4,5	6
Grupa doświadczalna	Okresy badawcze				
Lp.	1 (tydzień)	2 (tydzień)	4 (tydzień)	6 (tydzień)	24 (tydzień)
11	3	3,5	5	5,5	6
12	3	3,5	5	5,5	6
13	3	3,5	4,5	6	6
14	3	4	5	5,5	6
15	3	3	4,5	6	6
16	3	4	5	5,5	6
17	3,5	4	5	6	6
18	3,5	4,5	4,5	6	6
19	3	4	4,5	5,5	6
20	3	3,5	4,5	6	6

pole elektryczne i magnetyczne (3, 8, 20, 21). Pierwsze badania z zastosowaniem prądu stałego miały na celu określenie optymalnych jego parametrów dla pobudzenia procesów gojenia złamania (8). Friedenberga i wsp. (10) wykazali, że pod wpływem działania jednokierunkowego prądu stałego o natężeniu 1-20 μA pojawia się osteogeneza w pobliżu katody oraz osteoliza w pobliżu anody. Stwierdzono, że proces osteogenezy w największym stopniu stymuluje prąd o natężeniu 20 μA . Poniżej i powyżej tej wartości wpływ prądu na kościotworzenie ulega zmniejszeniu, a prąd o natężeniu 50 μA wywołuje osteolizę (6, 10). W naszych badaniach zastosowaliśmy impulsowy prąd jednokierunkowy o natężeniu 70 μA , w którym kość przez 250 ms była stymulowana polem elektrycznym, a na 750 ms przerwano jego działanie. W przeciwieństwie do powyższych badań zaobserwowaliśmy, że impulsowy prąd jednokierunkowy o natężeniu wyższym niż 50 μA przyspiesza procesy gojenia tkanki kostnej. Średnie natężenie prądu wynosiło 17,5 μA i, naszym zdaniem, to ono najprawdopodobniej odpowiada za aktywność procesów gojenia.

W dostępnej literaturze znaleźliśmy tylko jedną pozycję piśmiennictwa, w której użyto prądu jednokierunkowego o zmiennej amplitudzie. Hamanishi i wsp. (12) wykonali osteotomię kości piszczelowej, stabilizując złamanie z pozostawieniem szczeliny przelomu wynoszącej 1 cm. Stosując prąd impulsowy o natężeniu 20 μA przez 40 dni 12 godzin dziennie, uzyskali statystycznie znamienne przyspieszenie procesów gojenia.

W badaniach Inana i wsp. (14), po wywierceniu otworu w kości piszczelowej u królika, nie potwierdzono wpływu prądu jednokierunkowego na szybkość neoangiogenezy. Autorzy ci jednak zwracają uwagę, iż w badaniach wykorzystali prąd o natężeniu 10 μA . Wydaje się, iż jest on zbyt mały, aby mógł skutecznie indukować procesy gojenia. El-Hakim i wsp. (9) podczas osteogenezy dystrykcyjnej żuchwy u kóz wykazali pozytywny wpływ prądu o natężeniu 10 μA na procesy przebudowy tkanki kostnej. Należy jednak pamiętać, iż żuchwa jest kością płaską.

Większość autorów stosuje stymulatory wytwarzające prąd jednokierunkowy wszczepiane pod tkankę podskórną (6, 8, 14). Metoda ta wymaga jednak wykonania dwóch zabiegów operacyjnych celem wszczepienia i usunięcia stymulatora. Dlatego obecnie szuka się mniej inwazyjnych metod leczenia. W naszym przypadku zastosowaliśmy metodę pólnwazyjną.

W naszej Klinice Ortopedii została opracowana metoda zespolenia złamanej piszczeli za pomocą pokrytego diamentem nanokrystalicznym stabilizatora zewnętrznego Polfix (23). Dzięki temu katodę może stanowić zastosowany do stabilizacji złamania wkreślony, natomiast anodę siatka położona na skórze po przeciwnej stronie złamania. W metodzie tej nie zachodzi konieczność wszczepiania elektrody, a elektrostymulacja może zostać wdrożona na każdym etapie leczenia.

Uzyskane przez nas wyniki jednoznacznie potwierdziły pozytywny wpływ impulsowego prądu jednokierunkowego na przyspieszenie procesów gojenia tkanki kostnej u królika. Wieloosrodkowa współpraca w ramach prowadzonego projektu badawczego MNiSW Nr 3P05C00725 zaowocowała stworzeniem elektrostymulatora do prowadzenia dalszych badań klinicznych. Praktyczne zastosowanie elektrostymulacji jako metody wspomagającej i intensyfikującej tworzenie zrostu kostnego u pacjentów oddziałów urazowo-ortopedycznych, umożliwi, naszym zdaniem, skrócenie hospitalizacji oraz obniży liczbę powikłań i koszty leczenia.

