

УДК 615.465-034.721:616-092.4](045)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872018147-52>

Антибактериальные свойства модифицированного магниевого сплава *in vitro*

В. Н. Черный, Е. В. Яцун, Н. Н. Полищук, А. М. Камышний, М. Л. Головаха

Запорожский государственный медицинский университет. Украина

Infection complications after osteosynthesis happen in 5.3–75.4 % of cases, among them posttraumatic osteomyelitis — in 3–24 % after open and 1–7 % — after surgery of closed fractures. The main infectious agents of surgical site infection are Staphylococcus species. Objective: to assess antimicrobial activity of disintegration products of modified magnesium alloy ML-10 as for S. aureus. Methods: in the experiment we used modified magnesium alloy ML-10 with modulus of elasticity which is close to cortex bone surface (≈ 45 GPa) in the form of shavings (0.5 and 1 mg), discs (weight 125 mg, diameter 5 mm, height 3 mm) and cylinders (weight 750 mg, diameter 5 mm, length 18 mm). Shavings and discs were placed into test tubes with Mueller-Hinton broth (pH 7.4), and discs and cylinders — into Mueller-Hinton agar. As test microbial agent we used culture of standard reference S. aureus ATCC 25923 (American Type Culture Collection). Results: it was shown that products of disintegration of modified magnesium alloy ML-10 have bacteriostatic effect and significant antimicrobial activity as for test infection agent S. aureus ATCC 25923, they suppress its growth in liquid environment during three days. Such effect was conducted by products of disintegration of mentioned alloy due to electric and chemical reactions and creation of alkaline PH environment (from 7.4 to 9.6). Disintegration products of modified magnesium alloy ML-10 can diffuse in dense nutrient and suppress the growth of S. aureus. Conclusions: it was confirmed that modified magnesium alloy ML-10 can be used for implant production. There is unique possibility to prevent the growth of S. aureus which is the main infection agent of implant-associated infection. Key words: magnesium, implant, antimicrobial peculiarities, Staphylococcus aureus.

*Виникнення гнійних ускладнень у результаті остеосинтезу реєструють у 5,3–75,4 % випадків, серед яких посттравматичний остеомієліт — у 3–24 % унаслідок відкритих і 1–7 % — після хірургічного лікування закритих переломів. Основними збудниками хірургічної інфекції в травматології та ортопедії є представники роду Staphylococcus. Мета: оцінити антибактеріальну активність продуктів біодеградації модифікованого магнієвого сплаву МЛ-10 по відношенню до S. aureus. Методи: в експерименті *in vitro* використано модифікований магнієвий сплав МЛ-10 із модулем пружності, близьким до коркового шару кістки (≈ 45 ГПа), у вигляді стружки (0,5 і 1 мг), дисків (маса 125 мг, діаметр 5 мм, висота 3 мм) і циліндрів (маса 750 мг, діаметр 5 мм, довжина 18 мм). Стружку та диски поміщали в пробірки з бульйоном Мюллера-Хінтона (рН 7,4), а диски та циліндри — в агар Мюллера-Хінтона. Як тест-мікроорганізм використовували добову культуру стандартного еталонного штаму S. aureus ATCC 25923 (American Type Culture Collection). Результати: з'ясовано, що продукти біодеградації модифікованого магнієвого сплаву МЛ-10 мають бактеріостатичний ефект і значну бактерицидну активність по відношенню до тест-штаму S. aureus ATCC 25923, пригнічуючи його зростання в рідкому середовищі протягом трьох діб. Ефект обумовлений утворенням продуктів біодеградації вказаного сплаву в результаті електрохімічних реакцій і зміщенням рН — із 7,4 до 9,6. Продукти деградації модифікованого магнієвого сплаву МЛ-10 здатні дифундувати в щільному живильному середовищі та пригнічувати зростання S. aureus. Висновки: підтверджено можливість використання модифікованого магнієвого сплаву МЛ-10 для виготовлення імплантатів, унікальною особливістю яких є здатність запобігати зростанню S. aureus — одного з основних збудників імплантат-асоційованої інфекції. Ключові слова: магній, імплантат, антибактеріальні властивості, Staphylococcus aureus.*

Ключевые слова: магний, имплантат, антибактериальные свойства, *Staphylococcus aureus*

Введение

Интенсивное применение массивных погружных имплантатов в ортопедии и травматологии в XXI веке, наряду с очевидными преимуществами в тактике хирургического лечения и последующего улучшения качества жизни пациентов, способствовало возникновению в 1,0–8,5 % случаев таких тяжелых осложнений, как инфицирование в области металлоконструкций и эндопротезов суставов [1, 2]. Установление постоянного имплантата приводит к возникновению пожизненного риска развития инфекции и хронизации процесса [3].

