

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»

Институт машиностроения

(наименование института полностью)

Кафедра «Нанотехнологии, материаловедение и механика»

(наименование)

22.03.01 «Материаловедение и технологии материалов»

(код и наименование направления подготовки / специальности)

Современные материалы и технологии их производства

(направленность (профиль) / специализация)

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)

на тему Исследование цитотоксичности магниевых сплавов

Обучающийся

А.А. Лядова

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

Д.ф.-м.н. Д.Л. Мерсон

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Тольятти 2022

Аннотация

Пояснительная записка содержит: 54 страницы, 17 рисунков, 8 таблиц, 65 источников.

Данная работа посвящена исследованию цитотоксичности магниевых сплавов.

В введении дается пояснение актуальности, целям работы, задачам, осуществляемым по ходу ее написания.

Работа состоит из 3 глав, где в первой представлен литературный обзор, в котором рассматриваются магниевые сплавы с точки зрения его применения в медицине, приведены некоторые наиболее часто используемые легирующие элементы и проведен анализ публикаций по проблеме отсутствия единой методологии по испытанию сплавов в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Во второй главе подробно рассмотрена методика проведения исследования сплавов на цитотоксические показатели. Описан процесс инкубации клеток, взращивания культуры дермальных фибробластов, стерилизации образцов, подсчета значений пролиферативной активности и времени удвоения.

В третьей главе наглядно представлены результаты трех серий экспериментов, дана оценка показателям полученных значений пролиферативной активности и времени удвоения по истечении времени опыта, проведена оценка морфологии образца и состояния культуры, сделаны выводы по работе.

Abstract

This graduation work is devoted to investigation of magnesium alloys for cytotoxicity.

The introduction provides the relevance of research, the object of the work and task that we need to do.

The work consists of 3 chapters. The first one present a literatute review. The first chapter presents a literature review. It describes the role of magnesium in the biological processes of the body, compares the characteristics of magnesium alloys with other implant materials. It also discusses some alloying metals that improve the properties of magnesium alloys and analyzes recent publications to learn about the most commonly used methods for determining the cytotoxicity of materials due to the lack of uniform rules.

The second chapter discusses in detail the methodology for the study of alloys for cytotoxic indicators in vitro by the method. We wrote about incubation of the cells, cultivation of dermal fibroblasts, sterilization of samples, calculation of proliferative activity and doubling time.

The third chapter clearly shows the results of three series of experiments, asses proliferative activity and doubling time, analyze the morphology of the sample and the state of the culture and draws conclusions on the work.

The explanatory note contains: 54 pages, 17 figures, 8 tables, 65 sources.

Содержание

Введение.....	5
1. Анализ литературы по проблеме исследования.....	7
1.1 Влияние легирующих элементов в составе магниевых сплавов.....	10
1.2 Разновидности доклинических испытаний.....	12
1.2.1 In vitro.....	12
1.2.2 In vivo.....	16
2. Практическая часть.....	19
2.1 Тестируемые материалы и оборудование для исследований in vitro.....	19
2.1.2 Оборудование для доклинических испытаний.....	21
2.2 Исследование in vitro.....	27
2.2.1 Исследование качества стерилизации образцов.....	28
2.2.2 Определение цитотоксичности магниевых сплавов при помощи биохимического метода МТТ-теста.....	28
2.2.3 Определение пролиферативной активности и жизнеспособности фибробластов при внедрении исследуемых материалов.....	30
3. Обсуждение полученных результатов.....	32
3.1 Анализ результатов тестирования биорезорбируемых магниевых сплавов на культурах клеток фибробластов человека.....	32
3.2 Исследование качества стерилизации.....	33
3.3 Определение цитотоксичности.....	34
3.4 Определение пролиферативной активности.....	34
3.4.1 Контрольная культура.....	34
3.4.2 Исследование пролиферативной активности материалов в течении недели эксперимента.....	37
Заключение.....	44
Список используемой литературы.....	46

Введение

Имплантационная хирургия – достаточно перспективная и быстро развивающаяся область медицины.

Для успешных результатов имплантации необходимо учитывать множество факторов, влияющих на правильное заживление и беспроблемную эксплуатацию мини-пластин, винтов, проволок или иных деталей. Нужно иметь в виду плотность, предел текучести, модуль упругости и некоторые другие характеристики используемых материалов.

При разработке импланта с целью лечения и восстановления костных структур нужно делать упор на сохранение и поддержание объема поврежденной кости, обеспечение интеграции импланта с тканями организма.

Наиболее распространенными на данный момент времени являются импланты из титана и его сплавов, также используются нержавеющей сталь, кобальто-хромовые сплавы. Однако часто данные материалы не соответствуют необходимым для использования требованиям. В связи с этим все еще стоит вопрос о разработке более подходящего для трансплантации материала. Также часто проблемой является необходимость проведения повторной операции с целью извлечения импланта из восстановленной костной ткани.

Именно поэтому одним из самых перспективных материалов для имплантации на данный момент является магний. Данное вещество обладает полной биосовместимостью, способностью полностью растворяться внутри организма. При этом сразу же встает задача по достижению оптимального времени растворения импланта внутри организма с сохранением при этом определенных значений механических свойств. Достигнуть нужных результатов можно с помощью специальных покрытий, созданием сплавов с некоторыми другими металлами и определенными параметрами обработки.

Одним из важнейших свойств в эксплуатационной хирургии является цитотоксичность материала, именно исходя из этого, из меры повреждения живых клеток тканей и органов, делается первичный вывод о пригодности сплава к использованию в качестве имплантата.

Цель представленной бакалаврской работы – исследование параметров цитотоксичности различных магниевых сплавов в процессе проведение пробирочных *in vitro* исследований.

В бакалаврской работе решаются следующие специфические задачи:

- поиск, изучение и анализ научных публикаций по теме исследования;
- освоение проведения исследований *in vitro*;
- провести исследование выбранных для анализа магниевых сплавов;
- сделать выводы о пригодности того или иного материала в качестве материала для остеосинтеза.

1. Анализ литературы по проблеме исследования

Магний – химический элемент, относящийся к группе щелочноземельных металлов. Обратить внимание на данный магний в качестве материала, пригодного для использования в медицинских целях, заставило его большое биологическое значение внутри организма. Достоверно известно, что этот металл является жизненно-важным элементов в организме человека, и, на ряду с такими элементами как кальций, натрий и калий, входит в список наиболее высоких по содержанию внутри клетки. Магний принимает участие в огромном количестве ферментивных реакций, в том числе связанных с утилизацией энергии, расщеплением глюкозы, данный элемент также способствует лучшему усваиванию витаминных комплексов, стабилизирует костную структуру [58].

Данные факторы указывают на хорошие показатели биосовместимости чистого магния, что подтверждается способностью магния полностью растворяться внутри организма – биорезобируемостью. Помимо этого, было установлено, что магний обладает целым рядом свойств, чьи показатели схожи со значениями этих же свойств для человеческой кости [27].

Таблица 1 - Механические свойства чистого магния в сравнении с костью человека

Материал	Плотность г/см ³	Предел текучести	Предел прочности	Относительное удлинение, %	Модуль упругости, ГПа
Кость	1,8–2,1	104–121	110–130	0,7–3	15–25
Чистый Mg	1,74–2,0	65–100	90–190	2–10	41–45

Данные факторы сподвигли исследователей рассмотреть магний как особо перспективный материал для сплавов, используемых в остеосинтезе.

При этом нельзя сказать, что использование магния для имплантационной хирургии новое явление – первые случаи хирургических

операций по внедрению деталей из магния известны еще в начале 20 века. Так, к примеру в одном только 1900 году известно как минимум о двух случаях: операция Е.Рауга на сонной и бедренной артериях собак с использованием магниевых разъемов для лечения ангиом [34] и операция Пайронда и Мартина на женщине с целью удаления раковой опухоли желчного пузыря, во время которой была выполнена резекция печени с помощью магниевых пластин [50]. Однако в связи с малым изучением материала на тот момент времени и преобладания доли имплантов из других сплавов в течении долгого времени магний не получал широкого распространения в этой области медицины.

Достаточно распространенными материалами для использования в качестве имплантов являются нержавеющей стали марок Х9Н0ТВ и Х18Н10Т, сплавы на основе титана, керамические и полимерные материалы. У каждого из представленных материалов есть ряд преимуществ и недостатков: нержавеющей стали обладают невысокой стоимостью и несложным технологическим процессом создания, титановые сплавы отличаются высокой биологической инертностью и коррозионной стойкостью [64], но их механические свойства сильно расходятся с соответствующими у кости, что может привести к стрессовым переломам, миграции импланта, также продукты их коррозии могут вызвать локальный воспалительный процесс, что также препятствует правильному заживлению перелома и ставит под угрозу здоровье пациента [41]. Также из-за отсутствия такого свойства как биорезорбируемость перед докторами встает задача проведения повторной операции по удалению импланта из организма спустя некоторое время после восстановления. Полимерные материалы же, пусть и обладают биоразлагаемостью, их механические свойства пока ниже требований, предъявляемым для остеосинтеза [63].

В таблице 2 приведены данные о механических свойствах основных материалов, используемых для остеосинтеза

Таблица 2 – Механические свойства наиболее часто используемых для остеосинтеза материалов

Материал	Плотность г/см ³	Предел текучести, МПа	Предел прочности, МПа	Относительное удлинение, %	Модуль упругости, ГПа
Кость	1,8–2,1	104–121	110–130	0,7–3	15–25
Биоразлагаемые материалы					
Чистый Mg	1,74–2,0	65–100	90–190	2–10	41–45
AZ31	1,78	185	263	15-23	45
AZ91	1,81	160	150	2,511	45
Fe–20Mn	7,73	420	700	8	207
Fe–35Mn	-	230	430	32	-
Zn–Al–Cu	5,79	171	210	1	90
Неразлагаемые материалы					
SS316L	7,9	190	490	40	200
Ti–6Al–4 V	4,43	880	950	14	113,8
Ti–6Al–7 Nb	4,52	800	900	10	105
Co–20Cr– 15Ni–7Mo	7,8	240-450	450-960	50	195-230
Керамика	4	400-580	400-580	0,12	260-410

Несмотря на хорошие механические показатели магния и его биорезорбируемость, ограниченное распространение магния в остеосинтезе до недавних пор связано также с природой самого элемента. Как щелочноземельный металл, магний при контакте с водой вступает с ней химическую реакцию, образуя щелочь $Mg(OH)_2$, в результате чего происходит образование серой окисной пленки, замедляющей коррозию потенциального импланта. При этом в физиологической среде эта пленка может раствориться из-за новых химических реакций, например, с ионами хлора, и тогда на выходе мы получим газообразный водород. Наличие газообразного водорода внутри организма является крайне нежелательным и сильно препятствует правильному процессу заживления тканей и органов [27]. Также проблемой является недостаточная жесткость некоторых сплавов и достаточно быстрая биологическая коррозия [63], которая должна быть

медленнее самого процесса восстановления костной ткани для достижения правильного процесса реставрации кости. Добиться подобных результатов можно с помощью нанесением защитных покрытий [40, 44, 49], легирования сплава различными элементами [13, 15].

1.1 Влияние легирующих элементов в составе магниевых сплавов

Легирование сплава является одним из действенных способов воздействия на его эксплуатационные характеристики. С помощью легирующих элементов можно успешно влиять на скорость и характер коррозии сплава, на его прочностные характеристики, пластичность и жесткость.

Наиболее распространенными легирующими элементами для магниевых сплавов являются алюминий, цинк, кальций и некоторые редкоземельные металлы. [40,44,49,13,15]

Алюминий

С помощью алюминия становится возможным упрочнение магниевого сплава по твердорастворному механизму. Также в небольших количествах, содержанием до 4%, данный металл повышает коррозионную стойкость сплава. Однако необходимо с повышенной внимательностью оценивать концентрацию данного элемента в сплаве, так как при достижении определенного критического значения алюминий уже не замедляет коррозию, а наоборот, ускоряет [36, 29].

Также стоит отметить токсичность алюминия, что ведет к возникновению патологических процессов в организме при вживлении импланта, легированного излишним количеством алюминия.

