

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-2-76-84>

# Влияние мультиосевой деформации на динамику биодеградации сплава WE43 и колонизацию клетками

Н.С. Мартыненко<sup>1</sup>, Н.Ю. Анисимова<sup>2</sup>, К.М. Новрузов<sup>2</sup>, С.В. Добаткин<sup>1</sup>,  
М.В. Киселевский<sup>2</sup>, Ю.З. Эстрин<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН; Россия, 119334 Москва, Ленинский пр-т, 49;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>3</sup>Университет им. Монаша, Департамент материаловедения и инжиниринга; Австралия, 3800 Викториа, Клейтон, Веллингтон-Роуд;

<sup>4</sup>Университет Западной Австралии, Департамент машиностроения; Австралия, 6009 Западная Австралия, Перт, Стерлинг шоссе, 35

**Контакты:** Наталья Сергеевна Мартыненко [nataliasmartynenko@gmail.com](mailto:nataliasmartynenko@gmail.com)

**Введение.** Разработка материалов для создания биорезорбируемых имплантатов – актуальный вопрос медицины и материаловедения. Перспективными материалами для данной цели являются магниевые сплавы, в частности сплав WE43 (Mg-Y-Nd-Zr), хорошо зарекомендовавший себя в этой области. Однако применение магниевых сплавов ограничено высокой скоростью деградации, которая часто сопровождается неравномерностью коррозии, что негативно сказывается на несущей способности изделия. Кроме того, повышенная скорость деградации может серьезно ухудшать биосовместимость магниевых сплавов. Поэтому изучение коррозионной стойкости магниевых сплавов, а также их биосовместимости является актуальной задачей.

**Цель исследования** – изучить влияние мультиосевой деформации (МОД), направленной на повышение механических характеристик сплава WE43, на кинетику его биодеградации, а также на колонизацию клетками.

**Материалы и методы.** В работе был исследован сплав WE43 в 2 состояниях: гомогенизированном (WE43 hom) и упрочненном методом МОД (WE43 MAD). Кинетику биодеградации исследовали на анализаторе xCELLigence RTCA Systems. Для исследования газообразования был применен метод оценки объема водорода, который определяли с помощью автоматизированного цифрового микроскопа Lionheart™ FX. Коррозионной средой выступал раствор на основе Dulbecco's Modified Eagle's Medium. Для изучения колонизации поверхности сплава клетками использовали культуру мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток.

**Результаты.** МОД сплава WE43 приводит к снижению скорости биодеградации и интенсивности газообразования. Период стабилизации биодеградации для сплава после МОД составляет 16 ч против 3 ч для сплава после гомогенизации. При этом объем выделившегося водорода составил  $65,0 \pm 4,4$  мм<sup>3</sup> H<sub>2</sub>/мм<sup>3</sup> сплава и  $211,0 \pm 21,1$  мм<sup>3</sup> H<sub>2</sub>/мм<sup>3</sup> сплава для материала после МОД и гомогенизации соответственно. МОД улучшает биосовместимость сплава WE43, стимулируя колонизацию мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками.

**Заключение.** МОД уменьшает биодеградацию и улучшает биосовместимость сплава WE43, что делает его перспективным медицинским материалом, в том числе для целей ортопедии.

**Ключевые слова:** магниевые сплавы, мультиосевая деформация, биорезорбируемые имплантаты, биодеградация, колонизация

**Для цитирования:** Мартыненко Н.С., Анисимова Н.Ю., Новрузов К.М. и др. Влияние мультиосевой деформации на динамику биодеградации сплава WE43 и колонизацию клетками. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(2):76–84. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-76-84.

## The effect of multiaxial deformation on the dynamics of biodegradation and cell colonization of alloy WE43

Natalia S. Martynenko<sup>1</sup>, Natalia Yu. Anisimova<sup>2</sup>, Keryam M. Novruzov<sup>2</sup>, Sergey V. Dobatkin<sup>1</sup>,  
Mikhail V. Kiselevskiy<sup>2</sup>, Yuri Z. Estrin<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences; 49 Leninsky Ave., Moscow 119334, Russia;

<sup>2</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>3</sup>Monash University, Department of Materials Science and Engineering; Wellington Road, Clayton, Victoria 3800, Australia;

<sup>4</sup>University of Western Australia, Department of Mechanical Engineering; 35 Stirling Highway, Perth, Western Australia 6009, Australia

**Contacts:** Natalia Sergeevna Martynenko [nataliasmartynenko@gmail.com](mailto:nataliasmartynenko@gmail.com)

**Introduction.** The development of materials for bioresorbable implants is an urgent issue in medicine and materials science. Magnesium alloys are promising materials for this purpose. In particular, alloy WE43 (Mg-Y-Nd-Zr) has proven itself well in this field. However, the use of magnesium alloys is limited by a high degradation rate, which is often accompanied with nonuniform corrosion, which negatively affects the load bearing capacity of the product. In addition, the increased degradation rate usually seriously worsens the biocompatibility of magnesium alloys. Therefore, the study of the corrosion resistance of magnesium alloys, as well as their biocompatibility, is an urgent task.