Piśmiennictwo

1. Basset C. A.: The development and application of pulsed electromagnetic fields for ununited fractures and arthrodeses. *Clin. Plast. Surg.* 1985, 12, 259-277.
2. Bielecki T., Gaździk T. S., Szczepanski T.: Re: „The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing”. What do we use: Platelet-rich plasma or platelet-rich gel? *Bone* 2006, 39, 1388.
3. Brighton C. T., Wang W., Seldes R., Zhang G., Pollack S.: Signal transduction in electrically stimulated bone cells. *J. Bone Joint Surg.* 2001, 83A, 1514-1523.
4. Chen Y. J., Wurtz C. J., Wang C. J., Kuo Y. R., Yang K. D., Huang H. C., Wang F. S.: Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF- β 1 and VEGF in early stage of shock wave – promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J. Orthop. Res.* 2004, 22, 526-534.
5. Chi-Chuan W., Wen-Jer C.: A revised protocol for more clearly classifying a nonunion. *J. Orthop. Surg.* 2000, 8, 45-52.
6. Deszczyński J., Szczepński G.: Proces zrostu kości – patofizjologia i zagadnienia kliniczne. Przebieg zrostu kostnego oraz czynniki fizyczne warunkujące jego wystąpienie. *Ortop. Traum. Rehab.* 2000, 4, 24-29.
7. Duncan R., Turner C.: Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif. Tissue Int.* 1995, 57, 344-358.
8. Dwyer N., Matthews B.: The electrical response to stress in dead, recently excised and living bone. *Injury* 1970, 4, 279-284.
9. El-Hakim I. E., Azim A. M., El-Hassan M. F., Maree S. M.: Preliminary investigation into the effects of electrical stimulation on mandibular distraction osteogenesis in goats. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2004, 33, 42-47.
10. Friedenberga Z. B., Harlow M. C., Happenstall R. B., Brighton C. T.: The cellular origin of bioelectric potentials in bone. *Calcif. Tissue Res.* 1972, 13, 53-59.
11. Gaździk T. S.: Zakażenia w ortopedii. Urban&Partner, Wrocław 2005, 4-166.
12. Hamanishi C., Kawabata T., Yoshii T., Tanaka S.: Bone mineral density changes in distracted callus stimulated by pulsed direct electrical current. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1995, 312, 247-252.
13. Hannouche D., Petite H., Sedel L.: Current trends in the enhancement of fracture healing. *J. Bone Joint Surg.* 2001, 83, 157-164.
14. Inan M., Alat I., Gurses I., Kekilli E., Kutlu R., Eskin A., Aydin O. M., Bostan H., Yologlu S.: Induced angiogenesis with intramedullary direct current: experimental research. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005, 288, H705-709.
15. Kenwright J., Goodship A.: Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. *Clin. Orthop.* 1988, 241, 36-47.
16. Lieberman J. R., Duluisi A., Einhorn T. A.: Current concepts review. The role of growth factors in the repair of bone. *J. Bone Joint Surg.* 2002, 84, 1032-1044.
17. Ohlsson C., Bengtsson B. A., Isaksson O. G., Andreassen T. T., Słotweg M. C.: Growth hormone and bone. *Endocrine Rev.* 1998, 19, 55-79.
18. Petrov N., Pollack S.: Comparative analysis of diffuse and stress induced nutrient transport efficiency in the lacunar-canalicular system of osteons. *Biorheology* 2003, 40, 347-353.
19. Rubin C., Lanyon L.: Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcif. Tissue Int.* 1985, 37, 411-417.
20. Ryaby J. T.: Clinical effects of electromagnetic and electric fields on fracture healing. *Clin. Orthop.* 1998, S335, 205-215.
21. Sieroń A.: Zastosowanie pól magnetycznych w medycynie. α -medica press, Bielsko-Biała 2002, 132-135.
22. Skinner H.: Current diagnostic and treatment in orthopaedics. The McGraw-Hill Companies, Irvine 2003, 81-82.
23. Sużalek M.: Zastosowanie w stabilizatorze POLFIX wkreślonych pokrytych warstwą diamentu nanokrystalicznego w leczeniu złamań trzonu kości piszczelowej. Rozprawa doktorska, Śląska Akademia Medyczna, Katowice 2006.
24. Yasuda I., Noguchi K.: Dynamic callus and electric callus. *J. Bone Joint Surg.* 1955, 37A, 1292-1297.