Цинк

Цинк – нетоксичный для человеческого организма металл, что открывает возможность достаточно широко использовать его в качестве

легирующего элемента в медицинских целях. Легирование магния цинком влияет на размер зерна и дисперсность вторичных фаз. При небольших концентрациях цинка (до 2 %) реализуется механизм твёрдорастворного упрочнения за счёт равномерного распределения цинка в матрице. То есть увеличивается пороговое напряжение скольжения дислокаций по базисной плоскости [47] и увеличение границ зёрен, которые препятствуют движению дислокаций. Также цинк хорошо сказывается на коррозионные свойства сплава и позволяют увеличить количество примесей в сплаве [46].

Кальций

Кальций – важнейший элемент в составе костной ткани, который способствует ее упрочнению. Неудивительно, что кальций часто используют как легирующий элемент для остеосинтеза. Сплавы системы Mg-Ca близки по плотности к кости. Добавление кальция приводит к измельчению зерна в структуре сплава и образованию новых фаз, что приводит к увеличению прочности и коррозионной стойкости сплава соответственно. Однако следует отметить, что при повышении доли кальция в сплаве больше 1% он охрупчивается, а процесс коррозии сплава ускоряется из-за большого содержания фазы Mg_2Ca , которая осаждаётся на границах зёрен [24]. Это и неоднозначность влияния на механические свойства делает необходимым использовать дополнительные легирующие элементы при добавлении кальция в сплав [52 51].

Редкоземельные металлы

Редкоземельные металлы положительно влияют на механические свойства сплавов, их коррозионную стойкость. Они повышают прочностные характеристики материала не только по твёрдорастворному, но и по дисперсионному механизму, причиной чему служат образовавшиеся интерметаллидные фазы между редкоземельными металлами и магнием/алюминием.

Из-за отсутствия металлов данной группы в организме человека, перед использованием их в сплавах биологического назначения необходимо провести предварительные исследования на токсичность для организма [51].

1.2 Разновидности доклинических испытаний

В настоящий момент для магниевых сплавов медицинского назначения, предназначенных для остеосинтеза, не существует строго регламентированных стандартов по тестированию *in vitro* и *in vivo*. Разные исследовательские группы используют разные растворы, культуры для взращивания, проводят разные по длительности эксперименты

1.2.1 In vitro

С целью первичного отсева неподходящих для имплантации образцов материалов проводятся предварительные *in vitro* испытания сплавов на цитотоксичность.

In vitro исследования используются в качестве замены, сокращения и уточнения тестов *in vivo*. Исследования *in vitro* проводятся для измерения параметров цитотоксичности, скорости и характера коррозии сплава. Проведения подобных экспериментов позволяет прогнозировать количество неблагоприятных исходов, избежать и снизить число классических летальных тестов при доклинических испытаниях.

In vitro исследования представляют из себя проведение пробирочных экспериментов в искусственно созданных условиях. Очень часто подобные опыты используются в сфере медицины, фармакологии, биохимии и многих других областях науки [19].

В ходе проведения пробирочных экспериментов используются разные методики, которые предполагают под собой использование разных реактивов и оборудования

В ходе проведения исследования обязательным является процесс взращивания культуры клеток, выделяемых из живой ткани и взращенных в

контролируемых по всем правилам условиям. Общими для выращивания культур большинства клеток являются наличие определенной среды, необходимой для выращивания, сосуда, где данная среда располагается, искусственный субстрат для прикрепления культуры к поверхности и непосредственно сама поверхность для сцепления культуры. Для проведения культивирования нужна подходящая культурная среда, CO₂ – инкубатор для поддержания определенного уровня pH и поддержания осмотического давления.

Залог активного размножения клеток и формирования равномерного монослоя является большое содержание питательных веществ в ростовой среде. В качестве ростовой среды могут быть использованы естественные продукты, будь то биологические жидкости, субстраты, являющиеся продуктами переработки биологических жидкостей, и искусственно синтезированные среды, представляющие из себя группы органических и неорганических солей, аминокислот и витаминов. Наиболее часто используемыми ростовыми средами в исследованиях, посвященных исследованию магниевых сплавов являются SBF [31, 2] в различных модификациях и раствор Хэнкса [18, 30]. Также на практике используются физиологический раствор, раствор хлорида натрия [14, 3], среда DMEM [18, 30], среда MEM [37]. В качестве добавки к среде в большинстве случаев используется фетальная бычья сыворотка [31], получаемая из крови крупного рогатого скота. Причиной ее применения является низкий уровень антител сыворотки и большое число факторов роста [53]. Стоит отметить, что в некоторых работах эксперименты проводят в условиях нескольких сред для составления наиболее полной картины процесса коррозии материала и уточнения полученные данные о цитотоксичности сплава.

Simulated Body Fluid

SBF (Simulated Body Fluid, имитация жидкости организма) – раствор, чья концентрация ионов и неорганический состав близки к таковым в плазме

крови человека [45]. Данный раствор при проведении In vitro исследований используется для изучения образования слоя кальций фосфатов на поверхности имплантов, что позволяет предсказать биологическую активность импланта в организме в условиях in vivo экспериментов [45]. Данные факты делают этот раствор и его модификации достаточно распространенным выбором для использования его в медицинских целях при исследовании пригодных для остеосинтеза материалов. Появление модификаций данного раствора обусловлено попытками максимально приблизить концентрацию ионов к параметрам реальной плазмы [7].

Раствор Хэнкса

Раствор Хэнкса также достаточно часто используется для культивации клеток и применяется для поддержания оптимального параметра водородного потенциала [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Классический рецепт раствора Хэнкса представлен в таблице 3 [16].

Таблица 3 – рецепт раствора Хэнкса

Компонент	Концентрация
NaCl	0,14 М
KCl	0,005 М
CaCl ₂	0,001 М
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.0004 М
MgCl ₂ -6H ₂ O	0.0005 М
Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O	0.0003 М
KH ₂ PO ₄	0.0004 М
D-Glucose	0.006 М
NaHCO ₃	0.004 М

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) и Minimum Essential Media (MEM)

DMEM и MEM является одними из наиболее часто используемых искусственных сред для культивирования клеток и являются модификациями

среды Basal Medium Eagle с существенно увеличенным числом витаминов, аминокислот и добавок, улучшающих рост клеток. Среда DMEM широко применяется для культивирования первичных и диплоидных клеток [17, 39]. Эта сухая среда представляет собой смесь большого количества неорганических солей, витаминов, аминокислот, глюкозы и фенола красного для приготовления раствора. MEM обычно использую для культивирования клеток костного мозга и амниотических клеток для анализа хромосом [28].

Earle's Balanced Salt Solution (EBSS)

Сбалансированный солевой раствор Эрла (EBSS) представляет собой изотонический буферный раствор, содержащий в своем составе неорганические соли магния, натрия и кальция, глюкозу и фенол красный. Он используется для кратковременного поддержания клеток в среде CO₂, очистки клеток перед диссоциацией и транспортировке тканей и клеток, разбавления клеток для подсчета реагентов [10].

По вопросу о целесообразности проведения предварительного *in vitro* перед тестированием на животных до сих пор ведутся обширные дискуссии. Различные исследовательские группы проводят сравнение скорости коррозионных процессов в клеточной культуре и внутри непосредственно животного организма. В зависимости от разных условий проведения испытаний и использования различных сред и применяемых сплавов ученые получают противоречивые результаты. Часть исследований указывает на существенную разницу в скорости коррозии при проведении *in vitro* и *in vivo* испытаний. Для образцов сплавов AZ91D, LAE442 помещенных в культуральную среду и прикрепленную к бедренной кости морской свинки скорость коррозии различается на 4 порядка и медленнее протекает в условиях *in vivo* [12]. В других работах описано, что при разных методиках проведения эксперимента различается не только скорость коррозии, но и ее механизм: в *in vitro* более ярко выражены процессы локальной коррозии, в то время как в *in vivo* она имела более равномерный однородный характер [54].

Однако есть работы, в которых показано, что при правильном подборе состава раствора можно добиться скорости коррозии, приближенной к таковой при проведении *in vivo* испытаний. Так сплавы AZ31, Mg-0,8Ca, Mg-1Zn, Mg-1Mn, Mg-1,34Ca-3Zn и чистый магний при погружении в сбалансированный солевой раствор Эрла (EBSS) показал значения скорости коррозии аналогичные к таковой при имплантации образцов лабораторным крыса, из чего можно сделать вывод, что данный раствор является подходящей средой для проведения испытаний в данной сфере [48].

Для отслеживания токсичного влияния магниевых сплавов определенного состава используются различные клеточные культуры. Обычно, для этого используются клетки типа фибробластов, полученных, однако, разными путями. Так на практике в работах исследователей можно увидеть использование клеток L929, полученных из жировой ткани мышей, MG-63, источником которых являются человеческие кости [35], макрофагов RAW267 из мышечной ткани вышей [9] и VSMC [35] – клетки сосудистой стенки. Также в подобных экспериментах использовались клетки остеогенной саркомы человека [23] и первичные клетки, полученные из дебриса [43].

Наиболее распространенными красителями при оценке жизнеспособности клеток культуры являются AlamarBlue [23], при использовании которого метод анализа основан на окислительно-восстановительной реакции с использованием флуоресцентного красителя резазурина, и МТТ [35], где при тестировании оценивается мера митохондриального дыхания клеток, на которое указывает процесс восстановления желтого тетразола в пурпурный формазан.

1.2.2 In vivo

Методы *in vivo* подразумевают под собой проведение экспериментов на или внутри живой ткани живого организма. В это понятие входят проведение тестирования на животных и клинических испытаний.

Проведение опытов *in vivo* позволяет не только дать более точную оценку процессу коррозии и токсичного воздействия образца на организм, но и проследить непосредственное влияние имплантов определенного сплава на заживление перелома и дать точный ответ относительно его пригодности для применения в медицинских целях. В таблице 4 представлено сравнение клинических испытаний и тестирования на животных с пробирочными опытами.

Несмотря на целый ряд преимуществ, а именно возможность изучить гораздо более широкий спектр свойств образца, что позволяет составить наиболее полную картинку и его поведении в процессе эксплуатации, методы *in vivo* сопряжены с трудностью их выполнения, необходимостью медицинской квалификации и соблюдения строгих правил этики, обеспечивающих безопасность участников эксперименты, и законов, регламентирующие правила проведения опытов на животных.

Таблица 4 - Методы оценки биоразлагаемости магния [35]

Метод	Скорост ь коррози и	Потери образца в форме/объем е	Формировани е новой кости	Прочности поверхност и кости	Газообразовани е	Воспалительны е процессы
In vitro	+	+	-	-	-	-
На животных	+	+	+	+	+	+
Клинически е испытания	+	+	+	+	+	+

Для правильного выбора лабораторного животного для исследования необходимо учитывать следующие факторы:

- размер животного;

- сходство строения, физиологии, функционирования органов и метаболизма;
- сходство патологических процессов и заболеваний.

На основе изученных публикаций можно сделать вывод, что при выборе животных для проведения тестирования чаще всего предпочтение отдается крысам [9,23,43,11] и кроликам [20,8,1,26,6]. Связано это, вероятнее всего с тем, что проведение опытов на мелких животных является более экономически выгодным: для животных небольшого размера требуется меньше корма, для них требуется меньший расход реактивов и препаратов, а также меньшие размеры имплантатов.

Также стоит отметить, что по сравнению с козами [38], овцами [4, 33], свиньями [42,5], которые тоже были использованы в экспериментах, выбор мелких животных позволяет увеличить многочисленности группы животных, что позволяет за счет увеличения статических данных получить более точные результаты и провести их более корректный анализ в рамках опыта.

При этом нередко озвучивается мысль, что использование мелких животных полезно и применимо скорее только для оценки токсичности сплавов для остеосинтеза, так как их организмы не соответствуют условиям человеческого тела в достаточной мере.

2. Практическая часть

Поскольку данное исследование имеет прямое отношение к медицине, оно было проведено совместно с Институтом экспериментальной медицины и биотехнологий СамГМУ.

