

УДК 615.465-034.721.5:579.84]:617.3-092.4(045)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872019360-63>

## Антибактеріальні властивості модифікованого магнієвого сплаву по відношенню до клінічних штамів неферментуючих грамнегативних мікроорганізмів *in vitro*

**В. М. Чорний**

Запорізький державний медичний університет. Україна

*The objective is to determine the sensitivity of A. baumannii and P. aeruginosa (etiological agents of implant-associated infections) to the ML-10 magnesium alloy biodegradation products to justify the possibility of its application in traumatological practice as implants with antibacterial activity. Methods: ML-10 magnesium alloy extract was made based on Mueller–Hinton broth (pH 7.4). Its bacteriostatic activity was assessed by the presence/absence of visual growth of A. baumannii and P. aeruginosa in culture tubes, and the bactericidal activity — by the presence/absence of growth of microorganism colonies on agar plates after plating from the tubes after 24, 28, and 72 h of incubation. Results: the extract of alloy ML-10 magnesium alloy has a high bacteriostatic and bactericidal activity in relation to the clinical strains of A. baumannii and P. aeruginosa. No growth of microorganisms was visually detected in test tubes with extract, which indicated a significant bacteriostatic activity of the alloy biodegradation products. In the study of bactericidal activity, the maximum growth of bacteria on agar was observed after the first seeding from tubes (24 hours of incubation of the extract) into which microorganisms were added the day before at a concentration of  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$  CFU/ml. The number of colonies grown on agar after the second seeding (48 hours of incubation of the extract) was significantly reduced, and after the third seeding (72 hours), the growth of microorganisms was absent in most of experiments. In the case of the addition of microorganisms at a concentration of  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  CFU/ml, there was no colony growth on a solid medium after seeding from these tubes. Conclusions: ML-10 magnesium alloy biodegradation products exhibit high bactericidal activity against clinical strains of A. baumannii and P. aeruginosa, which are the causative agents of implant-associated infections. Key words: magnesium alloy, implant, antibacterial properties, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa.*

*Цель: определить чувствительность Acinetobacter baumannii и Pseudomonas aeruginosa (возбудителей имплантат-ассоциированных инфекций) к продуктам биодegradации магниевого сплава МЛ-10 для обоснования возможности его использования в травматологической практике в качестве имплантатов с антибактериальной активностью. Методы: экстракт магниевого сплава МЛ-10 готовили на основе бульона Мюллера–Хинтона (рН 7,4). Его бактериостатическую активность оценивали по наличию/отсутствию визуального роста A. baumannii и P. aeruginosa в пробирках с посевами, бактерицидную — по наличию/отсутствию роста колоний микроорганизмов на чашках с агаром после высева из пробирок через 24, 28 и 72 ч их инкубации. Результаты: исследуемый экстракт магниевого сплава МЛ-10 обладает высокой бактериостатической и бактерицидной активностью по отношению к клиническим штаммам A. baumannii и P. aeruginosa. В пробирках с экстрактом рост микроорганизмов визуально не обнаружен, что свидетельствует о значительной бактериостатической активности продуктов биодegradации сплава. При изучении бактерицидной активности максимальный рост бактерий на агаре наблюдали после первого высева из пробирок (24 ч инкубации экстракта), в которые накануне были добавлены микроорганизмы в концентрации  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$  КОЕ/мл. Количество колоний, выросших на агаре после второго высева (48 ч инкубации экстракта) значительно уменьшалось, а после третьего высева (72 ч) рост микроорганизмов отсутствовал в большинстве опытов. В случае добавления микроорганизмов в концентрации  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  КОЕ/мл рост колоний на плотной среде после высева из этих пробирок отсутствовал. Выводы: продукты биодegradации магниевого сплава МЛ-10 проявляют высокую бактерицидную активность в отношении клинических штаммов A. baumannii и P. aeruginosa, являющихся возбудителями имплантат-ассоциированных инфекций. Ключевые слова: магнєвий сплав, імплантат, антибактеріальні властивості, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa.*

**Ключові слова:** магнієвий сплав, імплантат, антибактеріальні властивості, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*

