

Результати вивчення *in vitro* антибактеріальної активності модифікованого магнієвого сплаву щодо тест-штамів *E. coli* та *P. aeruginosa*

В. М. Чорний, Н. М. Поліщук, О. М. Камишний, М. Л. Головаха

Запорізький державний медичний університет, Україна

Мета роботи – визначити чутливість грамнегативних мікроорганізмів – основних збудників імплантат-асоційованих інфекцій – до продуктів біодеградації магнієвого сплаву МЛ-10, з наступним обґрунтуванням можливості використання в травматологічній практиці у складі штучних імплантатів, що характеризуються антибактеріальною активністю.

Матеріали та методи. Вивчили чутливість еталонних тест-штамів мікроорганізмів *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 до екстракту магнієвого сплаву МЛ-10, що приготовлений на основі бульйону Мюллера–Хінтона (рН 7,4). Бактеріостатичну активність екстракту сплаву оцінювали за наявністю/відсутністю візуального росту у пробірках із посівами, бактерицидну – за наявністю/відсутністю росту колоній мікроорганізмів на чашках з агаром після висіву з пробірок.

Результати. Встановили, що досліджуваний екстракт магнієвого сплаву МЛ-10 характеризується високою бактеріостатичною та бактерицидною активністю щодо еталонних штамів *E. coli* та *P. aeruginosa*. Зростання культур кишкової та синьогнійної паличок на агарі спостерігали тільки у висівах із пробірок, в які напередодні додано мікроорганізми в концентрації 10^9 КУО/мл, 10^8 КУО/мл, 10^7 КУО/мл. Максимальне зростання колоній на агарі після висіву з цих пробірок зафіксовано тільки після першої доби інкубації. Протягом термостатування кількість колоній, що виростала на агарі після другого й третього висівів, істотно зменшувалась. Так, загальна кількість колоній *E. coli*, що виростала після висіву на агар із пробірок із найбільшим бактеріальним навантаженням (10^9 КУО/мл), зменшилась із 220 (після першої доби інкубації екстракту) до 2 колоній після 72 годин витримування рідини в термостаті, а в досліді із *P. aeruginosa* – з 192 до 1. Аналогічні результати отримали в досліді із меншими мікробними концентраціями, що свідчить про високу чутливість грамнегативних мікроорганізмів до екстракту магнієвого сплаву МЛ-10.

Висновки. Магнієвий сплав МЛ-10 у рідкому середовищі виявляє високу бактерицидну активність щодо грамнегативних мікроорганізмів, ефективно пригнічуючи зростання еталонних тест-штамів *E. coli* ATCC 25922 і *P. aeruginosa* ATCC 27853 впродовж 72 годин.

Ключові слова: магнієвий сплав, імплантат, антибактеріальні властивості, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 3(44). – С. 337–340

DOI: 10.14739/2310-1237.2018.3.151854

E-mail: chorniy.vadim.doc@gmail.com

Результаты изучения *in vitro* антибактериальной активности модифицированного магниевого сплава в опытах с тест-штаммами *E. coli* и *P. aeruginosa*

В. Н. Чёрный, Н. Н. Полищук, А. М. Камышный, М. Л. Головаха

Цель работы – определить чувствительность грамотрицательных микроорганизмов – основных возбудителей имплантат-ассоциированных инфекций – к продуктам биодegradации магниевого сплава МЛ-10, с последующим обоснованием возможности использования в травматологической практике в составе искусственных имплантатов, обладающих антибактериальной активностью.

Материалы и методы. Изучена чувствительность эталонных тест-штаммов микроорганизмов *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 к экстракту магниевого сплава МЛ-10, приготовленного на основе бульона Мюллера–Хинтона (рН 7,4). Бактериостатическую активность экстракта сплава оценивали по наличию/отсутствию визуального роста в пробирках с посевами; бактерицидную активность – по наличию/отсутствию роста колоний микроорганизмов на чашках с агаром после посева из пробірок.

