

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.110871>

# Модель клебсиеллёзно-кандидозного артрита на крысах линии Wistar

Е.И. Данилова<sup>1</sup>, А.П. Фисенко<sup>2</sup>, А.А. Стадников<sup>1</sup>, Н.Б. Перунова<sup>3</sup>, Е.В. Иванова<sup>3</sup>,  
И.Н. Чайникова<sup>3</sup>, О.Е. Челпаченко<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, Российская Федерация;

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup> Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Российская Федерация

## АННОТАЦИЯ

**Цель** — разработка модели клебсиеллёзно-кандидозного артрита на крысах линии Wistar.

**Материал и методы.** Исследование выполнено на 20 крысах-самцах линии Wistar, из которых 15 животным вводили в полость скакательного (заплюсневое) сустава клебсиеллёзно-кандидозную взвесь (1:1) с концентрацией микроорганизмов  $10^6$  КОЕ/мл, с использованием музейных штаммов *Klebsiella pneumoniae* ICIS-278, *Candida albicans* ATCC 24433 под контролем рентгеновского аппарата и дигитайзера FireCR+. Группа контроля — 5 интактных животных. На 15-е сутки эксперимента после эвтаназии проведены бактериологическое и гистологическое исследования поражённых суставов с сохранением их топографии.

**Результаты.** У крыс, заражённых клебсиеллёзно-кандидозной взвесью, на 2–3-и сутки отмечали болевой синдром и типичные для артрита функциональные изменения. При бактериологическом исследовании поражённых суставов у 75% животных выделена культура *K. pneumoniae*, идентичная, по данным полимеразной цепной реакции, исходному штамму, входящему в состав бактериально-грибковой взвеси. В то же время грибы рода *Candida*, также используемые в эксперименте при заражении крыс, не высевались из тканей поражённых суставов. Воспроизведённая модель клебсиеллёзно-кандидозного артрита характеризуется патоморфологическими признаками панартрита, сопровождающегося гнойным воспалением всех тканей сустава (хрящевой и костной, синовиальной оболочки) с вовлечением мягких околосуставных тканей.

**Заключение.** Представленная модель клебсиеллёзно-грибкового артрита может использоваться для тестирования новых средств антимикробной (антибактериальной и антигрибковой) терапии — неотъемлемого компонента лечения инфекционных артритов.

**Ключевые слова:** эксперимент; крысы; клебсиеллёзно-кандидозный артрит.

## Как цитировать:

Данилова Е.И., Фисенко А.П., Стадников А.А., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Чайникова И.Н., Челпаченко О.Е. Модель клебсиеллёзно-кандидозного артрита на крысах линии Wistar // Морфология. 2022. Т. 160, № 1. С. 5–10. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.110871>

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.110871>

## ***Klebsiella–Candida* arthritis model in Wistar rats**

Elena I. Danilova<sup>1</sup>, Andrey P. Fisenko<sup>2</sup>, Aleksandr A. Stadnikov<sup>1</sup>, Natalya B. Perunova<sup>3</sup>,  
Elena V. Ivanova<sup>3</sup>, Irina N. Chaynikova<sup>3</sup>, Olga E. Chelpachenko<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation;

<sup>2</sup> National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation;

<sup>3</sup> Orenburg Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

### **ABSTRACT**

**AIMS:** To develop a *Klebsiella–Candida* arthritis model of Wistar rats.

**MATERIAL AND METHODS:** This study was carried out on 20 male Wistar rats, of which 15 were injected with a bacterial–fungal suspension into the cavity of the hock (tarsus) joint. Specifically, the rats were injected with *Klebsiella–Candida* suspension (1:1) with a microbial concentration of 10<sup>6</sup> CFU/ml prepared by using the museum strains *Klebsiella pneumoniae* ICIS-278 and *Candida albicans* ATCC 24433 under the control of an X-ray apparatus and digitizer FireCR+. Five intact animals served as the control. On day 15 of the experiment, a bacteriological and histological examination of the affected joints was carried out while maintaining topography after euthanasia.