В зависимости от степени тяжести повреждений конечностей и времени оказания помощи после травмы возникновение гнойных осложнений регистрируется в 5,3–75,4 % случаев, среди которых остеомиелит диагностируется в 3–24 % впоследствии открытых переломов и в 1–7 % — после хирургического лечения закрытых [4]. Основными возбудителями хирургической инфекции в ортопедии, включая остеомиелит и параэндопротезную инфекцию, являются представители рода *Staphylococcus*, а именно: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus* [5]. Установлено, что в видовом спектре возбудителей имплантат-ассоциированной инфекции (ИАИ), обусловленной стафилококками, главное место занимают *S. aureus* и *S. epidermidis* (49,9 %). Общепризнанно, что ведущая роль этих возбудителей в этиологии ортопедической инфекции во многом обусловлена их способностью к активной адгезии, колонизации и быстрому формированию многоуровневых микробных биопленок на поверхности искусственных имплантатов [6]. Существование возбудителей в составе биопленок затрудняет диагностику ИАИ и существенно снижает продуктивность антибактериальной терапии [7].

Достаточно эффективных результатов в лечении ИАИ после больших ортопедических операций удается достичь при сочетании хирургического вмешательства с длительным применением антибиотиков, продуктивность которых определяется рациональным подбором антимикробного препарата [5]. Трудность заключается в том, что в настоящее время для большинства антибиотиков нет убедительной доказательной базы в отношении их применения при ортопедической ИАИ [8]. В условиях быстрого роста резистентности микроорганизмов, а также недостаточного спектра антибактериальных препаратов, обладающих активностью в отношении полирезис-

тентных штаммов, особую значимость приобретает поиск альтернативных методов профилактики ИАИ. В последнее десятилетие исследования в области травматологии и ортопедии сосредоточены на разработке новых биodeградирующих материалов с антибактериальными свойствами, которые в процессе биодеградации не только предотвращают рост патогенных микроорганизмов, но и препятствуют созданию площадки для последующей колонизации патогенной флорой. При этом особое внимание уделяют изучению биологических свойств сплавов на основе магния (Mg^{2+}) [11, 14]. Многочисленные эксперименты на кроликах, крысах и овцах показали, что сплавы на основе магния обладают хорошей биосовместимостью и достаточной коррозионной устойчивостью, не токсичны и имеют модуль упругости Юнга, который максимально приближен к модулю упругости коркового слоя кости [9, 10, 12, 13]. Сам по себе магний не обладает антибактериальными свойствами, но продукты его растворения (газообразный водород, гидроксид магния и образующиеся в результате электрохимической реакции соли магния) локально повышают pH, что может оказывать бактерицидное действие, а постоянный процесс коррозии поверхности имплантата затрудняет формирование микроорганизмами полноценной биопленки [11, 14]. Для эксперимента мы использовали модифицированный добавками серебра (Ag^+) магниевый сплав на основе промышленного сплава МЛ-10, модуль эластичности которого составляет порядка 45 ГПа, что более точно соответствует модулю упругости коркового слоя кости. Благодаря своим прочностным характеристикам, приобретенным в результате модификации серебром (Ag^+), сплав МЛ-10 является пригодным для изготовления различных типов имплантатов [9, 15].

Целью настоящего исследования было оценить противомикробную активность модифицированного магниевых сплава МЛ-10.

Для достижения цели необходимо было изучить *in vitro* антимикробную активность модифицированного сплава МЛ-10 по отношению к золотистому стафилококку как наиболее значимому возбудителю имплантат-ассоциированных инфекций.