На базе данного института было проведено тестирование нескольких образцов биоразлагаемых магниевых сплавов *in vitro* методом на культуре клеток дермальных фибробластов человека. Нашей задачей было определить цитотоксичность материалов, влияние его на пролиферативную активность и жизнеспособность дермальных фибробластов, являющихся основным клеточным компонентом соединительной ткани кожи.

2.1 Тестируемые материалы и оборудование для исследований *in vitro*

В ходе работы было проведено исследование 6 магниевых сплавов, различающихся по компонентам и химическому составу и по способу термомеханической обработки.

Для эксперимента были сделаны образцы двух разных видов:

- квадратные пластины 5х5 миллиметров толщиной около 2 миллиметров по 15 штук на каждый материал;
- диски радиусов 2 миллиметра по 9 штук для каждого сплава около 2 миллиметров в толщину.

Образцы различаются между собой визуально по цвету, по состоянию поверхности, по текстуре поверхности (рисунок 1).

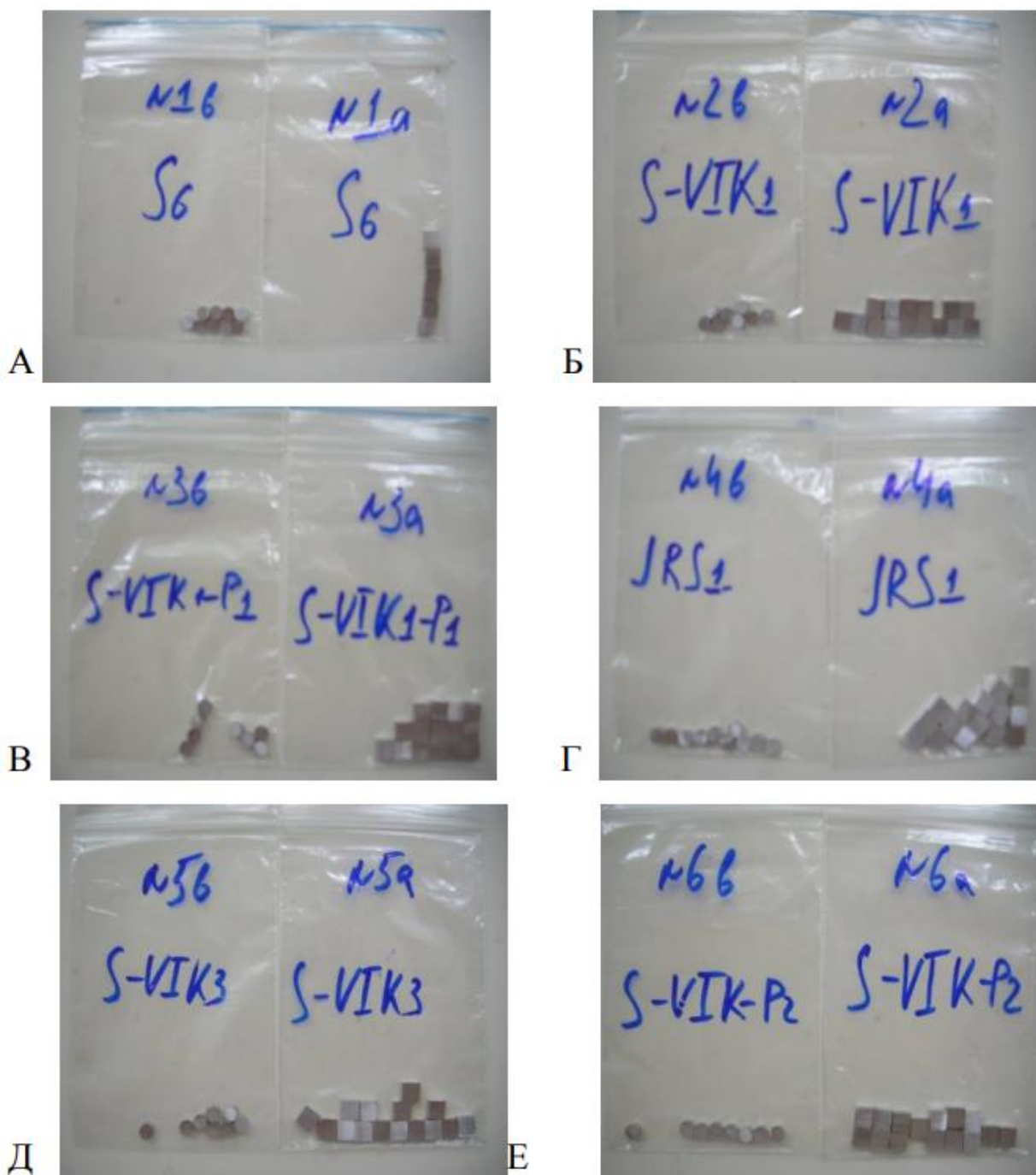


Рисунок 1 – снимок расфасованных образцов: А- образец №1, Б – образец №2, В – образец №3, Г – образец №4, Д – образец №5, Е – образец №6

В таблице 5 представлены сведения о составе и обработке сплавов, используемых в исследовании.

Таблица 5. Состав и режим обработки магниевых сплавов, используемых для образцов

Номер образца	Маркировка	Сплав	Режим обработки
1	S6	Mg-4Zn-0.15Ca	1) гомогенизация 450 оС/12ч; 2) РКУП 14x14 mm 2 прохода Bc 415 оС
2	S11-VIK1	Mg-1Zn-0.16Ca	1) гомогенизация 450 оС/12ч; 2) ВИК в интервале температур (400÷300) оС в 5 проходов с понижением температуры на каждом переходе на 25 оС
3	S11-VIKP1	Mg-1Zn-0.16Ca	1) гомогенизация 450 оС/12ч; 2) ВИК в интервале температур (400÷300) оС в 5 проходов с понижением температуры на каждом переходе на 25 оС; 3) Осадка; 4) Изотермическая прокатка
4	J-RS1	Mg-0.38Zn-1Y	Метод быстрой закалки спиннингованием расплава с последующим компактированием
5	S3-VIK3	Mg-1Zn-2,9Y	1) гомогенизация 450 оС/12ч; 2) ВИК в интервале температур (400÷300) оС в 5 проходов с понижением температуры на каждом переходе на 25 оС
6	S12-VIKP2	Mg- 2.51Zn-6.84Y-0.6Zr	1) гомогенизация 450 °С/12ч; 2) ВИК в интервале температур (400÷300) °С в 5 проходов с понижением температуры на каждом переходе на 25 °С; 3) Осадка; 4) Изотермическая прокатка 300 °С

2.1.2 Оборудование для доклинических испытаний

Для проведения исследования применяли следующие материалы и оборудование:

- ламинарный бокс БАВп-01 «Ламинар-С» (ЗАО «Ламинарные системы», Миасс, РФ) второго класса биологической защиты (рисунок 2);



Рисунок 2 – Ламинарный бокс БАВп-01 «Ламинар-С» [55]

- ламинарный бокс необходим при исследовании для того, чтобы обезопасить исследователя при работе с патогенными агентами и микроорганизмами;
- CO₂-инкубатор MCO-18AC (Sanyo – Incubator, MCO-18 A, Япония) (рисунок 3);



Рисунок 3 – CO₂-инкубатор MCO-18AC [62]

- ламинарные боксы применяются для культивирования культур клеток и микроорганизмов, для выращивания которых требуется высокий уровень углекислого газа. В ламинарных боксах можно регулировать содержание углекислого газа внутри устройства, обеспечивая максимально благоприятные для выращивания условия.
- рефрижераторная центрифуга Eppendorf 5702R (Германия) (рисунок 4);



Рисунок 4 – Рефрижераторная центрифуга Eppendorf 5702R [60]

Данная модель центрифуги является многофункциональной и обладает функцией автоматического охлаждения, что позволяет избежать перегрева исследуемых образцов.

- система визуализации – аппаратно-программный комплекс (АПК) на основе инвертированного микроскопа Olympus CKX 41 («Olympus», Япония), цветной цифровой камеры Olympus SC100 («Olympus», Корея) и стационарного компьютера, с программным обеспечением CellSens Standart 1.7 («Olympus», Япония);
- система визуализации – аппаратно-программный комплекс (АПК) на основе исследовательского микроскопа Olympus BX41 («Olympus», Япония), цветной цифровой камеры «ProgR CF» и стационарного компьютера с программным обеспечением «Морфология 5.2» («ВидеоТест», Россия);
- люминесцентный микроскоп Leica DMIL LED («Leica», Германия);
- системы визуализации, цифровые и люминесцентные микроскопы и камеры позволяют провести комплексное визуальное исследование образцов, сделать вывод о состоянии культуры, ее цитоплазмы, количества клеток, наличия или отсутствия жира, поверхности материала;
- автоматический цифровой счётчик клеток Scepter™ (Merck Millipore, Германия) (рисунок 5);



Рисунок 5 – Автоматический цифровой счётчик клеток Scepter™ [61]

Как следует из названия, данное устройство позволяет провести подсчет частиц в исследуемом объекте. Аппарат удобен своей портативностью и возможностью работать с частицами особенно мелкого размера.

Спектрофотометр СФ-56 («ЛОМО-Микросистемы», Россия) (рисунок 6);

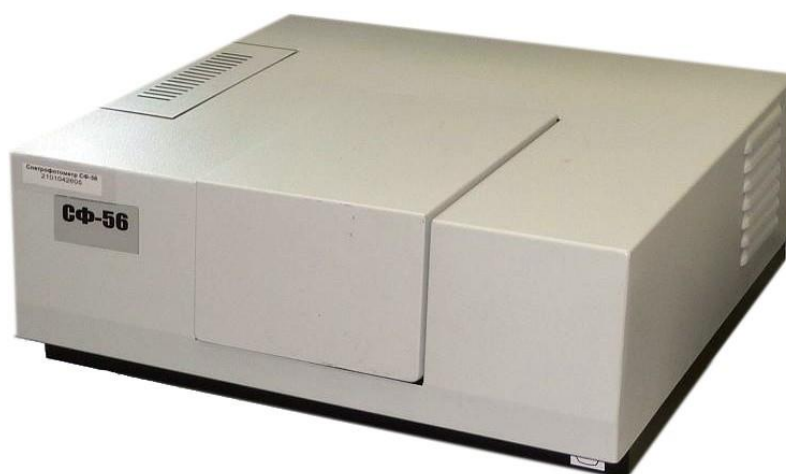


Рисунок 6 – Спектрофотометр СФ-56 [65]

Спектрометр данной модели предназначен для измерения коэффициентов пропускания жидких и твердых веществ. Можно проводить замер таких параметров как длины волн, концентрации. С помощью косвенных измерений затем рассчитывать оптическую плотность, кинетические измерения, плотность и цветовых характеристик.

Планшетный ридер Infinite M200 PRO («TECAN», Швейцария) (рисунок 7);

Планшетный ридер часто используется при биологических исследованиях, позволяя вычислить количество белка, жизнеспособность клеток, взаимодействие молекул и другие параметры;



Рисунок 7 – Планшетный ридер Infinite M200 PRO [59]

Одноразовая пластиковая посуда квалификации «для культур клеток»: культуральные флаконы 25см² и 75 см² («TPP», Швейцария); чашки Петри диаметром 3,5 см («Orange Scientific», Бельгия); 24-луночные планшеты с плоским дном со вставками («NUNK», США), пипетка 2 мл, стерильная («Orange Scientific», Бельгия); пипетки 5 мл, 10 мл, стерильная («Orange Scientific», Бельгия); центрифужные пробирки 15 мл, 50 мл стерильная («Jet BioFil», Китай); наконечники для дозаторов, Top-Line®, 100- 1000мкл, без

филтра, DNase-RNase-Free, стерильные, («Orange Scientific», Бельгия); наконечники для дозаторов желтые 5-200 мкл («Thermo Fisher Scientific», Россия).