**Purpose of the study** was to investigate the effect of multiaxial deformation (MAD), aimed at increasing the mechanical characteristics of the alloy WE43, on its biodegradation kinetics, as well as on cell colonization.

**Materials and methods.** The alloy WE43 in two states – homogenized (WE43 hom) and strengthened by MAD (WE43 MAD) was investigated in this work. The kinetics of biodegradation was investigated on an xCELLigence RTCA Systems analyzer. A method for estimating the volume of hydrogen was used to study the process of gas formation, which was recorded using an automated digital microscope Lionheart™ FX. The corrosive medium was a solution based on Dulbecco's Modified Eagle's Medium. A culture of mesenchymal multipotent stromal cells was used to study the colonization of the alloy surface by cells.

**Results.** MAD of the alloy WE43 leads to a decrease in the biodegradation rate and the intensity of gas formation. The period of stabilization of biodegradation for the alloy after the MAD is 16 hours versus 3 hours for the alloy after homogenization. In this case, the volume of released hydrogen was  $65.0 \pm 4.4 \text{ mm}^3 \text{ H}_2 / \text{mm}^3 \text{ alloy}$  and  $211.0 \pm 21.1 \text{ mm}^3 \text{ H}_2 / \text{mm}^3 \text{ alloy}$  for the alloy after MAD and homogenization, respectively. MAD improves the biocompatibility of the alloy WE43, stimulating the colonization of mesenchymal multipotent stromal cells.

**Conclusion.** MAD reduces biodegradation and improves the biocompatibility of the alloy WE43, which makes it a promising medical material, including for the purposes of oncoorthopedics.

**Key words:** magnesium alloys, multiaxial deformation, bioresorbable implants, biodegradation, colonization

**For citation:** Martynenko N.S., Anisimova N.Yu., Novruzov K.M. et al. The effect of multiaxial deformation on the dynamics of biodegradation and cell colonization of alloy WE43. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(2):76–84. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-76-84.

## Введение

Расширение спектра медицинских изделий для ортопедии остается одной из наиболее актуальных задач современной медицины. Особый интерес представляют разработки биодеградируемых металлоконструкций для остеосинтеза и возмещения расширенных сегментарных дефектов. Применение биодеградируемых материалов позволит снизить необходимость проведения повторных операций с целью удаления имплантата или крепежных элементов после окончания восстановительного периода. В качестве основы подобных разработок было предложено использование магниевых сплавов, таких как AZ31 [1, 2], AZ91 [3, 4] и WE43 [4–6]. WE43 уже нашел применение в клинической практике для изготовления стентов и крепежных элементов для остеосинтеза [7–11]. Подобный выбор объясняется сходством механических свойств сплавов магния и костной ткани человека [12], а также его способностью к биодеградации при контакте с биоактивными средами как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [12]. Результаты опубликованных ранее исследований свидетельствуют о том, что магниевые сплавы стимулируют адгезию

и поверхностную пролиферацию клеток различного генеза [13, 14], что должно способствовать ускоренной интеграции медицинского изделия в окружающие ткани, а в перспективе – замещению его объема собственными тканями. Однако следует учитывать риск негативного воздействия скопления водорода в перимплантационной области вследствие быстрой биодеградации магниевого сплава при контакте с тканями реконструированного органа в условиях внутренней среды организма пациента. Осложненное таким образом течение постоперационного периода может оказать отрицательное влияние на функционирование возмещаемого органа и спровоцировать каскад вторичных осложнений хирургической операции из-за нарастания внутритканевого давления и изменения pH – гемолиз, остеолитический процесс, несостоятельность остеосинтеза, расхождение кожных краев раны и появление болевого синдрома [12]. Учитывая риск развития описанных последствий, поиск методов обработки медицинских магниевых сплавов для модулирования кинетики их биодеградации является актуальной междисциплинарной задачей современной науки. Ранее нами было показано, что дополнительная

механическая обработка сплавов способна корректировать их механические свойства, а также скорость биодegradации, что в ряде случаев обуславливает изменение параметров биологической активности материала. В частности, известно, что обработка гомогенизированных магниевых сплавов методом мультиосевой деформации (МОД) [15] способна изменить их структуру за счет измельчения зерна вплоть до ультрамелкозернистого (УМЗ) состояния [16].