Материал и методы

Для проведения экспериментов навески стружки 0,5 и 1 мг, а также образцы сплава в виде дисков (масса 125 мг, диаметр 5 мм, высота 3 мм) после стерилизации погружали в пробирки

с бульоном Мюллера-Хинтона (рН 7,4) из расчета 0,5 и 1 мг стружки на 1 мл бульона (экстракт № 1 и № 2), 1 диск на 5 мл среды (экстракт № 3). Образцы инкубировали при 37 °С в течение 72 ч, после чего надосадочную жидкость (экстракт) отбирали и центрифугировали при 1 000 оборотах в течение 5 мин. Полученный таким образом экстракт использовали в исследованиях. В качестве тест-микрорганализма использовали суточную культуру стандартного эталонного штамма *S. aureus* ATCC 25923 (American Type Culture Collection), из которого методом серийных разведений в физиологическом растворе (0,85 % NaCl) готовили бактериальную суспензию плотностью от 10^8 до 10^3 КОЕ/мл. В каждую пробирку с 2 мл экстракта вносили по 0,2 мл бактериальной суспензии соответствующих разведений, что составляло от 10^7 до 10^2 микробных клеток (м. к.) соответственно. В качестве контроля использовали пробирки с бульоном Мюллера-Хинтона без экстракта, в которые вносили данные посевные дозы микрорганализмов (контроль роста культуры) и пробирки с бульоном и экстрактом без внесения культуры (контроль стерильности сред). Емкости с посевами инкубировали при 37 °С 72 ч. Ежедневно в течение 3 дней из пробирок делали высев содержимого (0,1 мл) на чашки с агаром Мюллера-Хинтона. Учет результатов роста стафилококка на плотной среде (подсчет выросших колоний) проводили после инкубации посевов при 37 °С в течение 24 ч. Бактериостатическую активность оценивали по наличию/отсутствию визуального роста в пробирках с посевами, бактерицидную — по наличию/отсутствию роста на чашках с агаром после высева из пробирок. Исследования антимикробной активности продуктов биодеградации сплава (экстракта) проводили в пяти повторях. Статистический анализ полученных результатов выполняли с помощью лицензионных компьютерных программ Microsoft Excel 2010 и Stat Soft Statistica v12. При изучении распределений количественных данных определяли меры центральной тенденции — медиана (Me), и меры дисперсии — интерквартильный размах в виде 25 и 75 перцентилей.

Также антибактериальную активность модифицированного сплава МЛ-10 исследовали погружением опытного образца в агар Мюллера-Хинтона. Для этого в чашки с 10 мл 1,5 % агара устанавливали образец модифицированного магниевого сплава МЛ-10 и заливали 15 мл 0,8 % агара, расплавленного и охлажденного до 45 °С, в который предварительно добавляли 0,1 мл

(10^7 м. к.) суточной культуры *S. aureus*. Посевы инкубировали при 37 °С 24 ч. Учет результатов проводили по наличию зоны задержки роста вокруг образца, которую измеряли в миллиметрах.

Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что изучаемый экстракт металла обладает бактериостатической и высокой бактерицидной активностью, что обусловлено образованием продуктов биодеградации сплава в результате его растворения в водной среде. Так, погружение металла в бульон Мюллера-Хинтона сопровождалось обильным выделением газа с поверхности сплава и значительным сдвигом рН в щелочную сторону. В пробирке, содержащей 0,5 мг сплава, рН среды выросла до 9,24; 1 мг металла — до 9,64; диск — до 9,62.

При осмотре первичных посевов рост культуры во всех исследуемых пробирках, содержащих экстракт и культуру стафилококка, на протяжении всего опыта (3 сут), визуально не определялся, что свидетельствует о бактериостатическом эффекте продуктов биодеградации этого металла.

В ходе изучения бактерицидной активности экстракта модифицированного сплава МЛ-10, обнаружено, что результаты, полученные при исследовании силы антибактериального действия экстрактов, приготовленных добавлением в бульон 0,5 мг, 1 мг и цельного образца металла, были практически идентичными. Максимальный рост стафилококка на агаре наблюдался только после первых суток инкубации в посевах из пробирок, в которые накануне было добавлено 10^7 , 10^6 , 10^5 м. к. (из разведений 10^8 , 10^7 , 10^6 КОЕ/мл) (рис. 1, 2).