Реактивы для выращивания клеток квалификации «для культур клеток» производства ООО «Биолот», Россия: сыворотка крови плодов коровы жидкая, стерильная; среда питательная 199 с L- глутамином (смесь неорганических солей, аминокислот, витаминов и глюкозы, растворенная в дистиллированной воде), жидкая, стерильная; раствор Хенкса без фенолового красного стерильный; Версена раствор 0,02%, стерильный; коллагеназа из панкреаса краба, лиофилизированная;

- 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (тетразолиевый краситель) (Sigma Aldrich, США);

- диметилсульфоксид (ООО «Биолот», Россия);

- трипанового синего 4% раствор (ООО «Биолот», Россия);

- судан IV (ООО «БиоВитрум», Россия);

- гематоксилин (ООО «БиоВитрум», Россия);

- тестирование образцов проводилось согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011 [56]. Фибропласты были выращена по методике первичных эксплантов [57] в CO₂ инкубаторе при T=37 C°, постоянной влажностью, 5% CO₂ в среде 199 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина. Выращенные образцы были исследованы на чистоту и отсутствие посторонних компонентов.

Образцы подверглись стерилизации при температуре 180 C° в течении часа для того, чтобы соответствовать всем требованиям.

2.2 Исследование in vitro

Образцы подверглись 3 последовательным сериям экспериментов:

- исследование качества стерилизации образцов;

- определение цитотоксичности представленных образцов с использованием технологии МТТ-теста;
- определение пролиферативной активности и жизнеспособности фибробластов в присутствии материалов.

2.2.1 Исследование качества стерилизации образцов

Для образцов был использован метод сухожаровой стерилизации, для необходимых условий асептики и антисептики чашки Петри с каждым образцом подвергали обработке в CO₂-инкубаторе на протяжении 2 суток.

На достаточное качество стерилизации указывала прозрачность наблюдаемой среды. При дальнейшем исследовании среды в кашках Петри при помощи инвертированного микроскопа были обнаружены отделившиеся с поверхности материалов оптически плотные частицы. В связи с данным фактом образцы в дальнейшем помещались на мембраны планшетных вставок для последующих испытаний на цитотоксичность. Данный выбор был сделан исходя из особенностей данного оборудования: при установке вставок в планшетные лунки образуется зазор 2 миллиметра от дна лунки, мембрана удерживает отделившиеся частицы, что приводит к отсутствию возможного повреждения клеток.

2.2.2 Определение цитотоксичности магниевых сплавов при помощи биохимического метода МТТ-теста

Сначала дермальные фибробласты были помещены на дно лунок в дозе 20000 клеток на см², культивирование происходило в стандартных условиях с использованием полной ростовой среды. Культура подвергалась постоянной замене на свежую при достижении 80% конфлюентности для обеспечения чистоты эксперимента. Квадратные образцы сплавов помещали во вставки планшета, где проходило культивирование еще в течении 2 суток (рисунок 8).

При данном исследовании отслеживалось следующее: полная ростовая питательная среда, образец данного магниевого сплава, погруженный в полную ростовую питательную среду без клеток, и сама

культура клеток в полной ростовой питательной среде. Под каждый было выделено по 6 лунок из культуральных планшетов.

Каждый день в течении исследования проводилась визуальный контроль путем фотографирования культуры с использованием инвертированного микроскопа Olympus СКХ41 с масштабированием 100 и 200. Была произведена оценка особенностей структуры клеток и монослоя в различных участках.

По истечению двух суток культивируемые образцы прошли биохимический тест МТТ. В данном тестировании оценивается жизнеспособность клетки по митохондриальному дыханию, которое отслеживается по накоплению кристаллов формазана в цитоплазме. Чем больше количество образовавшихся кристаллов – тем больше осталось живых клеток. О числе кристаллов можно сделать вывод исходя из интенсивности фиолетовой окраски. Для ее определения использовали планшетный ридер. Экспериментальные образцы и соотношение живых и поврежденных клеток сравнивались с контрольными образцами.

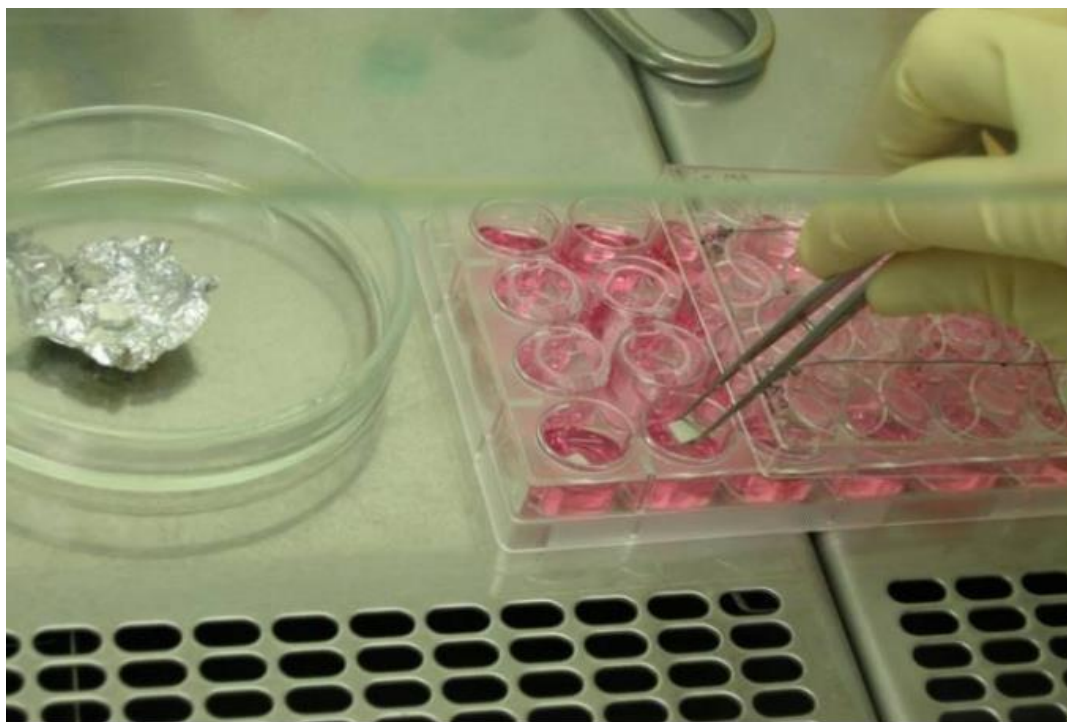


Рисунок 8 – Помещение образцов во вставки культурального планшета

2.2.3 Определение пролиферативной активности и жизнеспособности фибробластов при внедрении исследуемых материалов

Для определения морфофункционального состояния клеток использовали как морфологические, так и морфометрические методы.

Дермальные фибропласты в количестве 10000 клеток на квадратные сантиметр высевали в 24 лунки планшета, где культивировали в течении суток в стандартных условиях CO₂-инкубатора. Удостоверившись, что клетки надежно и равномерно были прикреплены на дно лунок их соединились в 2 экспериментальные группы с помощью их отростков. Для разных групп были применены разные методы.

Группа 1 подверглась методу прямого контакта. Образец материала прикладывался на прямую на поверхность монослоя после чего эксперимент отслеживался в течении 72 часов. В это время в группе 2 исключили любую возможность механического повреждения монослоя, экспериментальные образцы клались на мембраны планшетных вставок, где культивирование проходило уже неделю. Каждый день над экспериментами проводился визуальный мониторинг с помощью инвертированного микроскопа Olympus СКХ 41 и программного обеспечения CellSens Standart 1.7. По сделанным снимкам оценивалась структура монослоя и количество клеток на 1 квадратный миллиметр. Для оценки количества именно жизнеспособных клеток монослой окрашивался трипановым синим, а для отслеживания изменения структуры - гистологическую окраску суданом IV и гематоксилином Майера по стандартным методикам.

По истечению времени опыта препараты окрасили гематоксилином Майера и суданов IV, над образцами провели визуальное исследование с целью изучения особенностей структуры, рельефа и общей морфологии образцов, для чего был использован микроскоп Olympus VX41 и ПО «Морфология 5.2». Снимки были сделаны при увеличении 100, 200 и 400.

Пролиферативную активность и жизнеспособность клеток характеризовали на основании следующих показателей: плотность монослоя на единицу площади, индекс пролиферации, время удвоения культуры, количество удвоений, соотношение живых и поврежденных клеток в монослое.

Индекс пролиферации IP определялся как отношения количества клеток монослоя после культивирования N_t в течении суток к исходному количеству N_1 .

$$IP = \frac{N_t}{N_1} \#(1)$$

Формула для вычисления удвоения выглядит следующим образом:

$$TD = \frac{t \cdot x \cdot \lg 2}{\lg \left(\frac{N_t}{N_1} \right)} \#(2)$$

где t – время роста культуры в часах.

Количество удвоений культуры находится по данной формуле:

$$KD = \frac{\lg N_t - \lg N_1}{\lg 2} \#(3)$$

Для результатов экспериментов была вычислена равнозначность сравниваемых групп по методы Вилкоксона-Манна-Уитни. Была проведена оценка среднего арифметического значения и стандартного отклонения. Установлено, что вероятность ошибки первого рода составляет значение менее 0,05. Для проведения анализа была использована программа Excel 2010.

3. Обсуждение полученных результатов

3.1 Анализ результатов тестирования биорезорбируемых магниевых сплавов на культурах клеток фибробластов человека

После того как образцы были помещены в культуральную среду мы смогли наблюдать выделение газа в виде пузырьков водорода из-за начавшейся реакции магниевых сплавов с водой, которые спустя несколько часов сформировались в кольцо вокруг самого образца. По мере слежки за образцами мы можем сделать вывод, что размер самих газовых колец зависит исключительно от химического состава образца. Данная реакция продолжалась вплоть до финала эксперимента.

Также в ходе эксперимента мы наблюдали за изменением цвета фенолового индикатора. Красный цвет переходит с желтовато-красного к фиолетовому разных оттенков и насыщенности, что говорило об изменении среды в щелочную сторону. Подобные превращения стали заметны спустя всего два часа после начала наблюдения. Насыщенность цвета возрастала при увеличении длительности опыта (рисунок 9).

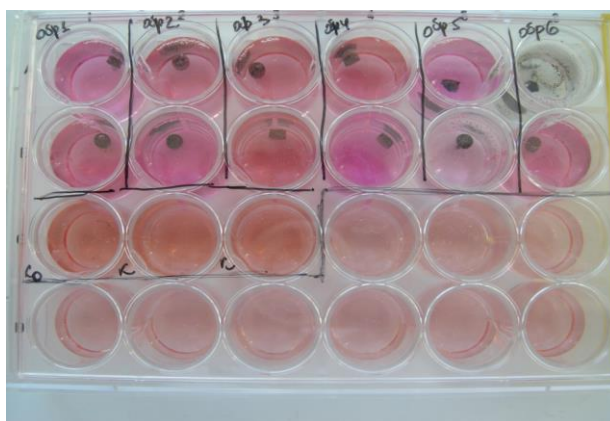


Рисунок 9 – Серия III, группа 1. 7 суток эксперимента после помещения образцов на монослой фибробластов человека. Общий вид планшета с внесенными образцами

Для каждого материала были замечены свои особенности в ходе эксперимента. Так, например, 6 подгруппа характеризовалась постепенным снижением насыщенности цвета среды, а на дне лунок были замечены оптически плотные частицы, количество которых в 6 группе значительно превышало таковое в остальных (рисунок 10).