**RESULTS:** In rats infected with the *Klebsiella–Candidiasis* suspension, pain syndrome and functional changes typical of arthritis were noted on days 2–3. The bacteriological examination of the affected joints in 75% of rats isolated *K. pneumoniae* cultures that were identical, according to polymerase chain reaction, to the original strain that was part of the bacterial–fungal suspension. At the same time, fungi of the genus *Candida*, which was also used in the experiment to infect animals, were not detected in the affected joints of rats. The established model of *Klebsiella–Candida* arthritis was characterized by the pathomorphological signs of panarthritis accompanied by the purulent inflammation of all joint structures (synovial membrane, cartilage, and bone tissue) with the involvement of soft periarticular tissues.

**CONCLUSION:** The model of *Klebsiella* and fungal arthritis presented by this work can be used to test new means of antimicrobial (antibacterial and antifungal) therapies, which are an integral component of the treatment of infection-associated arthritis.

**Keywords:** experiment; rats; *Klebsiella–Candida* arthritis.

### **To cite this article:**

Danilova EI, Fisenko AP, Stadnikov AA, Perunova NB, Ivanova EV, Chaynikova IN, Chelpachenko OE. *Klebsiella–Candida* arthritis model in Wistar rats. *Morphology*. 2022;160(1):5–10. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.110871>

Received: 11.09.2022

Accepted: 08.10.2022

Published: 16.12.2022

## ВВЕДЕНИЕ

Наряду с бактериальным фактором, нередкая причина инфекционного артрита — дрожжеподобные грибы. Самым частым грибковым патогеном считается *C. albicans* [1]. Известно, что к артритогенным микроорганизмам относятся энтеробактерии рода *Klebsiella spp.*, обладающие антигеном HLA-B27 и потому способные к феномену антигенной мимикрии. В 2018 г. появились данные о высокой аффинности пептидов клеточной стенки грибов рода *Candida* к HLA-B27-антигену, что ранее было доказано в отношении клебсиелл [2]. В связи с этим представляется целесообразным создание экспериментальной модели инфекционного артрита.

**Цель исследования** — разработка модели клебсиеллёзно-кандидозного артрита на крысах линии Wistar для определения эффективности антибактериальных и антимикотических препаратов — неотъемлемых компонентов лечения инфекционных артритов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 20 крысах — взрослых самцах линии Wistar массой  $350 \pm 20$  г, из которых 15 животным вводили бактериально-грибковую взвесь. Группа контроля — 5 интактных крыс.

Длительность эксперимента — 15 сут (с ежедневным наблюдением за животными). В первые сутки эксперимента крысам под наркозом (ксилазин внутримышечно в дозе 0,05 мл/кг массы тела и препарат Zoletil-50 в дозе 0,5 мг/кг массы тела) вводили бактериально-грибковую взвесь в дозе 0,125 мл в суставную полость скакательного сустава (заплюсневый сустав из блока костей голени, плюсны и проксимального конца плюсневых костей) правой задней конечности под контролем рентгеновского аппарата и дигитайзера FireCR+ (3DISC, Франция). Для получения бактериально-грибковой взвеси использовали музейные штаммы *K. pneumoniae* ICIS-278 и *C. albicans* из коллекции ATCC 24433. Культуры *K. pneumoniae* и *C. albicans* выращивали на плотной питательной среде: агар Шедлера (Schaedler Agar; BBL, США) и Бигги-агар (Bi.G.G.Y. Agar, Nickerson Agar; HiMedia, Индия) при 37 °C в течение 24 ч, с последующим приготовлением взвеси с концентрацией микроорганизмов  $10^6$  КОЕ/мл.

**Критерии оценки артрита:**

- изменения в поведении крыс;
- симптомокомплекс (воспаление и болезненные проявления) в поражённых суставах, определяемый при осмотре;
- нарушение движения в инфицированных суставах;
- патоморфологические изменения в суставах.