По мере термостатирования количество колоний, вырастающих на чашках после второго и третьего высева, значительно уменьшалось, что говорит о высокой антимикробной активности экстракта. Так, из пробирок с экстрактом № 1–3, получивших до инкубации максимальную посевную дозу — 10 млн м. к. (10^8 КОЕ/мл), после первого высева на агаре выросло 565, 626 и 652 колоний соответственно, а к концу третьих суток — 14, 12 и 8 колоний. Аналогичные результаты бактерицидного действия экстракта модифицированного сплава МЛ-10 получены и при работе с посевами, получившимися до инкубации 10^6 м. к. (10^7 КОЕ/мл) и 10^5 м. к. (10^6 КОЕ/мл) (рис. 3–5).

После высева из емкостей с 10^4 м. к. *S. aureus*, его рост в виде единичных колоний (4 — экстракт № 1, 3 — экстракт № 2, 3 — экстракт № 3) обнаруживался только после 24 ч инкубации. После 48 и 72 ч инкубации рост *S. aureus* не выявлен.

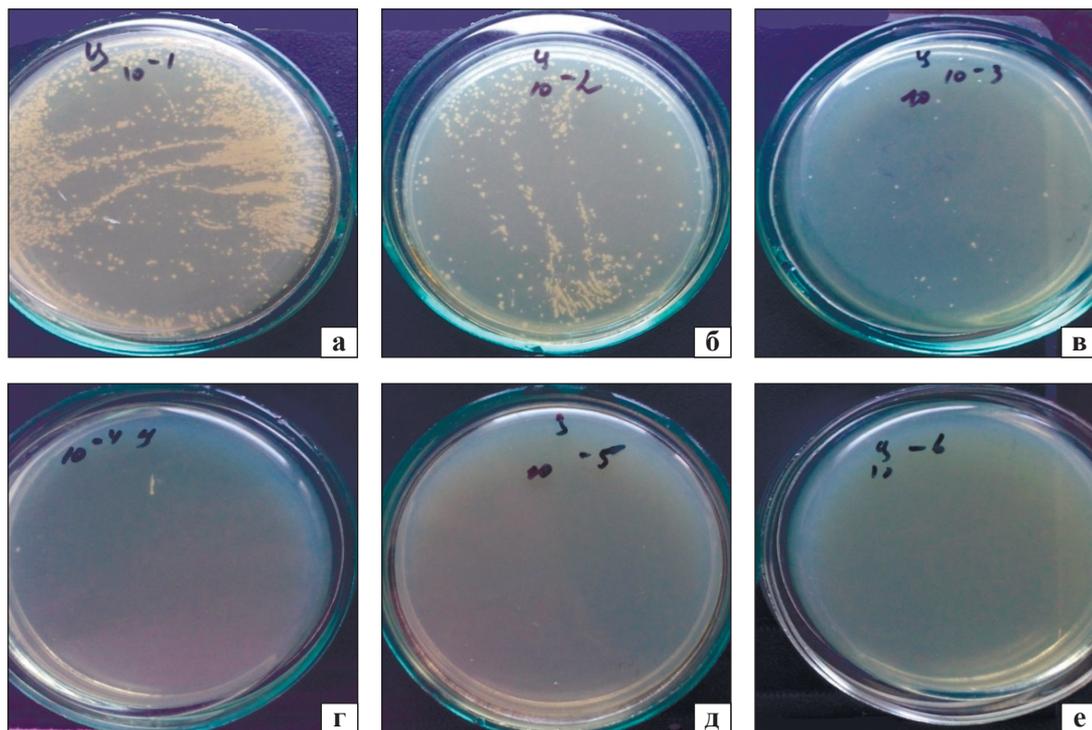


Рис. 1. Рост колоний *S. aureus* на агаре Мюллера-Хинтона после высева из пробирок, содержащих экстракт № 3, приготовленный добавлением цельного образца в бульон Мюллера-Хинтона из расчета 1 диск на 5 мл бульона (инкубация экстракта 24 ч): а, б) их максимальный рост после высева из пробирок с разведением культуры 10^{-1} (10^8 КОЕ/мл) и 10^{-2} (10^7 КОЕ/мл); в, г) единичные колонии после высева из пробирок с разведением культуры 10^{-3} (10^6 КОЕ/мл) 10^{-4} (10^5 КОЕ/мл); д, е) после высева из пробирок с разведением культуры 10^{-5} (10^4 КОЕ/мл) 10^{-6} (10^3 КОЕ/мл)