С учетом вышеизложенного **цель** настоящего **исследования** заключалась в оценке влияния обработки сплава методом МОД на механические свойства, кинетику биодegradации сплава, а также на колонизацию клетками его поверхности. Предполагалось, что это позволит оценить перспективы применения данного способа механической обработки сплава WE43 для разработки медицинских ортопедических изделий на его основе.

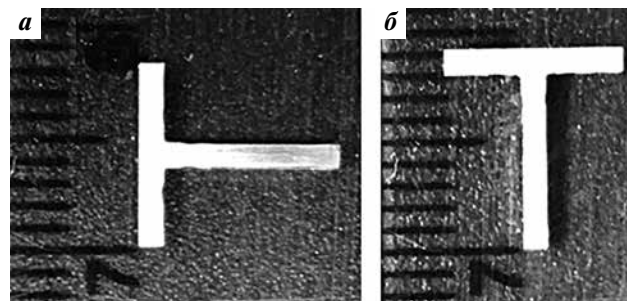
### Материалы и методы

**Образцы сплавов.** В качестве объектов исследования использовали образцы сплава WE43 (Mg-Y-Nd-Zr) без деформационной обработки, т. е. в исходном гомогенизированном состоянии (WE43 hom), и в УМЗ-состоянии после обработки методом МОД (WE43 MAD), или изотермическойковки, который предполагает многократное повторение процессов осадки, кантовки и протяжки. Детали обработки, применяемой для улучшения прочностных характеристик сплава за счет достижения УМЗ-структуры, более подробно описаны в работе N. Martynenko и соавт. [17].

Материалы были изготовлены и охарактеризованы в Национальном исследовательском технологическом университете «МИСиС». Для проведения исследований были изготовлены Т-образные образцы высотой 1 см (рис. 1) на основе WE43 (Mg-Y-Nd-Zr) в исходном гомогенизированном состоянии и после обработки МОД. Для каждого исследования использовали по 3 образца изучаемого сплава. Перед началом исследований образцы были простерилизованы погружением в 60 % этанол на 1 ч. Затем образцы высушивали в стерильных условиях.

**Исследование биодegradации.** Для исследования биодegradации применили 2 методических подхода, позволяющих оценить деструкцию образцов сплавов и газообразование, сопровождавшее этот процесс.

Для изучения кинетики деструкции использовали анализатор xCELLigence RTCA Systems (ACEA Biosciences Inc., США) и специальные 16-луночные планшеты E-plate 16 (ACEA Biosciences Inc., США). Данный подход позволяет в режиме реального времени с помощью биосенсора дна каждой лунки регистрировать изменение электрического сопротивления ( $\Delta I$ , от англ. impedance) из-за накопления продуктов



**Рис. 1.** Размеры образцов на основе WE43 (Mg-Y-Nd-Zr), подготовленных для проведения исследования: а – ширина; б – высота

**Fig. 1.** The sizes of samples based on WE43 (Mg-Y-Nd-Zr) used in this study: a – width; б – height

деструкции образца в сравнении с базовой линией сопротивления питательной среды. В соответствии с инструкцией производителя во все лунки планшета вносили по 50 мкл питательной среды на основе Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, США), дополненной 10 % сыворотки крови эмбриона теленка (HyClone, Thermo Fisher, Великобритания), 146 мг L-глутамин («ПанЭко», Россия) и 1 % пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия), и прописывали единую базовую линию сигнала. Затем в лунки добавляли по 100 мкл питательной среды, вставляли вкладыши для планшетов Cell Crown 96 (Scaffdex, Финляндия), в которых вертикально размещали исследуемые образцы сплавов таким образом, чтобы они, будучи погружены в питательную среду, не касались дна. Таким образом, примененный подход позволяет оценить степень накопления в среде инкубации продуктов деструкции сплава посредством регистрации разницы сигнала  $\Delta I$ , зафиксированного в лунке с образцом, в сравнении с лункой, заполненной только средой (контроль). Расчет производили по формуле, приведенной в инструкции производителя:

$$\Delta I = (Z_i - Z_0) / 15\zeta,$$

где  $Z_i$  – комплексное электрическое сопротивление в лунке в конкретный момент эксперимента;  $Z_0$  – комплексное электрическое сопротивление в лунке в начале эксперимента (единая базовая линия сигнала);  $\zeta$  – удельная проводимость в лунке E-plate.