## Вступ

Актуальною проблемою застосування масивних заглиблених імплантатів в ортопедії і травматології є виникнення таких важких ускладнень, як інфікування в ділянці металоконструкцій [1, 2]. У 1–8,5 % випадків установа постійного імплантата призводить до розвитку інфекції у вигляді хронічного постімплантаційного остеомієліту з наступною інвалідизацією хворого [3]. Згідно з даними літератури, у 5–14 % випадків збудниками імплантат-асоційованої інфекції (ІАІ) є грамнегативні неферментивні мікроорганізми, серед яких найчастіше виявляють *Pseudomonas aeruginosa* та *Acinetobacter baumannii* [4–6]. Відомо, що вказані бактерії характеризуються здатністю до швидкого формування багаторівневих мікробних біоплівки на поверхні штучних імплантатів і резистентністю до багатьох антибактеріальних препаратів, що значно ускладнює терапію ІАІ [6, 7]. У зв'язку з цим особливого значення в травматології та ортопедії набуває альтернативна профілактика ІАІ, заснована на використанні трансплантативних матеріалів, які завдяки своїм антимікробним властивостям у процесі біодеградації сприяють запобіганню розмноження патогенних мікроорганізмів й утворенню біоплівки. На сьогодні вельми перспективним є вивчення біологічних властивостей сплавів на основі магнію ( $Mg^{2+}$ ). Численні експерименти на кролях, щурах і вівцях показали, що сплави на основі магнію характеризуються доброю біосумісністю, достатньою корозійною стійкістю, не токсичні, мають модуль пружності Юнга, максимально наближений до показника коркового шару кістки. Власне Mg не володіє антибактеріальними властивостями, але продукти його корозії (газоподібний водень, гідроксид і солі магнію, які утворюються в результаті електрохімічної реакції) локально підвищують рН, що надає ефективну бактерицидну дію, а постійний процес біокорозії поверхні імплантата ускладнює формування мікроорганізмами повноцінної біоплівки [8, 9]. У зв'язку з наведеним для експерименту нами був використаний модифікований магнієвий сплав, створений на основі промислового сплаву МЛІ-10, модуль еластичності якого становить близько 45 GPa, що точніше відповідає модулю пружності коркового шару кістки.

**Мета роботи:** визначити чутливість клінічних штамів *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, збудників імплантат-асоційованих інфекцій до продуктів біодеградації магнієвого сплаву МЛІ-10 із подальшим обґрунтуванням можливості його використання в травматологічній практиці для виготовлення імплантатів з антибактеріальною активністю.

## Матеріал і методи

Для проведення експериментів навішування стружки стерилізували у 70 % спирті впродовж 5 хв, потім промивали в стерильному 0,85 % NaCl. Після стерилізації стружку занурювали в пробірки з бульйоном Мюллера–Хінтона (рН 7,4) із розрахунку 1 мг стружки на 1 мл бульйону. Зразки інкубували за температури 37 °С упродовж 72 год, після чого надосадову рідину (екстракт) відбирали та центрифугували за умов 3 000 обертів 5 хв. Отриманий екстракт використано в дослідженнях. Як тест-мікроорганізми взято добові культури неферментивних грамнегативних мікроорганізмів — 21 штамп *A. baumannii* та 17 штамів *P. aeruginosa*. Із дослідних штамів серійних розведень у фізіологічному розчині (0,85 % NaCl) готували бактеріальну суспензію густиною від  $10^9$  КУО/мл до  $10^4$  КУО/мл. У кожен пробірку з 2 мл екстракту вносили по 0,2 мл бактеріальної суспензії відповідних розведень. За контроль використано пробірки з бульйоном Мюллера–Хінтона без екстракту, в які додавали вказані посівні дози мікроорганізмів (контроль росту культури) і пробірки з бульйоном і екстрактом без внесення культури (контроль стерильності середовищ). Ємності з посівами інкубували за температури 37 °С упродовж 72 год. Щодня впродовж інкубації з пробірок робили висів вмісту (0,1 мл) на чашки з агаром Мюллера–Хінтона. Облік результатів зростання *A. baumannii*, *P. aeruginosa* на агарі (підрахунок колоній, які виростили) проводили після інкубації посівів за температури 37 °С упродовж 24 год. Бактеріостатичну активність екстракту сплаву оцінювали за наявності/відсутності візуального зростання в пробірках із посівами, бактерицидну — на чашках з агаром після висіву з пробірок. Дослідження антимікробної активності біодеградуємого сплаву проводили в п'яти повторях.

Статистичний аналіз отриманих результатів виконали за допомогою ліцензійних комп'ютерних програм Microsoft Excel 2010 і Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., № JPZ804I382130ARCN10-J). Під час аналізу розподілів кількісних даних визначали міру центральної тенденції — медіану (Me), міру варіації — інтерквартильний розмах у вигляді 25 і 75 перцентилів.

### Результати та їх обговорення

Виявлено, що досліджуваний екстракт металу має високу бактериостатичну та бактерицидну активність по відношенню до штамів *A. baumannii* та *P. aeruginosa*. У процесі огляду посівів у бульйоні Мюллера–Хінтона візуально не визначено зростання культур в усіх пробірках з екстрактом і штамами протягом 3 діб. Такий високий бактериостатичний ефект продуктів біодеградації досліджуваного металу, імовірно, пов'язаний зі значним зрушенням рН середовища в лужний бік до 9,64.