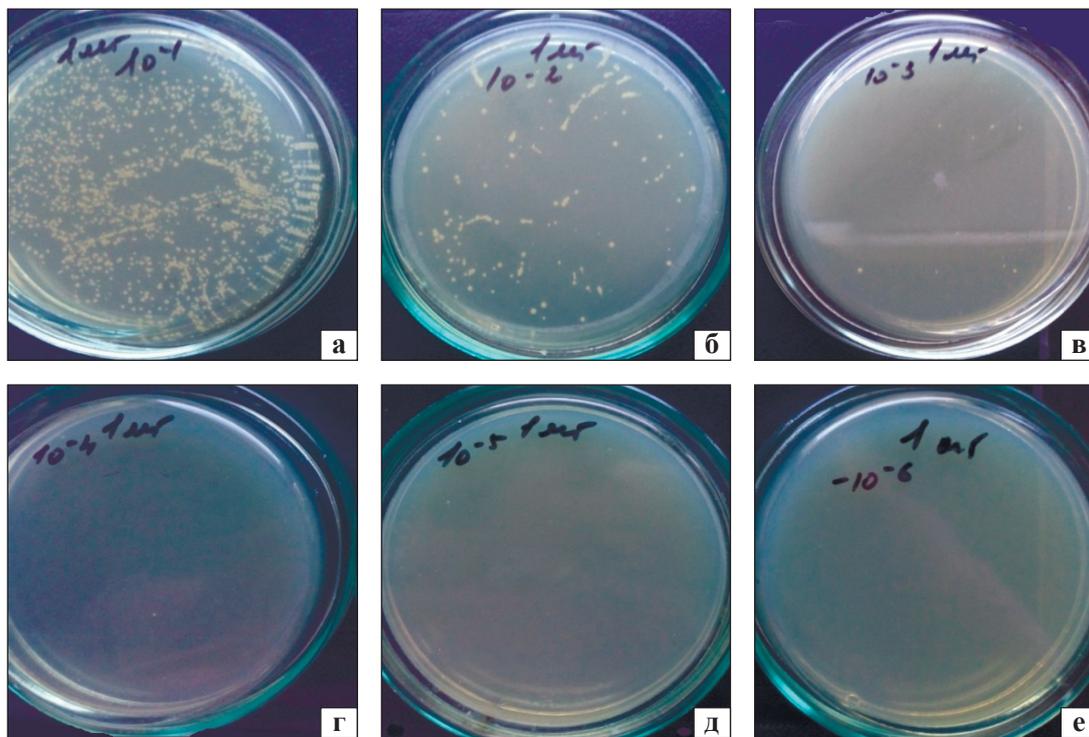


Рис. 2. Рост колоний *S. aureus* на агаре Мюллера-Хинтона после высева из пробирок, содержащих экстракт № 2, приготовленный с добавлением цельного образца в бульон Мюллера-Хинтона из расчета 1 мг стружки на 1 мл бульона (инкубация экстракта 24 ч): а, б) максимальный рост после высева из пробирок с разведением культуры 10^{-1} (10^8 КОЕ/мл) и 10^{-2} (10^7 КОЕ/мл); в, г) единичные колонии после высева из пробирок с разведением культуры 10^{-3} (10^6 КОЕ/мл) 10^{-4} (10^5 КОЕ/мл); д, е) после высева из пробирок с разведением культуры 10^{-5} (10^4 КОЕ/мл) 10^{-6} (10^3 КОЕ/мл)

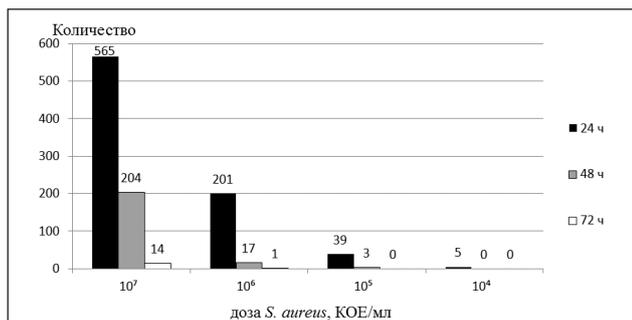


Рис. 3. Диаграмма количества колоний *S. aureus*, выросших на агаре Мюллера-Хинтона после инкубации в экстракте № 1