После эвтаназии животных под эфирным наркозом исследуемые суставы обработали спиртом, вскрыли

суставную полость стерильными скальпелем и ножницами, провели бактериологический посев бактериологической петлёй с суставной поверхности на чашки Петри со следующими средами: агар Эндо (Endo Agar), кровяной и агар Никерсона (Bi.G.G.Y. Agar).

Для гистологического исследования взяты отсепарированные скакательные суставы с максимальным сохранением топографии. Декальцинацию кусочков проводили в 25% растворе Трилона Б с добавлением 40% раствора NaOH в течение 1 мес. В дальнейшем объекты подвергали дегидратизации в спиртах возрастающей концентрации и заливали в целлоидин-парафин. Срезы толщиной 5–6 мкм, изготовленные на ротационном микротоме МПС-2 («Точмедприбор», Украина), после депарафинирования окрашивали гематоксилином Майера и эозином, а также по Граму — для дифференциации бактерий.

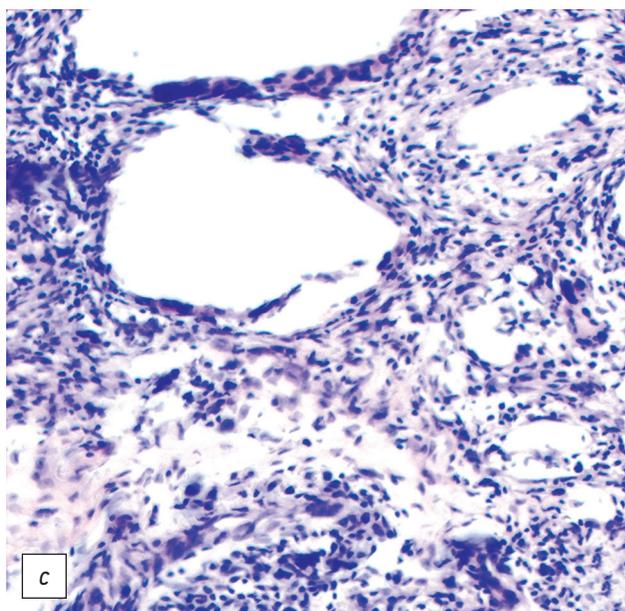
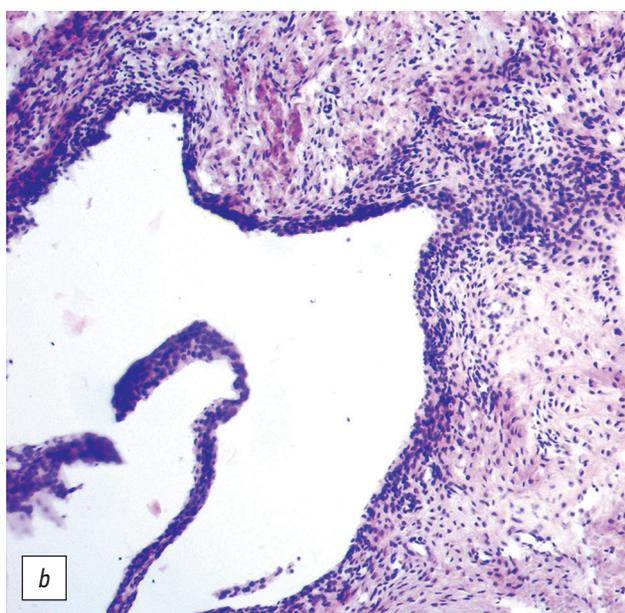
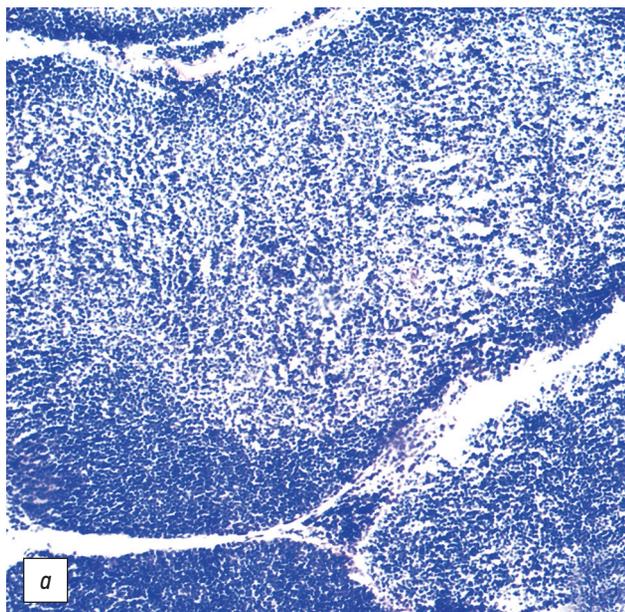
### Этическая экспертиза