Инкубацию образцов сплавов проводили в дуплетах в атмосфере 5 % углекислого газа при 37 °C в течение 36 ч. Добавление свежей порции питательной среды во все лунки производили однократно через 21 ч после начала инкубации. Для исследования газообразования, сопровождающего биодеструкцию магниевых сплавов в процессе инкубации образцов в питательной среде на основе DMEM, описанной выше, был применен метод оценки объема водорода, определенного с помощью автоматизированного

цифрового микроскопа Lionheart™ FX (BioTek Instruments, США). С этой целью образцы сплавов по 1 помещали в лунки 24-луночного планшета (Nunc, США), добавляли по 500 мкл питательной среды и инкубировали при 37 °C в атмосфере 5 % углекислого газа в течение 72 ч. Полученное в режиме реального времени изображение было обработано с помощью программного обеспечения прибора. В частности, на основании полученных данных был произведен расчет площади, а затем и объема зафиксированных пузырей (сферических полостей) газа. Аналогичным образом был произведен расчет объема образца сплава. Результат оценки динамики газообразования был представлен в виде соотношения объема газа к 1 мм³ объема сплава в конкретный момент наблюдения.

**Исследование колонизации клетками.** Для проведения исследований использовали культуру мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (ММСК). С этой целью из бедренных костей мышей линии C57Bl/6 выделяли клетки костного мозга и культивировали их в питательной среде на основе DMEM в соответствии с ранее отработанной методикой [18]. Для подготовки к эксперименту ММСК 2-го пассажа обрабатывали раствором Версена («ПанЭко», Россия), затем отмывали клетки раствором Хенкса («ПанЭко», Россия) и ресуспендировали в питательной среде. Итоговая концентрация клеток в суспензии составляла  $1,92 \times 10^6$  клеток/мл. Образцы сплавов по 1 размещали в лунках 24-луночного планшета (Nunc, США). На поверхность каждого образца наносили по 10 мкл клеточной суспензии. Образцы с клетками инкубировали в атмосфере 5 % углекислого газа при 37 °C в течение 30 мин для адгезии клеток к сплавам, а затем добавляли по 2 мл питательной среды в каждую лунку планшета. Результаты учитывали через 72 ч инкубации в описанных выше условиях с помощью автоматизированного микроскопа Lionheart™ FX (BioTek Instruments, США). С этой целью образцы извлекали из среды инкубации, отмывали в 500 мкл раствора Хенкса, а затем окрашивали с помощью LIVE/DEAD™ Cell Imaging Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) для визуализации живых (зеленая флуоресценция) и мертвых (красная флуоресценция) клеток на поверхности сплавов.

Проведение экспериментов с использованием клеточных культур было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

**Статистический анализ данных.** Результаты исследований представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения измеренных величин. Сравнительный анализ межгрупповых данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия учитывали как достоверные при  $p < 0,05$ .