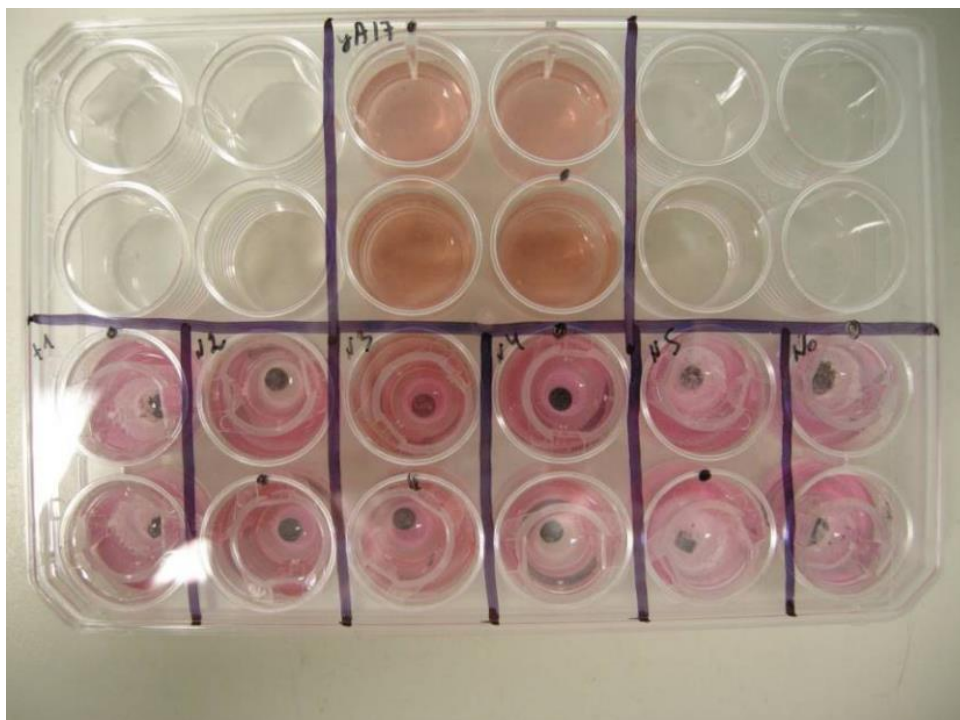


Рисунок 10 – Серия III, группа 2. Внешний вид планшета с помещенными во вставки образцами, стрелками указаны кольца из пузырьков газа вокруг образцов

3.2 Исследование качества стерилизации

После воздействия на образцы сухим жаром в течении часа при температуре 180°C была обеспечена стерильность образцов. Изменения внешнего вида, формы или объема образца при этом не наблюдалось.

3.3 Определение цитотоксичности

Результаты МТТ-теста приведены в Таблице 6. Как видно из нее, все материалы в той или иной степени вызывают гибель дермальных фибробластов в культуре. По цитотоксичности образцы магниевых сплавов распределяются следующим образом: - слабая цитотоксичность - № 2-SVIK1; - умеренная цитотоксичность - №3-S-VIK-P1; №5 -S-VIK3; - 31 выраженная цитотоксичность - №1- S6; №4- JRS1; - очень выраженная цитотоксичность - №6- S-VIK-P2. Все результаты статистически значимы по сравнению с контролем.

Таблица 6 – результаты МТТ-теста

Показатели	Контроль, Клетки без образцов	Образец S6+ клетки	Образец S-VIK1+ клетки	Образец S-VIK1-P1+ клетки	Образец JRS1+ клетки	Образец S-VIK3+ клетки	Образец S-VIK1-P2+ клетки
Среднее M	0,355	0,133	0,229	0,196	0,095	0,167	0,032
Ошибка средней m гибели, %	0,013	0,021	0,063	0,020	0,025	0,022	0,010
Количество повторов n	6	6	6	6	6	6	6
P		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

3.4 Определение пролиферативной активности

3.4.1 Контрольная культура

При микроскопическом исследовании контрольной культуры нами было замечено, что дермальные фибробласты имели вытянутую или, при большом значении плотности монослоя, веретеновидную форму, цитоплазма равномерная. Клетки имели четко очерченные границы-стенки, эксцентрично расположенные ядра овальной формы.

По истечению 2 часов после посева клеток в культуральную среду мы наблюдали явление адгезии части исходных клеток к пластиковой поверхности посуды и растекания по ней. Спустя 24 часа фибробласты сформировали равномерный монослой на дне культуральных лунок. Пока происходило культивирование клеток, их количество увеличилось, а расстояние между ними уменьшалось. Из-за постепенного приближения клеток друг к другу монослой начал приобретать рисунок в виде «завитков». После 5 суток образовался 80-ти процентный конфлюэнтный монослой, а через неделю клетки перешли в стационарную фазу (рисунок 11).

Видно, что у исследуемой культуры не было способности к образованию клонов. Окрашенная суданом IV и гематоксилином цитолемма фибробластов в культуре ровная, гомогенная цитоплазма имеет слабое сродство с кислотами. У ядер правильная овальная форма, оболочка гладкая, а хроматин расположен внутри ядра мелкой зернистостью. Также стоит отметить, что в фибробластах отсутствовал нейтральный жир. В таблице 7 приведены данные пролиферативной активности культуры с течением времени.

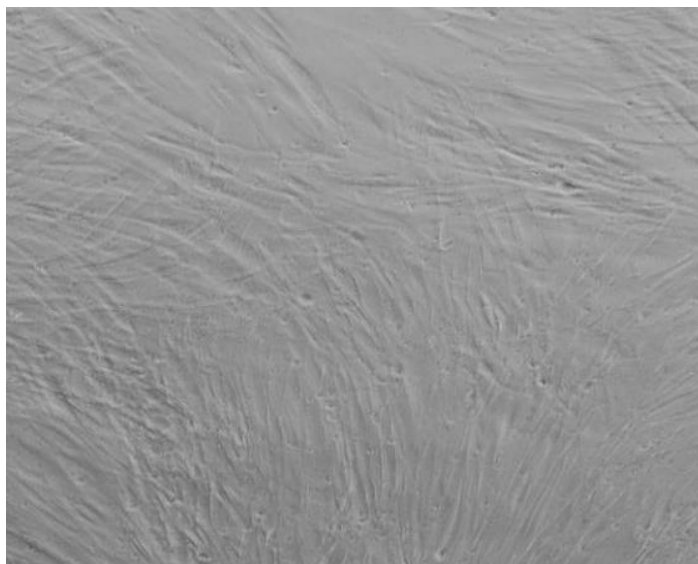


Рисунок 11 – Снимок нативной культуры дермальных фибробластов на инвертированный микроскоп при фазовом контрасте после 7 суток с начала посадки



Рисунок 12 – Снимок культуры дермальных фибробластов, окрашенный суданом IV и гематоксилином при увеличении 100

Таблица 7 - Пролиферативная активность контрольной культуры дермальных фибробластов

Срок эксперимента, сутки	Плотность монослоя, кл/мм ²	Индекс пролиферации, Отн.ед.	Время удвоения, ч	Количество удвоений, Отн.ед.
Исходные данные	89±5			
1	177±3	1,9±1	25±0,5	
2	367 ±12	2,1 ±0,1	28 ±0,5	
3	663±26	1,8±0,2	29±0,5	
4	1077±16	1,6±0,3	37,2±1	
5	1590±5	1,5±0,4	44±2	
6	2018±16	1,3±0,4	74±2	
7	2401±34	1,2±0,1	98±3	6,1±0,5

Из данных таблицы видно, что по мере продвижения эксперимента плотность монослоя и время удвоения увеличивали свои значения, а индекс

пролиферации, в основном, уменьшался, с единичным увеличением на вторые сутки исследования.

3.4.2 Исследование пролиферативной активности материалов в течении недели эксперимента

На рисунках и таблице ниже представлены результаты влияния 6 экспериментальных материалов на дермальную культуру фибробластов. Мы давали оценку результатов микроскопических в динамике на 1, 3 и 7 день исследований и рассчитывали показатели индекса пролиферации и времени удвоения.

Первый день проведения эксперимента

При осмотре поверхности образца и культуры фибробластов на 1 день после начала эксперимента для всех образцов были замечены некоторые общие процессы:

- наблюдаемая неоднородность структуры поверхности образца, о чем свидетельствует наличие видимых светлых и темных участков (рисунок 13);
- изменение формы клеток монослоя.

У образца 2 (S11-VIK1) монослой на первые сутки сохранился, в то время как у остальных либо появлялась тенденция к разрежению и неоднородности (образец 1 (S6), образец 3 (S11-VIKP1), образец 4 (J-RS1), образец 5 (S3-VIK3)), либо наблюдалось крайне значительное разрежение монослоя (образец 6 (S12-VIKP2)) (рисунок 14).

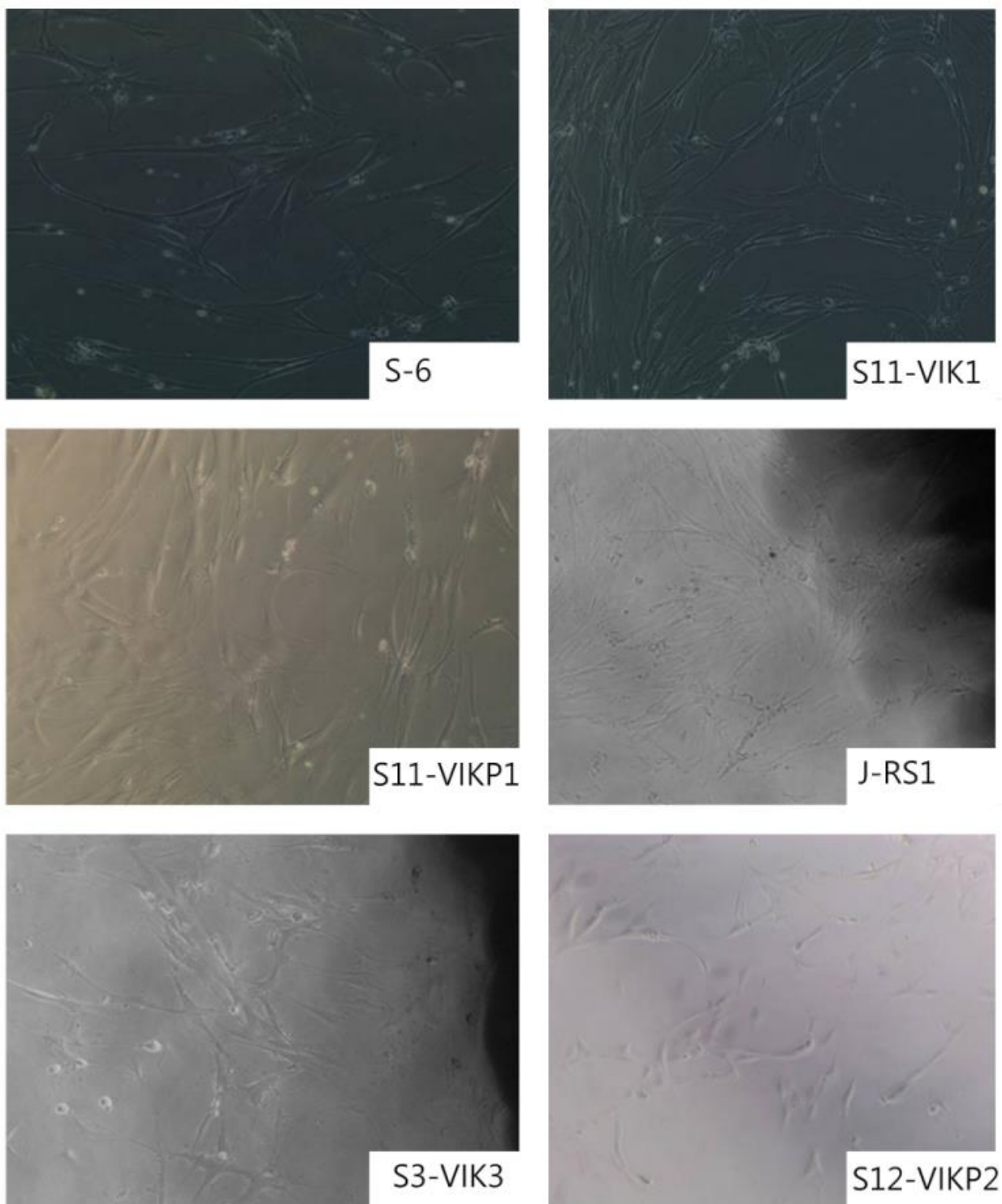


Рисунок 13 – снимки культур на 24 часа после внесения образца №1 на монослой фибробластов. Нативная культура дермальных фибробластов. Инвертированный микроскоп. Фазовый контраст. Увеличение 100