Результаты. Установлено, что исследуемый экстракт магниевого сплава МЛ-10 обладает высокой бактериостатической и бактерицидной активностью по отношению к эталонным штаммам *E. coli* и *P. aeruginosa*. Рост культур кишечной и синегнойной паличек на агаре отмечен только в посевах из пробірок, в которые накануне были добавлены микроорганизмы в концентрации 10^9 КОЕ/мл, 10^8 КОЕ/мл, 10^7 КОЕ/мл. Максимальный рост колоний на агаре после посева из данных емкостей зафиксирован только после первых суток инкубации. По мере термостатирования количество колоний, вырастающих на плотной среде после второго и третьего посевов, значительно уменьшалось. Так, общее количество колоний *E. coli*, выросших после посева на агар из пробірок, в которые добавлено наибольшее количество бактерий (10^9 КОЕ/мл), уменьшилось с 220 (после первых суток инкубации экстракта) до 2 колоний после 72 часов выдержки жидкости в термостате, а в опытах с *P. aeruginosa* – с 192 до 1. Аналогичные результаты получены в опытах с меньшими микробными концентрациями, что говорит о высокой чувствительности грамотрицательных микроорганизмов к экстракту магниевого сплава МЛ-10.

Выводы. Магнієвий сплав МЛ-10 в жидкой среде проявляет высокую бактерицидную активность в отношении грамотрицательных микроорганизмов, эффективно подавляя рост эталонных тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853 в течение 72 часов.

Ключевые слова: магнийевый сплав, имплантат, антибактериальные свойства, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 3(44). – С. 337–340

Key words:
magnesium,
alloys, prostheses
and implants,
bacteriocides,
Escherichia coli,
Pseudomonas
aeruginosa.

Pathologia
2018; 15 (3), 337–340

Results of the in vitro study of the antibacterial activity of modified magnesium alloy in experiments with *E. coli* and *P. aeruginosa* test-strains

V. M. Chorny, N. M. Polishchuck, O. M. Kamyshnyi, M. L. Holovakha

The aim. To study the sensitivity of gram-negative microorganisms (the main pathogens of implant-associated infections) to the products of biodegradation of magnesium alloy ML-10, with subsequent justification for its use in traumatologic practice as artificial implants with antibacterial activity.

Methods. Magnesium alloy extract was prepared on the basis of Mueller-Hinton broth (pH 7.4). In sensitivity testing the reference test strains of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used. The bacteriostatic activity of the alloy extract was estimated by the presence or absence of the visual growth in test-tubes with microorganisms; bactericidal activity – by presence or absence of the growth of microorganisms colonies on cups with Mueller-Hinton agar after sowing from test tubes.

The results of the study showed that the studied extract of magnesium alloy ML-10 shows high bacteriostatic and bactericidal activity with reference strains of *E. coli* and *P. aeruginosa*. The growth of this microorganisms on agar was observed only in test tubes, to which microorganisms at a concentration of 10^9 , 10^8 , 10^7 CFU/ml were added the day before. The maximum growth of colonies on agar after sowing from these containers was recorded only after the first day of incubation. During the incubation (37 °C) the number of colonies that grew in agar medium after the second and third sowing significantly decreased. Thus, the total number of *E. coli* colonies that grew after sowing on agar from tubes with the largest number of bacteria (10^9 CFU/ml) decreased from 220 (after the first day of incubation in extract) to 2 colonies after 72 hours of incubation of fluid in the thermostat, and from 192 to 1 colonies in experiments with *P. aeruginosa*. Similar results were obtained in experiments with lower microbial concentrations, which indicates high sensitivity of gram-negative microorganisms to ML-10 magnesium alloy extract.

Conclusions. Magnesium alloy ML-10 in a liquid medium shows high bactericidal activity against gram-negative microorganisms, effectively suppressing the growth of reference strains of *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 during 72 hours.

Актуальною проблемою застосування масивних заглиблених імплантатів в ортопедії, травматології є виникнення ускладнень, як-от інфікування в ділянці металоконструкцій [1,2]. У 1,0–8,5 % випадків встановлення постійного імплантата призводить до розвитку інфекції – хронічного постімплантаційного остеомієліту, що спричиняє інвалідизацію хворого [3]. За даними фахової літератури, у 8–10 % випадків збудниками імплантат-асоційованої інфекції (IAI) є грамнегативні мікроорганізми: представники родини *Enterobacteriaceae* – *Escherichia coli* та неферментуючі грамнегативні мікроорганізми – *Pseudomonas aeruginosa* [4–6]. Відомо, що ці бактерії входять до складу мікробіома кишечника людини, але вони характеризуються здатністю до швидкого формування багаторівневих мікробних біоплівки на поверхні штучних імплантатів і резистентністю до багатьох антибактеріальних препаратів, що істотно ускладнює терапію IAI [6,7]. У зв'язку з цим особливого значення у травматології та ортопедії набуває альтернативна профілактика IAI, що заснована на використанні як трансплантатів матеріалів, котрі завдяки антимікробним властивостям у процесі біодеградації можуть запобігати розмноженню патогенних мікроорганізмів та утворенню біоплівки.