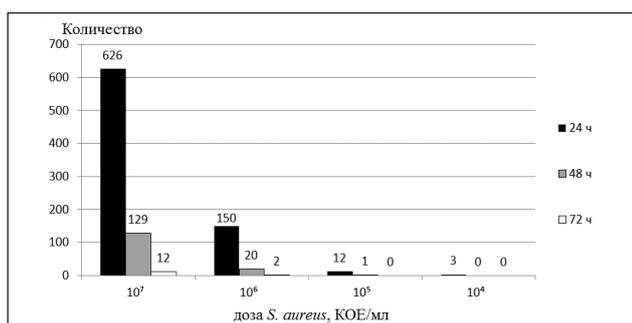


Рис. 4. Диаграмма количества колоний *S. aureus*, выросших на агаре Мюллера-Хинтона после инкубации в экстракте № 2

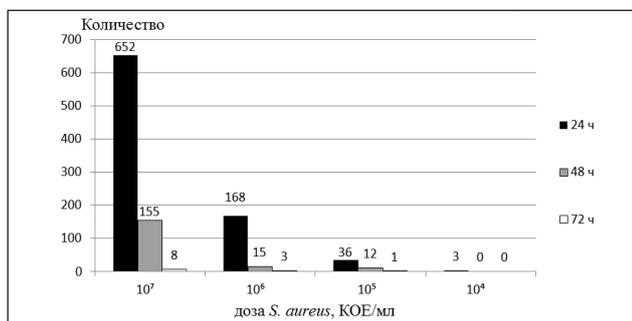


Рис. 5. Диаграмма количества колоний *S. aureus*, выросших на агаре Мюллера-Хинтона после инкубации в экстракте № 3

Необходимо отметить, что рост колоний *S. aureus* на агаре после высева из емкостей, в которые было добавлено 10^4 и 10^3 КОЕ/мл в течение трех суток не обнаружен.

При погружении опытного образца, изготовленного из модифицированного магниевого сплава МЛ-10, в агар через сутки инкубации вокруг него образовывалась четкая линия задержки роста стафилококка размером до 5 мм (рис. 6). Полученный результат говорит о возможности продуктов биодеградации модифицированного магниевого сплава МЛ-10 диффундировать в плотной питательной среде и оказывать активное бактерицидное действие в отношении *S. aureus*.



Рис. 6. Зона задержки роста культуры *S. aureus*, сформировавшаяся при погружении опытных образцов из модифицированного магниевого сплава МЛ-10 в агар, через 24 ч инкубации

Выводы

Модифицированный магниевый сплав МЛ-10 оказывает бактериостатический эффект и обладает высокой бактерицидной активностью по отношению к тест-штамму *S. aureus* ATCC 25923, подавляя его рост в жидкой среде в течение трех суток благодаря образованию в результате электрохимических реакций продуктов биодеградации и сдвигу pH среды в щелочную сторону (с 7,4 до 9,6).

Продукты растворения модифицированного магниевого сплава МЛ-10 способны диффундировать в плотной питательной среде и эффективно подавлять рост золотистого стафилококка.

Полученные результаты подтверждают возможность использования модифицированного магниевого сплава МЛ-10 для изготовления имплантатов, уникальной особенностью которых является способность предотвращать рост *S. aureus* — одного из основных возбудителей имплантат-ассоциированной инфекции.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Список литературы

1. Zorya V. I. Bone cement osteosynthesis of fractures of tubular bones in persons with osteoporosis / V. I. Zorya : abstract's book of VII Congress of Traumatologists — Orthopedists of Russia. — Tomsk : STI, 2002. — Vol. 2. — P. 330–331.
2. Akhtyamov I. F. Errors and complications of hip arthroplasty / I. F. Akhtyamov, I. I. Kuzmin. — Kazan, OCP : 2006. — 268 p.
3. Zimmerli W. Biomaterials-associated infection: a perspective from the clinic / W. Zimmerli, A. Trampuz // Biomaterials associated infection : immunological aspects and antimicrobial strategies / Eds. T. F. Moriarty, S. A. Zaaf, H. Busscher. — NY : Springer ; London : Heidelberg Dordrecht, 2013. — P. 3–24.
4. Owen M. A. Use of the Ilizarov method to manage a septic tibial fracture nonunion with a large cortical defect / M. A. Owen // J. Small Anim. Pract. — 2000. — Vol. 41 (3). — P. 124–127.
5. Zimmerli W. Prosthetic-joint infections / W. Zimmerli, A. Trampuz, P. E. Ochsner // N. Engl. J. Med. — 2004. —