Информация о результатах проверки протокола исследования: локальный этический комитет Оренбургского государственного медицинского университета (протокол № 151 от 19.10.2016) подтверждает, что данный эксперимент проводился согласно Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к Приказу Минздрава СССР от 12 августа 1977 г. № 755) и был одобрен, а статья соответствует требованиям, предъявляемым к подобным публикациям, и оба не противоречат законодательству Российской Федерации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На 2-е сутки после заражения крысы становились малоподвижными, на поражённую конечность наступали с осторожностью, при пальпации отдергивали её; выявлена местная гипертермия. Средняя окружность скакательного сустава на 3-и сутки после заражения увеличилась с  $8,2 \pm 0,3$  до  $23,1 \pm 0,4$  мм. В контрольной группе поведение животных было обычным, суставного синдрома не отмечалось.

На 15-е сутки, после эвтаназии животных и вскрытия полости поражённых суставов, выполнено бактериологическое исследование суставов: у 75% крыс обнаружены грамотрицательные бактерии *K. pneumoniae*, идентичность исходному штамму, входящему в состав бактериально-грибковой взвеси, подтверждена данными полимеразной цепной реакции. Однако дрожжевые грибы рода *Candida*, также используемые при заражении крыс, не высевались из поражённых суставов. Этот феномен можно объяснить разнонаправленностью межмикробных взаимоотношений *K. pneumoniae* и *C. albicans*, что может проявляться, например, в стимулирующем эффекте грибов в отношении



антилизоцимной активности клебсиелл, являющейся одним из факторов выживания (персистенции) бактерий в организме хозяина [3].

Данные гистологического исследования представлены на рис. 1. В полости заплюсневого сустава выявлены отёчная жидкость, выраженный отёк тканевых структур суставной сумки и полнокровие синовиальной оболочки с полиморфно-клеточной инфильтрацией, с преобладанием лимфоцитов и множественными васкулами (рис. 1, *a*).

Необходимо отметить, что при клебсиеллёзно-кандидозном артрите наблюдается выраженная дезорганизация соединительнотканых структур суставной сумки. Синовиальная оболочка резко утолщена, отёчна, гиперемирована. Ворсины её подвергнуты гиперплазии, покрыты фибринозным экссудатом, пропитаны нейтрофильными гранулоцитами, лимфоцитами и макрофагами. Дистрофические изменения в стенках сосудов проявляются развитием васкулита, панартериита и периартериита в синовиальной оболочке.

Модель клебсиеллёзно-кандидозного артрита отличается выраженным разрушением суставных хрящей с формированием очагов некроза на суставной поверхности и резорбцией субхондральной костной ткани. При этом отмечаются узурсы (эрозии), фиброзные спайки, аномальные очаги хондро- и остеогенеза. Воспроизведённая модель характеризуется также развитием мелкоочаговых гнойно-некротических процессов в гиподерме и дерме околоуставной области, с наличием микроабсцессов и остеомиелита в костных структурах диафиза (рис. 1, *b*). Описанные выше изменения свидетельствуют о формировании на суставной поверхности грануляционной ткани в виде паннуса, приводящего к фиброному анкилозу сустава (рис. 1, *c*).