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 біосумісністю, достатньою корозійною стійкістю, не токсичні, мають модуль пружності Юнга, який максимально наближений до модуля пружності кортикального шару кістки. Саме Mg не має антибактеріальних властивостей, але продукти корозії магнію (газоподібний водень, гідроксид магнію і солі Mg, що утворюються в результаті електрохімічної реакції), локально підвищують pH, що

надає ефективну бактерицидну дію. Постійний процес біокорозії поверхні імплантата ускладнює формування мікроорганізмами повноцінної біоплівки [8,9].

Для експерименту використали модифікований магнієвий сплав на основі промислового сплаву МЛ-10, модуль еластичності якого становить майже 45 GPa, що точніше відповідає модулю пружності кортикального шару кістки.

Мета роботи

Визначити чутливість грам негативних мікроорганізмів – основних збудників імплантат-асоційованих інфекцій – до продуктів біодеградації магнієвого сплаву МЛ-10 із наступним обґрунтуванням можливості використання у травматологічній практиці у складі штучних імплантатів, що характеризуються антибактеріальною активністю.

Матеріали і методи дослідження

Для експериментів зависі стружки (по 0,1 мг) стерилізували у 70 % спирті впродовж 5 хвилин, потім промивали у стерильному 0,85 % NaCl. Після стерилізації стружку занурювали у пробірки з бульйоном Мюллера–Хінтона (рН 7,4) з розрахунку 1 мг стружки на 1 мл бульйону. Зразки інкубували при 37 °C 72 годин, після чого надосадову рідину (екстракт) відбирали й центрифугували при 3000 обертах 5 хвилин. Екстракт, що отримали, використовували в дослідженнях.

Як тест-мікроорганізми використовували добові культури стандартних еталонних штамів *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*American Type Culture Collection*), з яких методом серійних розведень у фізіологічному розчині (0,85 % NaCl) готували бактеріальну суспензію густиною від

10⁹ КУО/мл до 10⁴ КУО/мл. У кожен пробірку з 2 мл екстракту вносили по 0,2 мл бактеріальної суспензії відповідних розведень. Як контроль використовували пробірки з бульйоном Мюллера–Хінтона без екстракту, в які вносили ці посівні дози мікроорганізмів (контроль росту культури), і пробірки з бульйоном та екстрактом без внесення культури (контроль стерильності середовища). Пробірки з посівами інкубували при 37 °С 72 години. Щодня впродовж інкубації з пробірок робили висів вмісту (0,1 мл) на чашки з агаром Мюллера–Хінтона.

Облік результатів росту *E. coli* і *P. aeruginosa* на агарі (підрахунок колоній, що виростили) виконували після інкубації посівів при 37 °С 24 год. Бактеріостатичну активність екстракту сплаву оцінювали за наявністю/відсутністю візуального росту в пробірках із посівами, бактерицидну – за наявністю/відсутністю росту на чашках з агаром після висівання з пробірок. Антимікробну активність біодеградуючого сплаву досліджували в 5 повторях.

Статистичний аналіз отриманих результатів виконали за допомогою ліцензійних комп'ютерних програм Microsoft Excel 2010 і Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., № JPZ8041382130ARCN10-J). Під час аналізу розподілів кількісних даних визначали міри центральної тенденції – медіана (Me), міри варіації – інтерквартильний розмах у вигляді 25 і 75 перцентилів.

Результати

Встановили, що досліджуваній екстракт металу має високу бактеріостатичну й бактерицидну активність щодо еталонних штамів *E. coli* та *P. aeruginosa*. Під час огляду посівів у бульйоні Мюллера–Хінтона виявили: зростання культур в усіх пробірках з екстрактом і штамами протягом 3 діб візуально не визначили. Такий бактеріостатичний ефект продуктів біодеградації досліджуваного металу, ймовірно, пов'язаний зі значним зрушенням рН середовища в лужний бік до 9,64.