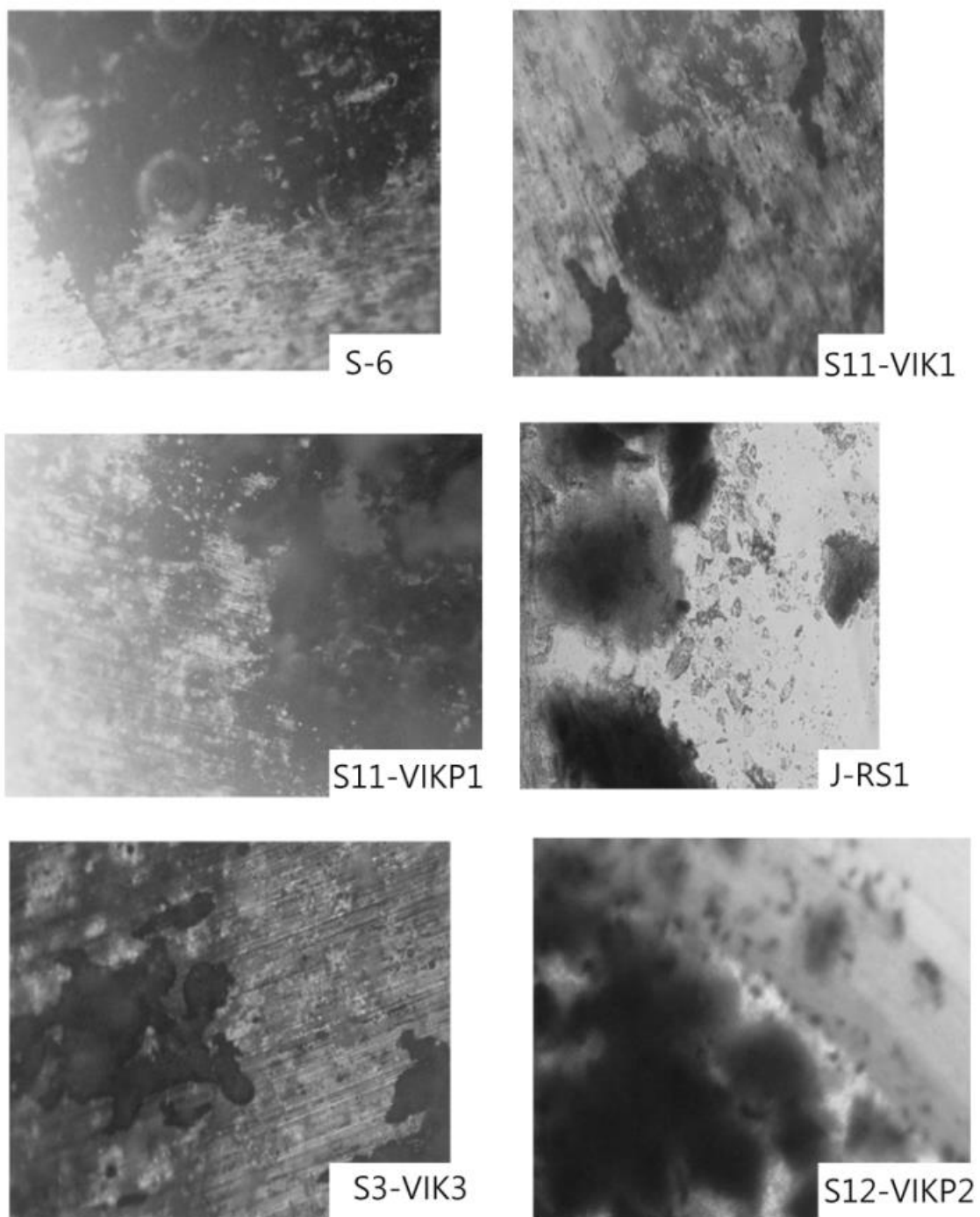


Рисунок 14 – Поверхность образцов на 1 сутки эксперимента в инвертированный микроскоп, увеличение 100

Третий день проведения эксперимента

На третьи сутки эксперимента у всех образцов наблюдается дальнейшее разрежение монослоя. У образца 2 подобный процесс только

начался, в его случае и случаях образцов 1 и 3 при этом наблюдается сохранение монослоя. У образцов 4 и 5 оно заметно в большей степени. В образцах 3, 4, 5 и 6 на третьи сутки эксперимента был обнаружен нейтральный жир, монослой образца 6 был полностью разряжен. Расстояние между клетками в монослое постепенно становится больше, у некоторых образцов заметно разрыхление цитоплазмы и утончение соединительных отростков (рисунок 15).

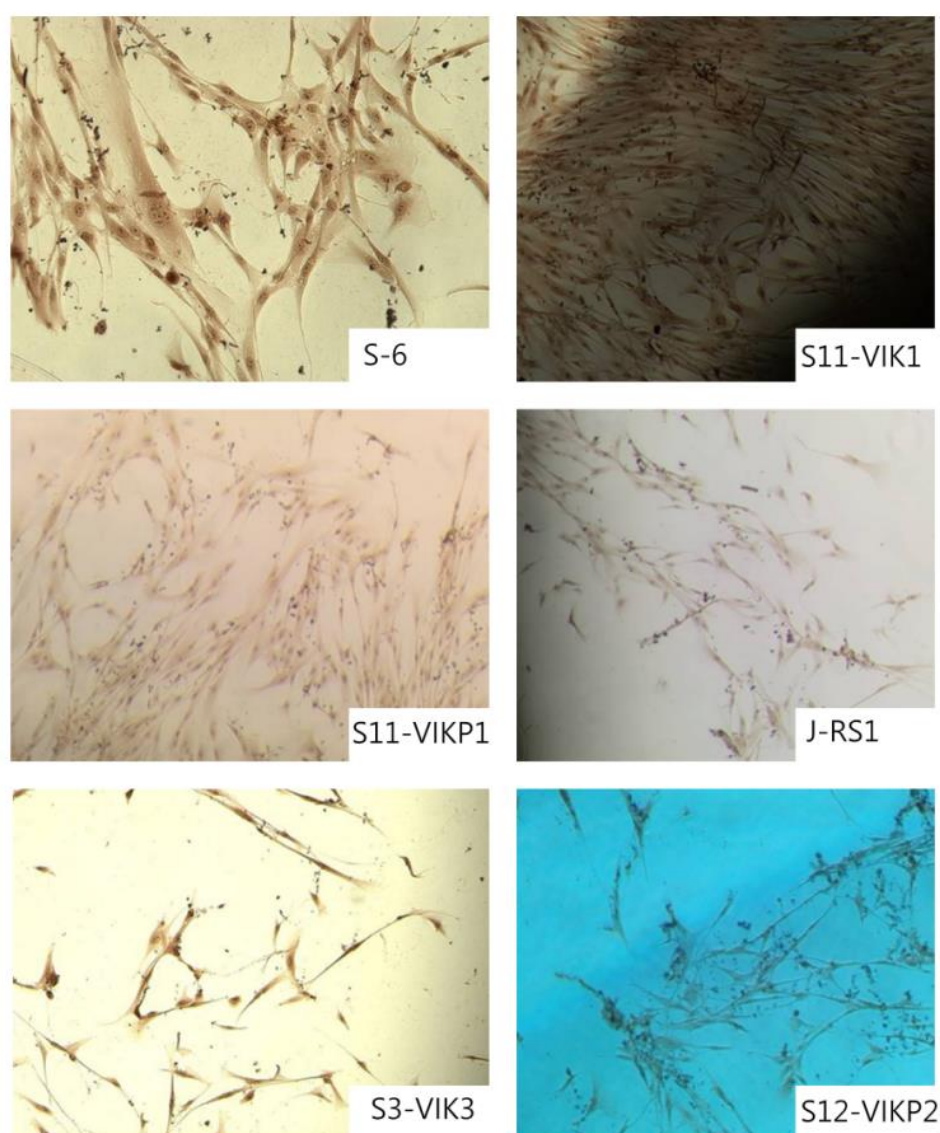


Рисунок 15 – Нативные культуры дермальных фибробластов. Инвертированный микроскоп. Фазовый контраст; б- Окраска Суданом IV и гематоксилином. Увеличение 100

В таблице 8 наглядно представлены данные по плотности монослоя, индекса пролиферации и времени удвоения для всех 6 образцов, что позволяет сделать сравнение с контрольной группой и сделать некоторые выводы о влиянии на жизнеспособность клеток при влиянии каждого из материалов.

Таблица 8 – сравнение показателей пролиферации для образцов в сравнении с контрольной культурой

Образец	Плотность монослоя	Индекс пролиферации	Время удвоения
Контрольная группа	663±26	1,8±0,2	29±0,6
Образец 1: S6	50±15*	0,8±0,2*	-
Образец 2: S11-VIK1	434±15	1,6±0,5	37±1,3
Образец 3: S11-VIKP1	434±18	1,7±0,4	30±1,4
Образец 4: J-RS1	52±6*	-	-
Образец 5: S3-VIK3	78±6*	0,7±0,6	-
Образец 6: S12-VIKP2	-	-	-

Наиболее близкими к исходным являются значения образца 2 и образца 3, что говорит о том, что на 3 день данные материалы не показали высокого токсичного влияния на культуры клеток и не препятствуют в значительной мере разрастанию ткани и размножению клеток.

Седьмой день проведения эксперимента

Во всех образцах кроме 2 в наличии нейтральный жир и наблюдаются слущенные клетки. При окрашивании трипановым синим живые клетки имеют синий цвет, погибшие клетки прозрачные. Отростки во всех случаях

истончены, монослой все сильнее разряжается. Границы клеток становятся менее очерченные, цитоплазма вакуолизированная (рисунок 16, рисунок 17).

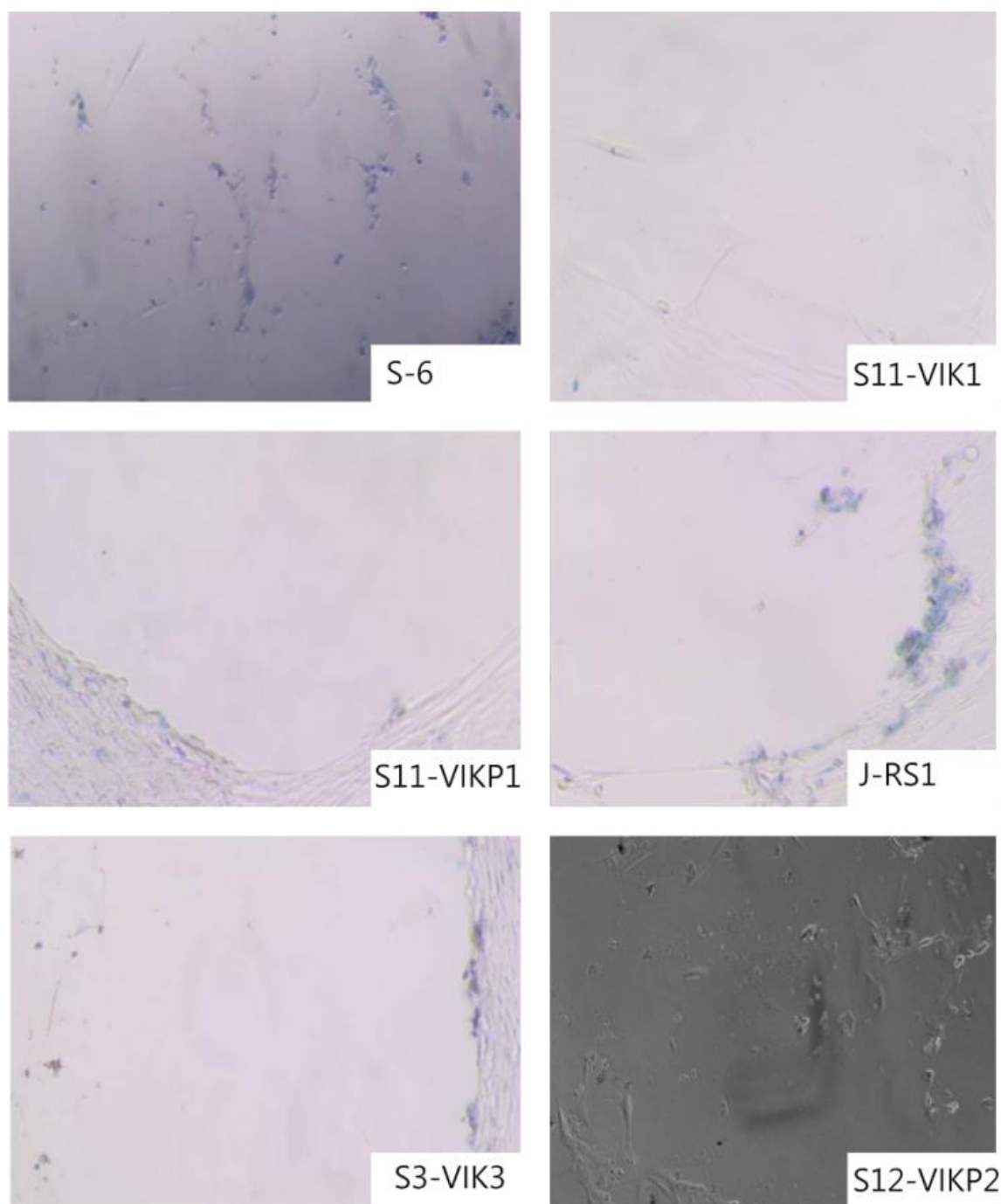


Рисунок 16 – Снимки культуры фибробластов под образцами. 7 сутки эксперимента. Окраска трипановым синим. Увеличение 100