## Результаты

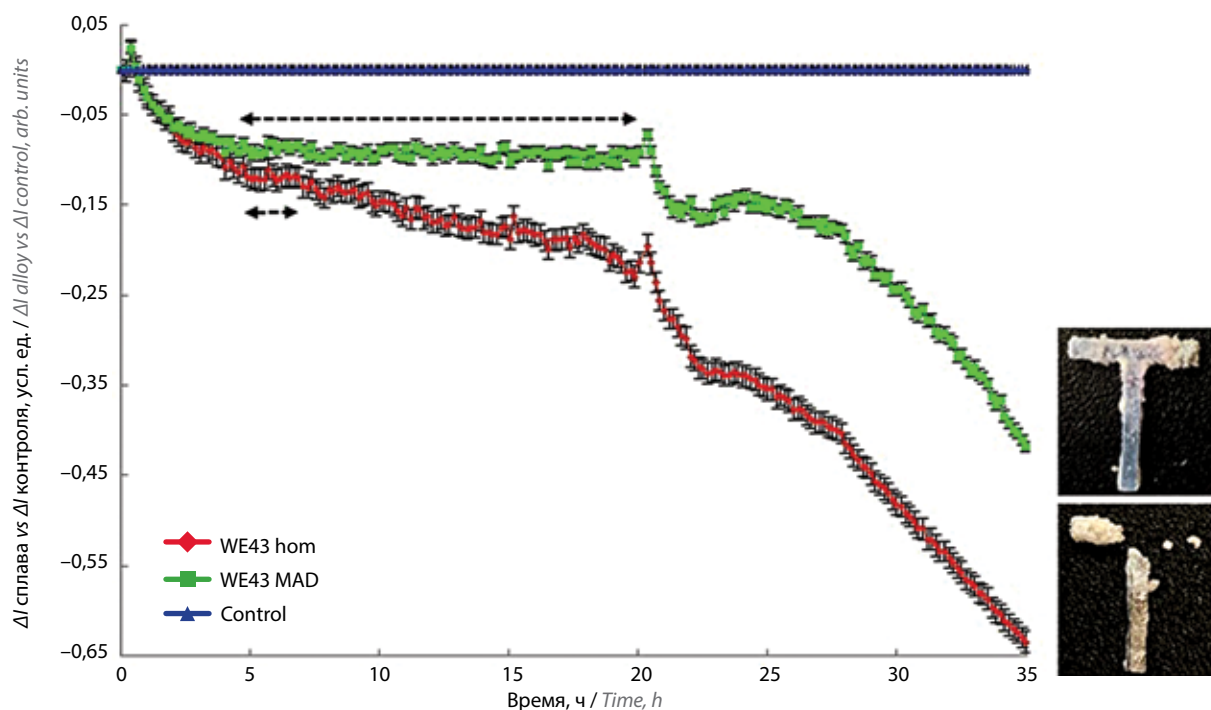
### Биодеградация

Результаты опытов по динамике биодеградации (описанных в разделе «Исследование биодеградации») представлены на рис. 2. Эта динамика отражена в величине электросопротивления образцов, представленного на графиках в произвольных единицах (arbitrary units).

Как показывают приведенные результаты, на начальном этапе инкубации оба типа сплавов демонстрируют высокую скорость нарастания деструкции. Однако примерно через 4 ч интенсивность этого процесса замедляется и наблюдается период стабилизации. Продолжительность этого периода стабилизации изучаемых сплавов различна. Было установлено, что период стабилизации образцов сплава WE43 MAD отличается значительно большей продолжительностью в сравнении со сплавом в исходном состоянии — 16 и 3 ч соответственно. Анализируя приведенный график, можно заметить, что период стабилизации деструкции образца WE43 MAD, возможно, был более длительным, однако регистрации этого факта помешало внесение в лунку порции свежей питательной среды, что отразилось в виде кратковременного усиления регистрируемого сигнала во всех лунках с образцами. После добавления свежей питательной среды мы наблюдали еще одно плато стабилизации динамики деструкции сплава WE43 MAD до 26 ч инкубации включительно, тогда как деструкция образца WE43 hom после этого не изменилась, продолжая оставаться интенсивной. После 26 ч инкубации динамика деградации сплавов обоих типов носила сходный характер. Приведенные выше результаты позволили охарактеризовать деструкцию образцов при биодеградации. Они позволяют сделать однозначный вывод о меньшей степени разрушения образца УМЗ-сплава, обработанного МОД. Изображения внешнего вида образцов в конце эксперимента, представленные на рис. 2, позволяют продемонстрировать торможение деструкции образца, обработанного МОД, в сравнении со сплавом в гомогенном состоянии. Наглядно показано, что максимальное разрушение образца из исходного сплава наблюдали в области границы сред «водная биоактивная среда—воздух».

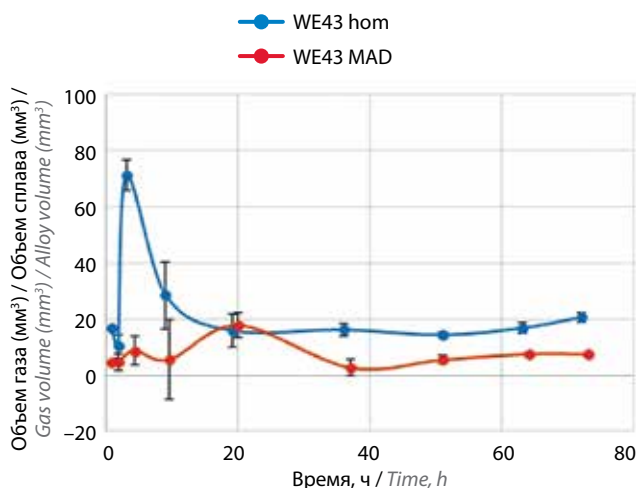
Следующий этап наших исследований был посвящен оценке газообразования, сопровождающего процесс биодеструкции магниевых сплавов выделением водорода [19–21]. С этой целью Т-образные образцы сплавов инкубировали в лунках 24-луночного планшета с питательной средой при соблюдении условий, аналогичных изложенным выше. С помощью автоматизированного микроскопа Lionheart™ FX производили фотофиксацию и анализ объема газа, выделяющегося в процессе биокоррозии образца, с использованием специализированного программного