Під час вивчення бактерицидної активності сплаву, виявлено, що впродовж доби екстракт ефективно знешкоджує бактерії у концентрації  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  м. к. Зростання культур *A. baumannii* та *P. aeruginosa* на агарі спостерігали лише у висівах із пробірок, в які напередодні було додано мікроорганізми у концентрації  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$  КУО/мл. Максимальне зростання колоній на агарі після висіву з цих ємностей зафіксовано лише після першої доби інкубації. Зі збільшенням термостатування кількість колоній, які виростили на агарі після другого та третього висівів, значно зменшувалась. Найбільш показовою виявилася бактерицидна дія екстракту за умов найвищого мікробного навантаження в  $10^9$  КУО/мл. Зокрема, у досліджах зі штамами *A. baumannii* найбільша кількість колоній, які виростили на агарі після першого висіву з екстракту, коливалася від 165,8 (157–184) до 2,8 (14–48), після другого — від 11,8 (2–14) до 6,6 (2–12), після третього висіву зростання колоній було відсутнє у 67 % штамів і лише в 33 % випадків зареєстровано поодинокі колонії — 0,4 (0–1)–0,2 (0–0). Аналогічні результати було отримано в процесі дослідження чутливості *P. aeruginosa*: зростання найбільшої кількості колоній псевдомонад зафіксовано після першого висіву з екстракту — 279 (212–385)–3,2 (2–4), після другого загальна кількість колоній на агарі значно зменшилася — 17,2 (4–28)–0,6 (0–1), після третього лише 35 % штамів виростили

у вигляді поодиноких колоній на агарі — 1,4 (0–3)–0,2 (0–0).

### Висновки

Продукти біодеградації магнієвого сплаву МЛ-10 мають значний бактерицидний ефект щодо клінічних штамів *A. baumannii* впродовж 72 год.

Екстракт магнієвого сплаву МЛ-10 має високу антибактеріальну активність по відношенню до клінічних штамів *P. aeruginosa*, знешкоджуючи мікроорганізми впродовж 3 діб.

Отримані результати досліджень *in vitro* підтверджують можливість застосування сплаву МЛ-10 для створення імплантатів з унікальною особливістю запобігати зростанню збудників імплантат-асоційованих інфекцій.

*Перспективи подальших досліджень.* Отримані результати свідчать про перспективність подальших наукових досліджень у цьому напрямі, оскільки натепер є необхідним вивчення проти-мікробної активності магнієвого сплаву МЛ-10 щодо клінічних штамів грампозитивних мікроорганізмів — збудників інфекцій, обумовлених медичним втручанням.

**Конфлікт інтересів.** Автор декларує відсутність конфлікту інтересів.

### Список літератури

1. Surgical site infection in orthopedic trauma: A case-control study evaluating risk factors and cost / R. V. Thakore, S. E. Greenberg, H. Shi [et al.] // Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma. — 2015. — Vol. 6 (4). — P. 220–226. — DOI: 10.1016/j.jcot.2015.04.004.
2. Infections in orthopedics and traumatology. Pathogenesis and therapy / D. Scheffer, S. Hofmann, M. Pietsch, C. Wenisch // Orthopade. — 2008. — Vol. 37 (7). — P. 709–718. — DOI: 10.1007/s00132-008-1301-x.
3. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface / H. J. Busscher, H. C. van der Mei, G. Subbiahdoss [et al.] // Science Translational Medicine. — 2012. — Vol. 4 (153). — Article ID: 153rv10. — DOI: 10.1126/scitranslmed.3004528.
4. Prevalence of surgical site infection in orthopedic surgery: a 5-year analysis / F. A. Al-Mulhim, M. A. Baragbah, M. Sadat-Ali [et al.] // International surgery. — 2014. — Vol. 99 (3). — P. 264–268. — DOI: 10.9738/INTSURGD-13-00251.1.
5. Outcome of acute prosthetic joint infections due to gram-negative bacilli treated with open debridement and retention of the prosthesis / J. C. Martinez-Pastor, E. Munoz-Mahamud, F. Vilchez [et al.] // Antimicrobial agents and Chemotherapy. — 2009. — Vol. 53 (11). — P. 4772–4777. — DOI: 10.1128/AAC.00188-09.
6. Infections of orthopaedic implants and device / R. A. Brady, J. H. Calhoun, J. G. Leid, M. E. Shirtliff // Springer series on biofilms. — New York: Springer, 2009. — P. 15–55. — DOI: 10.1007/7142\_2008\_25.
7. Stewart P. S. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms / P. S. Stewart, J. W. Costerton // Lancet. — 2001. — Vol. 358. — P. 135–82009.
8. Addition of Zn to the ternary Mg-Ca-Sr alloys significantly im-

proves their antibacterial properties / He Guanping, Wu Yuanhao, Yu Zhang [et al.] // Journal of Materials Chemistry. — 2015. — Vol. 3 (32). — P. 6676–6689. — DOI: 10.1039/C5TB01319D.  
9. 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 Biomaterialia. — 2010. — Vol. 6 (5). — P. 1869–1877. — DOI: 10.1016/j.actbio.2009.10.007.

Стаття надійшла до редакції 24.05.2019

---

## ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF A MODIFIED MAGNESIUM ALLOY WITH CLINICAL STRAINS OF NON-FERMENTATIVE GRAM-NEGATIVE MICROORGANISMS *IN VITRO*

V. N. Chorniy

Zaporizhzhia State Medical University. Ukraine

✉ Vadim Chorniy, PhD in Traumatology and Orthopaedics: chorniy.vadim@mail.ru