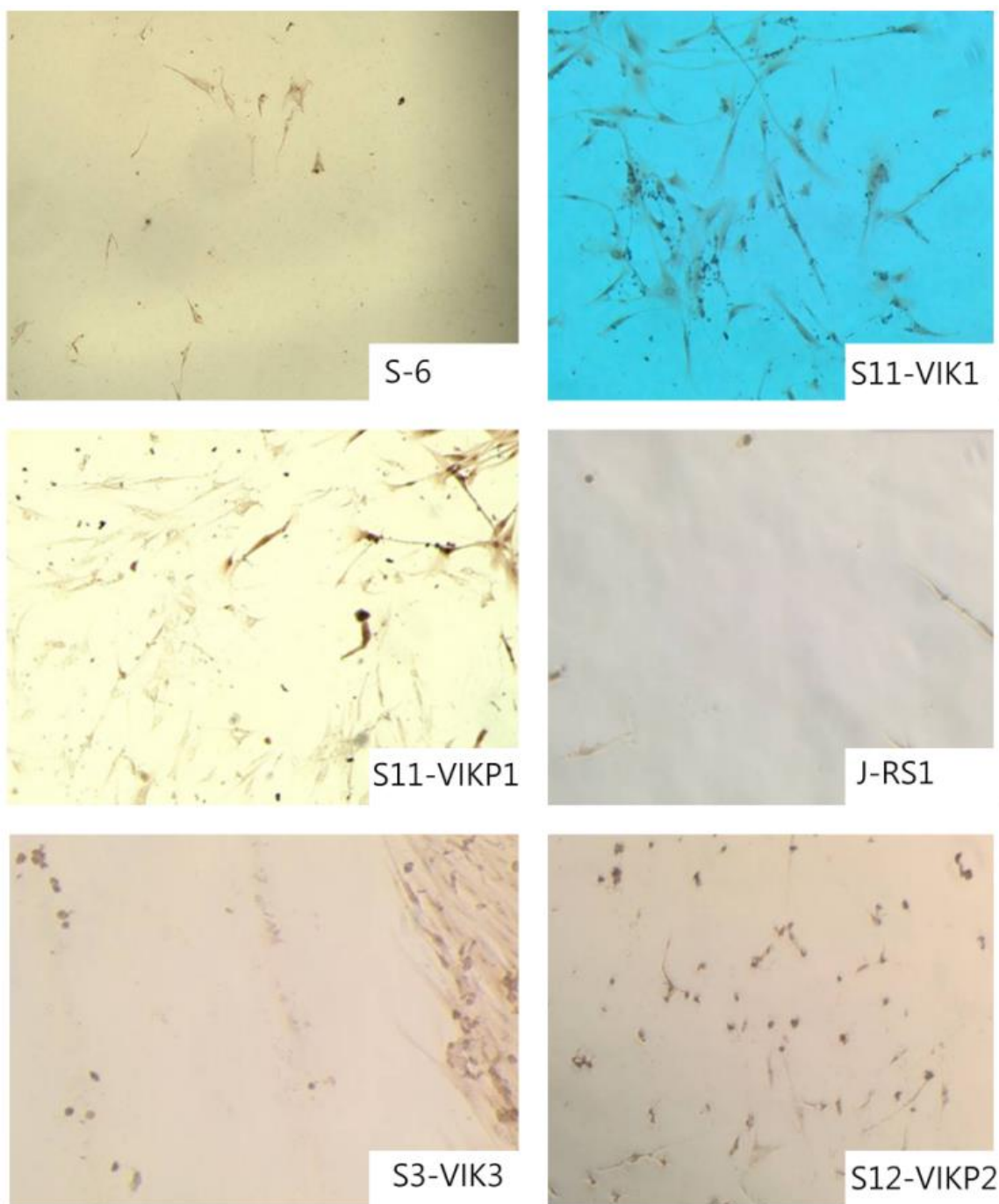


Рисунок 17 – Снимки культуры фибробластов под образцами. Культура фибробластов под образцами. Окраска суданом IV и гематоксилином .

Увеличение 100.

Заключение

Тестирование биорезорбируемых магниевых сплавов на культурах клеток фибробластов человека показало, что все экспериментальные образцы вызывают гибель клеток, при этом образцы S6 (№1), J-RS1 (№4) и S12-VIKP2 (№6) обладают наиболее высокими показателями цитотоксичности, о чем говорят полученные результаты о количестве погибших клеток культуры – более 50% от общего числа, что является недопустимым в сочетании с остановкой процесса раздвоения клеток культуры по истечению 3 суток эксперимента.

Наименьшую цитотоксичность показали образцы сплавов системы Mg-1Zn-0.16Ca: S11-VIK1P (№3) и S11-VIK1 (№2), также неплохо себя показал сплав Mg-1Zn-2,9Y: S3-VIK3 (№5). Сплавы №2 и №3 были подвергнуты обработке всесторонней изотермической ковкой.

Сплавы №№ 2 и 3 системы Mg-Zn-Ca относятся к малолегированным сплавам, их комплексная обработка в несколько этапов, включающая гомогенизацию и ВИК, общие для образцов №2 и №3, и последующую прокатку для сплава S11-VIK1P, обеспечивают им высокие показатели изотропии механических свойств, достаточные для применения показатели прочности и пластичности для обеспечения безопасной эксплуатации импланта и возможности деформировать его индивидуально для каждого пациента. Кальций и цинк, как известно, являются химическими элементами, выполняющими определенные биологические функции внутри организма человека, потому они и не несут в себе сильного токсичного воздействия. Использование данных элементов в качестве легирующих позволяет избежать развития некоторых патологических процессов при эксплуатации. Сплавы системы Mg-Zn-Y могут применяться, когда необходимо избежать кальция в составе сплава, так как данный металл подвержен вымыванию из организма.

Причиной гибели культуры в ходе проведения эксперимента, вероятнее всего, является процесс защелачивания среды при помещении образцов в культурную среду из-за происходящих химических реакций между различными химическими соединениями. Это обусловлено природой магния, который является щелочноземельным металлом, и потому достаточно легко вступает в реакции с некоторыми неорганическими солями, аминокислотами, водой и другими веществами внутри организма с последующим образованием щелочи $Mg(OH)_2$. При реакции с водой помимо гидроксида магния также образуется газ H_2 .

Видимые в микроскопе оптически плотные частицы, отделившиеся от поверхности образцов, представляют собой гидроксид магния, который, тем не менее, не является токсичным для клеток в связи со своей нерастворимостью. Также стоит отметить, что при реакции вокруг образцов наблюдается наличие пузырькового газа водорода, что может неблагоприятно сказаться на проведении дальнейших экспериментов на животных, в результате чего могут потребоваться дополнительные действия по отводу газа из-за возникновения внутри организма газового кармана, препятствующего правильному процессу заживления тканей.

Список используемой литературы

1. A. Krause, N. Von der Höh, D. Bormann, C. Krause, F.W. Bach, H. Windhagen, A. Meyer-Lindenberg, J. Mater., «Degradation behaviour and mechanical properties of magnesium implants in rabbit tibiae» // *Sci.* 45, 2010, P. 624–632.
2. Alvarez-Lopez M, Pereda M.D., del Valle J.A., Fernandez, Lorenzo M., Garcia-Alonso M.C., Ruano O.A., Escudero M.L., «Corrosion behaviour of AZ31 magnesium alloy with different grain sizes in simulated biological fluids» // *Acta Biomater* 6, 2010, 1763-1771.
3. Atrens A, Liu M, Abidin N, «Corrosion mechanism applicable to biodegradable magnesium implants» // *Mater Sci Eng B*176(20), 2011, 1609–1636.
4. B. Kanter, A. Vikman, T. Brückner, M. Schamel, U. Gbureck, A. Ignatius, «Bone regeneration capacity of magnesium phosphate cements in a large animal model» // *Acta Biomater.* 69, 2018, P. 352–361.
5. B. Schaller, J.P.M. Burkhard, M. Chagnon, S. Beck, T. Imwinkelried, M. Assad, «Fracture Healing and Bone Remodeling With Human Standard-Sized Magnesium Versus Polylactide–Co-Glycolide Plate and Screw Systems Using a Mini-Swine Craniomaxillofacial Osteotomy Fixation Model» // *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Vol. 76, I. 10, 2018, P.2138-2150.
6. B. Ullmann, J. Reifenrath, J.M. Seitz, D. Bormann, A. Meyer-Lindenberg, «Influence of the grain size on the in vivo degradation behaviour of the magnesium alloy LAE442» // *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine.* 227, 2013, P. 317–326.
7. Chen, Xiaobo; Nouri, Alireza; Li, Yuncang; Lin, Jiangoa; Hodgson, Peter D.; Wen, Cuie, "Effect of Surface Roughness of Ti, Zr and TiZr on Apatite Precipitation from Simulated Body Fluid" // *Biotechnology and Bioengineering.* 101 (2), 2008, P. 378–387.
8. D. Dziuba, A. Meyer-Lindenberg, J.M. Seitz, H. Waizy, N. Angrisani, J. Reifenrath, «Long-term in vivo degradation behaviour and

biocompatibility of the magnesium alloy ZEK100 for use as a biodegradable bone implant» // *Acta Biomater.* 9, 2013, P. 8548–8560.

9. Di Certo M.G., Batassa E.M., Casella I., Serafino A., Floridi A., Passananti C., Molinari P., Prithivirajan S., Narendranath S, Vijay D., « Recent progress in in vivo studies and clinical applications of magnesium based biodegradable implants – A review» // *Journal of Magnesium and Alloys*, v.9, 2021, P. 1147-1163.

10. Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) - <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/24010043> - электронный ресурс.

11. F. Amerstorfer, S.F. Fischerauer, L. Fischer, J. Eichler, J. Draxler, A. Zitek, S.E. Stanzl-Tschegg, «Long-term in vivo degradation behavior and near-implant distribution of resorbed elements for magnesium alloys WZ21 and ZX50» // *Acta Biomater.* 42, 2016, P.440–450.

12. Frank Witte 1, Jens Fischer, Jens Nellesen, Horst-Artur Crostack, Volker Kaese, Alexander Pisch, Felix Beckmann, Henning Windhagen, «In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys» // *Biomaterials*, 2006, 1013-8.

13. Frank Witte, Jens Fischera, Jens Nellesen, Horst-Artur Crostack, Volker Kaese, Alexander Pisch, Felix Beckmanne, Henning Windhagen, «In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys» // *Biomaterials*, Vol. 27, I. 7, 2006, P. 1013-1018.

14. Fuyong Cao, Zhiming Shia, Joelle Hofstetter, Peter J. Uggowitzer, Guangling Song, Ming Liu, Andrej Atrensa, «Corrosion of ultra-high-purity Mg in 3.5% NaCl solution saturated with Mg(OH)₂» // *Corrosion Science*, Volume 75, 2013, P. 78-99.