Під час вивчення бактерицидної активності сплаву виявлено, що протягом доби екстракт ефективно знешкоджує 10⁵, 10⁴, 10³ м.к. Зростання культур кишкової та синьогнійної паличок на агарі спостерігали тільки у висівах із пробірок, в які напередодні додано мікроорганізми в концентрації 10⁹ КУО/мл, 10⁸ КУО/мл, 10⁷ КУО/мл. Максимальне зростання колоній на агарі після висіву з цих пробірок зафіксували тільки після першої доби інкубації. Протягом термостатування кількість колоній, що виростала на агарі після другого та третього висівів, суттєво зменшувалась.

Найбільш показова бактерицидна дія екстракту – в досліді із найвищим мікробним навантаженням у 10⁹ КУО/мл. Так, загальна кількість колоній *E. coli*, що виростила після висіву на агар, зменшилась із 220 (після першої доби інкубації екстракту) до 2 колоній після 72 годин витримання рідини в термостаті (табл. 1), а в досліді із *P. aeruginosa* – з 192 до 1 (табл. 2). Аналогічні результати отримали в досліді із меншими мікробними концентраціями, що свідчить про високу чутливість грамнегативних мікроорганізмів до екстракту магнієвого сплаву МЛ-10.

Таблиця 1. Кількість колоній *E. coli* ATCC 25922, що виростили на агарі Мюллера–Хінтона після інкубації в екстракті магнієвого сплаву, Ме (Q25–Q75)

| Час інкубації, години | Посівна доза <i>E. coli</i> , КУО/мл | | |
|-----------------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|
| | 10 ⁹ | 10 ⁸ | 10 ⁷ |
| | Кількість колоній | | |
| 24 | 220 (128–242) | 19 (16–31) | 1,5 (1,0–2,0) |
| 48 | 3 (2–29) | 1,5 (1,0–2,0) | 0 |
| 72 | 2,5 (2,0–3,0) | 0 | 0 |

Таблиця 2. Кількість колоній *P. aeruginosa* ATCC 27853, що виростили на агарі Мюллера–Хінтона після інкубації в екстракті магнієвого сплаву, Ме (Q25–Q75)

| Час інкубації, години | Посівна доза <i>P. aeruginosa</i> , КУО/мл | | |
|-----------------------|--|-----------------|-----------------|
| | 10 ⁹ | 10 ⁸ | 10 ⁷ |
| | Кількість колоній | | |
| 24 | 192 (102–201) | 22 (16–24) | 3 (1,5–4,5) |
| 48 | 18 (1–9) | 2 (1–2) | 0 |
| 72 | 1 (1–1) | 0 | 0 |

Висновки

1. Магнієвий сплав МЛ-10 у рідкому середовищі характеризується високою бактерицидною активністю завдяки утворенню продуктів біодеградації металу в результаті електрохімічної реакції та зміни рН середовища в лужний бік – із 7,4 до 9,6.

2. Грамнегативні мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* високочутливі до екстракту магнієвого сплаву МЛ-10, що підтверджується припиненням зростання тест-штаму *E. coli* ATCC 25922 протягом 3 діб.

3. Екстракт має антибактеріальні властивості щодо музейного тест-штаму неферментуючих грамнегативних мікроорганізмів – *P. aeruginosa* ATCC 27853, пригнічуючи його зростання впродовж 72 годин.

4. Результати досліджень підтверджують можливість застосування сплаву МЛ-10 в складі імплантатів, що мають унікальну особливість – запобігати зростанню збудників імплантат-асоційованих інфекцій.

Перспективи подальших досліджень. Результати, що отримали, свідчать про перспективність наукових досліджень у цьому напрямі, оскільки необхідне вивчення протимікробної активності магнієвого сплаву МЛ-10 щодо клінічних штамів мікроорганізмів – збудників інфекцій, зумовлених медичним втручанням.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Відомості про авторів:

Чорний В. М., канд. мед. наук, доцент каф. травматології та ортопедії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Поліщук Н. М., канд. мед. наук, старший викладач каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Камишний О. М., д-р мед. наук, професор, зав. каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Головаха М. Л., д-р мед. наук, професор, зав. каф. травматології та ортопедії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сведения об авторах:

Чёрный В. Н., канд. мед. наук, доцент каф. травматологии и ортопедии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Полищук Н. Н., канд. мед. наук, старший преподаватель каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Камышный А. М., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Головаха М. Л., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. травматологии и ортопедии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Information about authors:

Chornyi V. M., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Traumatology and Orthopedics, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Polishchuck N. M., MD, PhD, Senior Lecturer of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Kamyshnyi O. M., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Holovakha M. L., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Traumatology and Orthopedics, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Надійшла до редакції / Received: 02.03.2018

Після доопрацювання / Revised: 11.08.2018

Прийнято до друку / Accepted: 23.08.2018

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. – Issue 4. – P. 220–226.
- [2] Infections in orthopedics and traumatology. Pathogenesis and therapy / D. Scheffer, S. Hofmann, M. Pietsch, C. Wenisch // *Orthopade*. – 2008. – Vol. 37. – Issue 7. – P. 709–18.
- [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. – Issue 153. – P. 153rv10.
- [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. – Issue 3. – P. 264–268.
- [5] Outcome of acute prosthetic joint infections due to gram-negative bacilli treated with open debridement and retention of the prosthesis / J.C. Martínez-Pastor, E. Muñoz-Mahamud, F. Vilchez, et al. // *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. – 2009. – Vol. 53. – Issue 11. – P. 4772–4777.
- [6] *Springer Series on Biofilms. Infections of Orthopaedic Implants and Device* / R.A. Brady, J.H. Calhoun, J.G. Leid, M.E. Shirtliff. – New York: Springer, 2009.
- [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 improves their antibacterial properties / He Guanping, Wu Yuanhao, Yu Zhang, et al. // *Journal of Materials Chemistry*. – 2015. – Vol. 3. – Issue 32. – P. 6676–6689.
- [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. – Issue 5. – P. 1869–1877.
- [3] Busscher, H. J., van der Mei, H. C., Subbiahdoss, G., Jutte, P. C., van den Dungen, J. J., Zaat, S. A., et al. (2012) Biomaterial-Associated Infection: Locating the Finish Line in the Race for the Surface. *Science Translational Medicine*, 4(153), 153rv10. doi: 10.1126/scitranslmed.3004528.
- [4] Al-Mulhim, F. A., Baragbah, M. A., Sadat-Ali, M., Alomran, A. S., & Azam, M. Q. (2014) Prevalence of Surgical Site Infection in Orthopedic Surgery: A 5-year Analysis. *International surgery*, 99(3), 264–8. doi: 10.9738/INTSURG-D-13-00251.1.
- [5] Martínez-Pastor, J. C., Muñoz-Mahamud, E., Vilchez, F., García-Ramiro, S., Bori, G., Sierra, J., et al. (2009) Outcome of acute prosthetic joint infections due to gram-negative bacilli treated with open debridement and retention of the prosthesis. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 53(11), 4772–7. doi: 10.1128/AAC.00188-09.
- [6] Brady, R. A., Calhoun, J. H., Leid, J. G., & Shirtliff, M. E. (2009) *Springer Series on Biofilms. Infections of Orthopaedic Implants and Device*. N.Y.: Springer.
- [7] Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358(9276), 135–8.
- [8] Guanping, H., Yuanhao, W., Zhang, Y., Zhu, Y., Liu, Y., Li, N., et al. (2015) Addition of Zn to the ternary Mg–Ca–Sr alloys significantly improves their antibacterial properties. *Journal of Materials Chemistry*, 3(32), 6676–6689. doi: [10.1039/C5TB01319D].
- [9] Robinson, D. A., Griffith, R. W., Shechtman, D., Evans, R. B., & Conzernius M. G. (2010) In vitro antibacterial properties of magnesium metal against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomaterialia*, 6(5), 1869–1877. doi: 10.1016/j.actbio.2009.10.007.

References

- [1] Thakore, R. V., Greenberg, S. E., Shi, H., Foxx, A. M., Francois, E. L., Prablek, M. A., et al. (2015) Surgical site infection in orthopedic trauma: A case-control study evaluating risk factors and cost. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 6(4), 220–6. doi: 10.1016/j.jcot.2015.04.004.
- [2] Scheffer, D., Hofmann, S., Pietsch, M., & Wenisch, C. (2008) Infections in orthopedics and traumatology. *Pathogenesis and therapy. Orthopade*, 37(7), 709–18. doi: 10.1007/s00132-008-1301-x.