**Рис. 1.** Гистологические изменения в тканях поражённых суставов крыс с модельным артритом (срез заплюсневого сустава; окраска — гематоксилин Майера и эозин; окуляр —  $\times 10$ , объектив —  $\times 20$ ): *a* — полиморфно-клеточная инфильтрация суставной сумки; *b* — признаки остеомиелита в костных структурах диафиза; *c* — формирование паннуса за счет инфильтрации синовиальной оболочки клетками грануляционной ткани. Масштабный отрезок — 20 мкм.

**Fig. 1.** Histological changes in the tissues of the affected joints of the rat model of arthritis (section of the ankle joint; stained with Mayer's hematoxylin and eosin; eyeglass  $\times 10$ , lens  $\times 20$ ): *a* — polymorphocellular infiltration of the joint capsule; *b* — signs of osteomyelitis in the bone structures of the diaphysis; *c* — formation of the pannus due to synovial membrane infiltration by granulation tissue cells. Scale bar of 20  $\mu\text{m}$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическая оценка патологических изменений суставов крыс при клебсиеллёзно-кандидозном артрите, используемая в данной работе, соответствует известным гистологическим критериям [4, 5]. Особенность данной модели — патоморфологические признаки, характерные для панартрита, с гнойным воспалением всех тканей сустава (синовиальной, хрящевой и костной) и вовлечением мягких околоуставных тканей.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная модель клебсиеллёзно-грибкового артрита может использоваться для тестирования новых средств антимикробной терапии — неотъемлемого компонента лечения инфекционных артритов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bariteau J.T., Waryasz G.R., McDonnell M., et al. Fungal osteomyelitis and septic arthritis // *J Am Acad Orthop Surg*. 2014. Vol. 22, N 6. P. 390–401. doi: 10.5435/JAAOS-22-06-390
2. Laurence M., Asquith M., Rosenbaum J.T. Spondyloarthritis, acute anterior uveitis, and fungi: updating the Catterall-King hypothesis // *Front Med (Lausanne)*. 2018. Vol. 5. N 80. P. 1–17. doi: 10.3389/fmed.2018.00080
3. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микросимбиоз. Екатеринбург : УрО РАН, 2014. 260 с.

## REFERENCES

1. Bariteau JT, Waryasz GR, McDonnell M, et al. Fungal osteomyelitis and septic arthritis. *J Am Acad Orthop Surg*. 2014;22(6):390–401. doi: 10.5435/JAAOS-22-06-390
2. Laurence M, Asquith M, Rosenbaum JT. Spondyloarthritis, acute anterior uveitis, and fungi: updating the Catterall-King hypothesis. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5(80):1–17. doi: 10.3389/fmed.2018.00080
3. Bukharin OV, Perunova NB. *Microsymbiogenesis*. Ekaterinburg: UrO RAN; 2014. 260 p. (In Russ).

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Источник финансирования.** Подготовка и публикация настоящей статьи проведена без спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

## ADDITIONAL INFO

**Funding source.** This study and publication was not supported by any external sources of funding.

**Competing interests.** The authors declare that they have no competing interests.

**Author contribution.** All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication).

4. Крылов П.А., Несмеянова Е.Н., Терпиловский А.А., Новочадов В.В. Морфология тибioфemorального сустава крысы при экспериментальном остеоартрозе: 3D-реконструкция на основе техники высокоточного сошлифовывания // *Журнал анатомии и гистопатологии* 2017. Т. 6, № 3. С. 44–49. doi: 10.18499/2225-7357-2017-6-3-44-49
5. Мужикян А.А., Шекунова Е.В., Кашкин В.В., и др. Гистологическая оценка патологических изменений суставов при различных способах индукции хронического артрита у крыс // *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018. № 1. С. 32–45. doi: 10.29296/2618723X-2018-01-04