15. Guohua Wu, Yu Fan, Hongtao Gao, Chunquan Zhai, Yan Ping Zhu, «The effect of Ca and rare earth elements on the microstructure, mechanical properties and corrosion behavior of AZ91D» // *Materials Science and Engineering: A*, Vol. 408, I. 1–2, 2005, P. 255-263.

16. Hanks J.H., Wallace R.E., «Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine» // New York, N.Y.: Society for Experimental Biology and Medicine. 71, 1949, P.196–200.
17. HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) Preparation and Recipe | AAT Bioquest, <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/hbss-hanks-balanced-salt-solution> - электронный ресурс.
18. I. Marco, A. Myrissa, E. Martinelli, F. Feyerabend, R. Willumeit-Römer, A.M. Weinberg, «IN VIVO AND IN VITRO DEGRADATION COMPARISON OF PURE MG, MG-10GD AND MG-2AG: A SHORT TERM STUDY» // European Cells and Materials Vol. 33, 2017, p. 90-104.
19. I.J.Polmear, «Light Alloys: From traditional alloys to nanocrystals» // Oxford: Butterworth-Heinemann, Elsevier, 2006, 237.
20. J. Hofstetter, M. Becker, E. Martinelli, A.M. Weinberg, B. Mingler, H. Kilian, J.F. Löffler, «High-Strength Low-Alloy (HSLA) Mg–Zn–Ca Alloys with Excellent Biodegradation Performance» // JOM 66 (2014) P. 566–572.
21. Joy E Gray-Munro 1, Christine Seguin, Michael Strong, «Influence of surface modification on the in vitro corrosion rate of magnesium alloy AZ31», 2009.
22. Kristina Rehberger, Christian Kropf, Helmut Segner, «In vitro or not in vitro: a short journey through a long history», 2018. – 1c.
23. L. Xu, G. Yu, E. Zhang, F. Pan, K. Yang, «In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation» // J. Biomed. Mater. Res. A 83, 2007, P. 703–711.
24. Liu L.J., Schlesinger M. Corrosion of magnesium and its alloys. Corros. Sci. 2009;51:1733–1737.
25. M. Bobby, Kannan R.K., Singh Raman, «In vitro degradation and mechanical integrity of calcium-containing magnesium alloys in modified-simulated body fluid» // Biomaterials, Volume 29, Issue 15, 2008, P. 2306-2314.

26. M. Thomann, C. Krause, D. Bormann, N. Von der Höh, H. Windhagen, A. Meyer-Lindenberg, «Comparison of the resorbable magnesium alloys LAE442 und MgCa0.8 concerning their mechanical properties, their progress of degradation and the bone-implant-contact after 12 months implantation duration in a rabbit model» // *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* Volume 40, 2009, Issue 1-2 p. 82-87.
27. Mark Peter Staiger, Alexis Mari Pietak, Jerawala Huadmai, George J Dias, «Magnesium and its Alloys as Orthopedic Biomaterials» // *Biomaterials* 27, 2006, p. 1729.
28. MEM - Minimum Essential Media, <https://www.bioind.com/worldwide/products/cell-culture/classical-media/mem-minimum-essential-media/> - электронный ресурс.
29. N.T. Kirkland, J. Lespagnol, N. Birbilis, M.P. Staiger, «A survey of biocorrosion rates of magnesium alloys» // *Corrosion Science*. 52(2). 2010. 287-291.
30. Nezha Ahmad Agha, Frank Feyerabend, Borianna Mihailova, Stefanie Heidrich, Ulrich Bismayer, Regine Willumeit-Römer, «Magnesium degradation influenced by buffering salts in concentrations typical of in vitro and in vivo models» // *Materials Science and Engineering: C*, Volume 58, 2016, P. 817-825.
31. Olga Charyeva, Frank Feyerabend, Regine Willumeit, Gabor Szakacs, Nezha Ahmad Agha, Norbert Hort, Felix Gensch, Francesca Cecchinato, Ryo Jimbo, Ann Wennerberg, Katrin Susanne Lips, In vitro resorption of magnesium materials and its effect on surface and surrounding environment, *MOJ Toxicol*. 2015,1(1), P. 23–28.
32. Oyane, Ayako; Onuma, Kazuo; Ito, Atsuo; Kim, Hyun-Min; Kokubo, Tadashi; Nakamura, Takashi, "Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids", *J Biomed Mater Res A* 2003; 64(2): P. 339-48.
33. P. Holweg, L. Berger, M. Cihova, N. Donohue, B. Clement, U. Schwarze, A. Leithner, «A lean magnesium–zinc–calcium alloy ZX00 used for

bone fracture stabilization in a large growing-animal model» // *Acta Biomater.*, 2020, Volume 113, 1 September, Pages P. 646-659.

34. Payr E., «Beitrge zur technik der blutgefass-und nervennaht nebst mittheilungenber die verwendung eines resorbirbaren metalles in der chirurgie» // *Arch. Klin. Chir.*, Vol. 62., 1900, P. 67–93.

35. Prithivirajan Sekar, Narendranath S, Vijay Desai, «Recent progress in in vivo studies and clinical applications of magnesium based biodegradable implants – A review» // *Journal of Magnesium and Alloys* 9, 2021, P. 1147–1163.

36. Q.M. Peng, Y.D. Huang, L. Zhou, N. Hort, K.U. Kainer, «Preparation and properties of high purity Mg-Y biomaterials» // *Biomaterials.* 31(3). 2010. p. 398-403.

37. R. Hou, J. Victoria-Hernandez, P. Jiang, R. Willumeit-Römer, B. Luthringer-Feyerabend, S. Yi, F. Feyerabend, In vitro evaluation of the ZX11 magnesium alloy as potential bone plate: Degradability and mechanical integrity // *Acta Biomater.*, Volume 97, 2019, P. 608-622.

38. S. Huang, B. Wang, X. Zhang, F. Lu, Z. Wang, S. Tian, Z. Gao, Y. Lic, K.Qin, D. Zhaoa, «High-purity weight-bearing magnesium screw: Translational application in the healing of femoral neck fracture» // *Biomaterials* 238, 2020, 119829.

39. Shah S.J., Blumen S., Pitha-Rowe I., Kitareewan S., Freemantle S.J., Feng Q., Dmitrovsky E. // *Molecular Cancer Therapeutics.* 2008. Vol. 7. N 4. P. 905–914.

40. Shaylin Shadanbaz, Jemimah Walker, Tim B. F. Woodfield, Mark P. Staiger & George J. Dias, «Monetite and brushite coated magnesium: in vivo and in vitro models for degradation analysis» // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 25, 2014, p. 173–183.

41. Sumner D. R., «Determinants of stress shielding: design versus material» // *Clin. Orthop. Relat. Res.*, Vol. 274., 1992, P. 202–212.

42. T. Imwinkelried, S. Beck, T. Iizuka, B. Schaller, «Effect of a plasmaelectrolytic coating on the strength retention of in vivo and in vitro degraded magnesium implants» // *Acta Biomater.* 9, 2013, P. 8643–8649.
43. T. Kraus, S.F. Fischerauer, A.C. Hänzli, P.J. Uggowitzner, J.F. Löffler, A.M. Weinberg, «Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: In vivo studies of their degradation and interaction with bone» // *Acta Biomater.* 8, 2012, P. 1230–1238.
44. T.Imwinkelrieda, S.Becka, T.Iizukab, B.Schallerb, «Effect of a plasmaelectrolytic coating on the strength retention of in vivo and in vitro degraded magnesium implants» // *Acta Biomaterialia*, Vo. 9, Issue 10, November 2013, P. 8643-8649.
45. Tadashi Kokubo, Hiroaki Takadama, «How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? » // *Biomaterials* Volume 27, Issue 15, 2006, P. 2907-2915.
46. W.C. Kim, J.G. Kim, J.Y. Lee, H.K. Seok, «Influence of Ca on the corrosion properties of magnesium for biomaterials» // *Materials Letters.* 62(25), 2008, p. 4146-4148.
47. W.D. Mueller, M.L. Nascimento, M.F.L. de Mele, «Critical discussion of the results from different corrosion studies of Mg and Mg alloys for biomaterials applications» // *Acta Biomaterialia.* 6(5). 2010. p. 1749-1755.
48. Walker J., Shadanbaz S., Kirkland N.T., Stace E., Woodfield T., Staiger M.P, Dias G.J., «Magnesium alloys: Predicting in vivo corrosion with in vitro immersion testing» // *J Biomed Mater Res Part B* 2012, 100B: P. 1142–1150.
49. Wei Sun, Guangdao Zhang, Lili Tan, Ke Yang, Hongjun Ai, «The fluoride coated AZ31B magnesium alloy improves corrosion resistance and stimulates bone formation in rabbit model» // *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 63, 2016, P. 506-511.
50. Witte F., «The history of biodegradable magnesium implants» // *A review Acta Biomaterialia.*, Vol. 6., 2010., P. 1680–1692.

51. Y.C. Xin , C.L. Liu, X.M. Zhang, G.Y. Tang. X.B. Tian, P.K.Chu, «Corrosion behavior of biomedical AZ91 magnesium alloy in simulated body fluids» // Journal of Materials Research 22(7), 2007, pp. 2004-2011.
52. Y.Z. Wan, G.Y. Xiong, H.L. Luo, F. He, Y. Huang, X.S. Zhou. Preparation and characterization of a new biomedical magnesium-calcium alloy. // Materials & Design. 29 (10). 2008. pp. 2034-2037.
53. Yao T., Asayama Y., «Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues» // Reproductive Medicine and Biology. 16 (2), 2017, P. 99–117.
54. Yeohung Yun, Yongseok Jang, Juan Wang, Zhongyun Dong, Vesselin Shanov, Jagannathan Sankar, Youngmi Koo, Leon White, Boyce Collins, «Biodegradable Magnesium Implant: In Vivo and In Vitro Convergence» // ASME 2014 International Mechanical Engineering Congress and Exposition: 11/2014.
55. Аналитическое и лабораторное оборудование [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.akvilon.ru/products/laboratornoe-oborudovanie/laminarnye-boksy/boksy-biolog-bezopasnosti-lamsystems/boksy-biolog-bezopasnosti-ii-tip-a2/7202/> - (Дата обращения: 25.05.2022).
56. ГОСТ ISO 10993-5-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы in vitro.
57. Гринберг, К.Н. Культивирование фибробластов человека для диагностики наследственных болезней / К.Н. Гринберг, В.И.Кухаренко, В.Н.Ляшко, С.М.Терехов, Е.М.Пичугина, М.И.Фрейдin, В.Г.Черникова // Методы культивирования клеток: Сборник научных трудов., Л.: Наука, 1988, С. 250-257.
58. Гурциева Д.А., Неёлова О.В., «Биологическая роль магния и применение его соединений в медицине»// «Успехи современного естествознания», №.8, 2014 г., с. 165-166.
59. Единство технологий разнообразие решений [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.tda->

vostok.ru/catalog/tecan/microplanshetnie-rideri/infinite-200-pro/ - (Дата обращения: 25.05.2022).

60. Измерительные приборы [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://pribori24.ru/prod/centrifuga-mnogofunkcionalnaya-eppendorf-5702r/> - (Дата обращения: 25.05.2022).

61. Лабораторная фильтрация [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://laverna-xxi.ru/catalog/274/26601/> - (Дата обращения: 25.05.2022).

62. Лабораторное оборудование и приборы [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.optimum-lab.ru/product/so2-inkubator-mco-18ac-sanyo-panasonic/> - (Дата обращения: 25.05.2022).

63. М. Л. Головаха, В. Н. Черный, Е. В. Яцун, С. И. Тертышный, К. Л. Дикий, «Регенерация костной ткани при остеосинтезе имплантатами из сплавов на основе магния в эксперименте» // Ортопедия, травматология и протезирование, №.1, г.2014, с. 105.

64. Музыченко П.Ф., «Проблемы биоматериаловедения в травматологии и ортопедии» // Травма., 2012, № 1, С. 94–98.

65. Центра лабораторного оборудования [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://www.nv-lab.ru/catalog_info.php?ID=83 - (Дата обращения: 25.05.2022).