**Рис. 2.** Кинетика биодеструкции образцов WE43 в исходном состоянии (WE43 hom) и после обработки мультиосевой деформацией (WE43 MAD) в процессе инкубации в питательной среде на основе DMEM в течение 36 ч при 37°C в атмосфере 5 % углекислого газа. Прерывистой линией обозначен период стабилизации процесса деструкции образцов сплавов. Справа показан внешний вид образцов WE43 в конце эксперимента: сверху – WE43 MAD, внизу – WE43 hom

**Fig. 2.** The kinetics of biodegradation of WE43 samples in the initial state (WE43 hom) and after multiaxial deformation (WE43 MAD) during incubation in a culture medium based on DMEM for 36 hours at 37°C in an atmosphere with 5 % carbon dioxide. The dashed line indicates the period of stabilization of the destruction process of the alloy samples. On the right the appearance of the WE43 samples at the end of the experiment is shown: at the top – WE43 MAD, at the bottom – WE43 hom

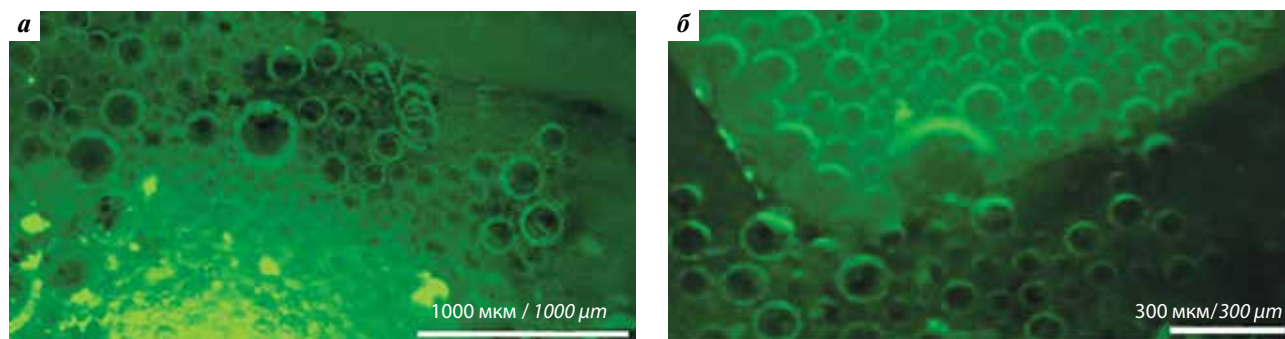


**Рис. 3.** Динамика газообразования образцов WE43 в исходном состоянии (WE43 hom) и после обработки мультиосевой деформацией (WE43 MAD) в процессе инкубации в питательной среде на основе DMEM в течение 36 ч при 37 °C в атмосфере 5 % углекислого газа, оцененная с помощью автоматизированного микроскопа Lionheart™ FX (BioTek Instruments, США)

**Fig. 3.** The gas formation dynamics of WE43 samples in the initial state (WE43 hom) and after multiaxial deformation (WE43 MAD) during incubation in a culture medium based on DMEM for 36 hours at 37 °C in an atmosphere with 5 % carbon dioxide, assessed using an automated microscope Lionheart™ FX (BioTek Instruments, USA)

обеспечения. Затем производили расчет отношения объема зарегистрированного газа к единице исходного объема образца сплава. Результаты расчетов представлены на рис. 3.