- Vol. 351. — P. 1645–1654. — DOI: 10.1056/NEJMra040181.
6. Infections of orthopaedic implants and devices / R. A. Brady, J. H. Calhoun, J. G. Leid, M. E. Shirtliff // *Biofilms and device-related infections* / Eds. M. E. Shirtliff and J. G. Leid. — NY : Springer, 2009. — P. 15–56.
 7. Stewart P. S. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms / P. S. Stewart, J. W. Costerton // *Lancet*. — 2001. — Vol. 358 (9276). — P. 135–138.
 8. Strategies to control *Staphylococcus epidermidis* biofilms / F. Gomes, B. Leite, P. Teixeira, R. Oliveira // *Science against microbial pathogens : communicating current research and technological advances* / Eds. A. Méndez-Vilas. — FORMATEX, 2011. — P. 843–852.
 9. Chorny V. N. Prospects for the use of biodegradable, magnesium alloys in osteosynthesis / V. N. Chorny, E. V. Yatsun, M. L. Golovakha // *Collection of scientific works of the Ukrainian Military Medical Academy. «Problems of Military Healthcare»*. — 2013. — Vip. 36. — P. 141–148.
 10. Shkolnikova M. A. Metabolism of magnesium and the therapeutic value of its drugs / M. A. Shkolnikova. — Moscow : Medpraktika, 2002. — 32 p.
 11. In vitro antibacterial properties of magnesium metal against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* / D. A. Robinson, R. W. Griffith, D. Shechtman [et al.] // *Acta Biomater*. — 2010. — Vol. 6. — P. 1869–1877. — DOI: 10.1016/j.actbio.2009.10.007.
 12. Investigation of the toxic effects of the production of the original magnesium alloy biodegradation in an experiment on rats / M. L. Golovaha, I. F. Belenichev, V. M. Chorny, Y. V. Yatsun // *Collection of scientific works of the Ukrainian Military Medical Academy. «Problems of Military Health»*. — Vip. 36. — 2013. — P. 152–158.
 13. Experimental evaluation of the general toxic effect of implants from magnesium-based alloy / M. L. Golovaha, I. F. Belenichev, G. A. Zhernova [et al.] // *Orthopedics, traumatology and prosthetics*. — 2014. — No 3. — P. 10–15. — DOI: 10.15674/0030-59872014310-15.
 14. Degradation and antibacterial properties of magnesium alloys in artificial urine for potential resorbable ureteral stent applications / J. Y. Lock, E. Wyatt, S. Upadhyayula [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. A*. — 2014. — Vol. 102 (3). — P. 781–792. — DOI: 10.1002/jbm.a.34741.
 15. Zeleniuk Yu. O. Influence of silver doping on the properties of magnesium alloy ML-10 / Yu. O. Zeleniuk, V. A. Shalomeev, E. I. Tsvirko // *Metallurgy and metal processing*. — 2014. — № 1. — P. 35–39.

Статья поступила в редакцию 05.02.2018

ANTIMICROBIAL PECULIARITIES OF MODIFIED MAGNESIUM ALLOY *IN VITRO*

V. N. Chorny, Ye. V. Yatsun, N. N. Polishchuck, A. M. Kamyshnyi, M. L. Golovaha

Zaporizhzhia State Medical University. Ukraine

✉ Vadim Chorny: chorniy.vadim@mail.ru

✉ Yevgen Yatsun: yacun2017@gmail.com

✉ Nataliya Polishchuck, MD, PhD: natalyapolishchuck23@gmail.com

✉ Aleksandr Kamyshnyi, MD, Prof.: alexkamyshny@yandex.ru:

✉ Maksym Golovaha, MD, Prof. in Orthopaedics and Traumatology: golovaha@ukr.net