4. Krylov PA, Nesmeyanova EN, Terpilovskiy AA, Novochadov VV. Morphology of tibiofemoral joint in rats with experimental osteoarthritis: 3D-reconstruction, based on the technology of high-precision grinding. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2017;6(3):44–49. (In Russ). doi: 10.18499/2225-7357-2017-6-3-44-49
5. Muzhikyan AA, Shekunova EV, Kashkin VV, et al. Histological assessment of pathological changes in the joints in different ways of induction of chronic arthritis in rats. *Laboratory animals for scientific research*. 2018;(1):32–45. (In Russ). doi: 10.29296/2618723X-2018-01-04

## ОБ АВТОРАХ

\* **Данилова Елена Ивановна**, к.м.н., доцент;  
адрес: Россия, 460000, Оренбург, ул. Советская, д. 6;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0910-6525>;  
eLibrary SPIN: 5708-1580; e-mail: [danilowa@list.ru](mailto:danilowa@list.ru)

**Фисенко Андрей Петрович**, д.м.н., профессор;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8586-7946>;  
eLibrary SPIN: 4397-6291; e-mail: [info@nczd.ru](mailto:info@nczd.ru)

**Стадников Александр Абрамович**, д.б.н., профессор;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6107-0534>;  
eLibrary SPIN: 7678-7721; e-mail: [k\\_histology@orgma.ru](mailto:k_histology@orgma.ru)

**Перунова Наталья Борисовна**, д.м.н., профессор РАН, доцент;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6352-8879>;  
eLibrary SPIN: 9625-1578;  
e-mail: [icis-ofrc@list.ru](mailto:icis-ofrc@list.ru)

**Иванова Елена Валерьевна**, д.м.н., доцент;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4974-8947>;  
eLibrary SPIN: 9731-7094; e-mail: [walerewna13@gmail.com](mailto:walerewna13@gmail.com)

**Чайникова Ирина Николаевна**, д.м.н., профессор;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8923-8829>;  
eLibrary SPIN: 8998-5241; e-mail: [inchainicova@yandex.ru](mailto:inchainicova@yandex.ru)

**Челпаченко Ольга Ефимовна**;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6719-5805>;  
eLibrary SPIN: 2599-5377; e-mail: [oech57@gmail.com](mailto:oech57@gmail.com)

## AUTHORS' INFO

\* **Elena I. Danilova**, MD, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor;  
address: 6 Sovetskaya street, 460000 Orenburg, Russia;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0910-6525>;  
eLibrary SPIN: 5708-1580; e-mail: [danilowa@list.ru](mailto:danilowa@list.ru)

**Andrey P. Fisenko**, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8586-7946>;  
eLibrary SPIN: 4397-6291; e-mail: [info@nczd.ru](mailto:info@nczd.ru)

**Aleksandr A. Stadnikov**, Dr. Sci. (Biol.), Professor;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6107-0534>;  
eLibrary SPIN: 7678-7721; e-mail: [k\\_histology@orgma.ru](mailto:k_histology@orgma.ru)

**Natalya B. Perunova**, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor  
of the Russian Academy of Sciences, Associate Professor;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6352-8879>;  
eLibrary SPIN: 9625-1578; e-mail: [icis-ofrc@list.ru](mailto:icis-ofrc@list.ru)

**Elena V. Ivanova**, MD, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4974-8947>;  
eLibrary SPIN: 9731-7094; e-mail: [walerewna13@gmail.com](mailto:walerewna13@gmail.com)

**Irina N. Chaynikova**, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8923-8829>;  
eLibrary SPIN: 8998-5241; e-mail: [chainicova@yandex.ru](mailto:chainicova@yandex.ru)

**Olga E. Chelpachenko**;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6719-5805>;  
eLibrary SPIN: 2599-5377; e-mail: [oech57@gmail.com](mailto:oech57@gmail.com)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author