Согласно проведенным расчетам, уже через 45 мин после начала инкубации газообразование, индуцированное деструкцией гомогенного сплава, имело достоверно более интенсивный характер в сравнении с УМЗ-образцом. Максимальную интенсивность газообразования наблюдали в течение первых 9 ч инкубации образца WE43 hom, тогда как обработка сплава посредством МОД способствовала снижению газовыделения в течение этого периода в 2–8 раз. На представленном графике видно, что стабильное протекание газообразования гомогенизированного сплава наблюдалось в течение 19 ч инкубации, тогда как интенсивность выделения газа образцом, обработанным МОД, менялась незначительно, оставаясь равномерной в ходе всего периода наблюдения. Проведенный анализ показал, что общий зарегистрированный объем газа, выделенного WE43 MAD в процессе всего периода наблюдения, был на 70 % меньше в сравнении с гомогенизированным образцом ( $65,0 \pm 4,4 \text{ мм}^3 \text{ H}_2/\text{мм}^3 \text{ сплава}$  и  $211,0 \pm 21,1 \text{ мм}^3 \text{ H}_2/\text{мм}^3 \text{ сплава}$  соответственно,  $p = 0,02$ ).



**Рис. 4.** Газообразование в процессе биодеструкции образцов WE43 в исходном состоянии (WE43 hom) (а) и после обработки мультиосевой деформацией (WE43 MAD) (б) через 3 сут инкубации в питательной среде на основе DMEM

**Fig. 4.** Gas formation during biodegradation of WE43 samples in the initial state (WE43 hom) (a) and after multi-axial deformation (WE43 MAD) (b) after 3 days of incubation in a culture medium based on DMEM

Изображения, представленные на рис. 4, свидетельствуют, что в сравнении с образцом сплава после обработки МОД газообразование, сопровождавшее биодеструкцию образца в исходном состоянии, оставалось более интенсивным даже к концу эксперимента, несмотря на отмеченное снижение его активности по сравнению с начальным периодом инкубации.

Таким образом, результаты проведенных исследований продемонстрировали, что обработка гомогенизированного сплава WE43 посредством МОД способствует снижению интенсивности его деструкции и объема выделенного газа при инкубации в биоактивной среде. При этом следует особо отметить, что указанная механическая обработка обеспечивает стабилизацию интенсивности газообразования в процессе инкубации сплава спустя 4 ч после начала эксперимента.

#### Колонизация клетками

В результате изучения биодеструкции сплавов WE43 было установлено, что в 1-е часы контакта образцов с биоактивной средой газообразование и деструкция образцов протекали чрезвычайно интенсивно. При этом газообразование, сопровождавшее биодеструкцию гомогенизированного сплава, имело взрывообразный характер (деструкция протекала бурно и начиналась практически сразу после погружения в среду). Учитывая это, образцы сплавов были проинкубированы в питательной среде в течение 4 ч перед нанесением клеток для перехода к стадии стабильной биодеструкции. Для данного исследования были использованы ММСК мыши. После удаления среды на поверхность образцов наносили клетки, выдерживали их для адгезии к сплавам, а затем в лунки с образцами добавляли новую порцию среды. Результаты оценивали через 7 сут инкубации.

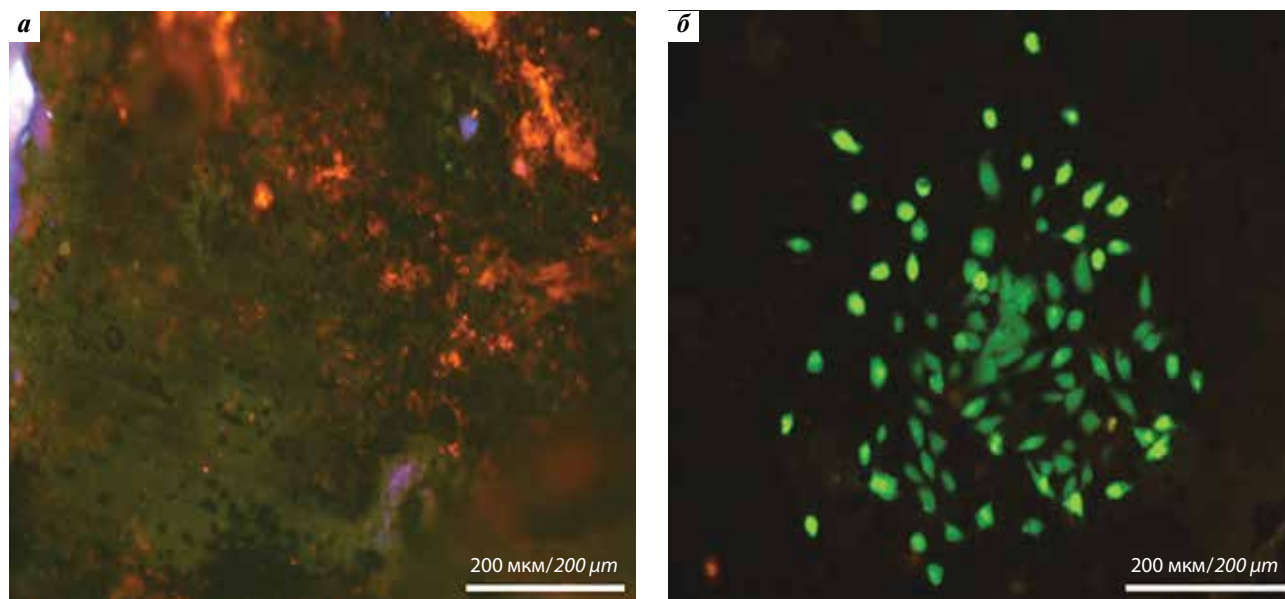
Как видно на рис. 5, после окончания периода инкубации поверхность УМЗ-образца WE43 была колонизирована клетками. При этом абсолютное

большинство клеток на поверхности WE43 MAD демонстрировали способность конвертировать нефлуоресцирующий Calcein AM путем гидролиза ацетоксиметил эфира внутриклеточными эстеразами в активную форму кальцеина, флуоресцирующую зеленым цветом, что позволило идентифицировать их как функционально активные живые клетки. Было показано, что клетки, адгезированные на поверхности обработанного МОД сплава, имеют хорошо заметное центрально расположенное округлое ядро и полигональную структуру, а характер их взаимодействия указывает на активную пролиферацию. Напротив, на поверхности гомогенизированного образца было детектировано лишь незначительное количество мертвых клеток, флуоресцирующих красным из-за проникновения флуорохрома внутрь клеток.

На основании полученных данных можно констатировать, что свойства поверхности сплава WE43 после обработки МОД обеспечивают условия для активной клеточной адгезии и пролиферации. Это указывает на улучшение биосовместимости WE43 после МОД в сравнении с гомогенизированным сплавом.

#### Обсуждение

Полученные результаты показали, что контакт образцов сплава WE43 с биоактивной средой (питательная среда для роста клеток на основе DMEM) изначально приводил к бурному газообразованию и быстрому нарастанию деструктивных процессов. Однако уже через несколько часов после начала инкубации (данный период времени составлял в среднем 4 ч) наблюдали стабилизацию интенсивности биодеструкции исследуемого сплава. Детальное исследование кинетики данного процесса показало, что длительность вышеупомянутого этапа стабилизации сплава WE43 была значительно выше после обработки МОД в сравнении с гомогенным образцом — более чем в 5 раз. Логично предположить, что



**Рис. 5.** Колонизация клетками образцов гомогенизированного WE43 (а) и деформированного WE43 МОД (б) в процессе инкубации в питательной среде DMEM при 37°C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в течение 7 сут

**Fig. 5.** Cell colonization of samples of homogenized WE43 (a) and deformed WE43 MAD (b) after 7 days of incubation in DMEM culture medium at 37°C in an atmosphere with 5 % CO<sub>2</sub>

указанный период стабилизации газообразования, сопровождающийся замедлением биодеструкции сплава, является оптимальным временем для адгезии клеток к поверхности образцов и индукции их пролиферации, обуславливающих клеточную колонизацию, что соответствует выводам других исследователей [13]. Основываясь на этом заключении, мы проводили преинкубацию биodeградируемых сплавов в биоактивной среде в течение 4 ч, удаляли питательную среду, потерявшую кондиционные свойства, а затем с началом периода стабилизации наносили на поверхность образцов ММСК, обеспечивая тем самым оптимальные условия для их адгезии и процесса колонизации. Исследование морфологии образцов показало, что соблюдение описанных условий способствовало колонизации поверхности образцов сплава. При этом наибольшее количество функционально активных клеток было обнаружено именно на поверхности образца, обработанного МОД, с удлинённым периодом стабильности биодеструктивных процессов на раннем этапе инкубации. Из результатов исследований, опубликованных ранее, известно, что обработка сплава МОД способствует измельчению зерна сплава. В частности, для сплава WE43 в процессе МОД наблюдали измельчение зерна до 0,93 мкм [17, 21]. При этом было установлено, что формирование УМЗ-структуры приводит к увеличению предела прочности сплава с 234 МПа в гомогенизированном состоянии до 300 МПа, а усталостной прочности — с 90 до 165 МПа [22]. Кроме того, в экспериментах *in vitro* было констатировано улучшение биосовместимости

сплава WE43 после обработки МОД по сравнению с исходным состоянием: отмечали значительное снижение гемолиза эритроцитов, повышение жизнеспособности лейкоцитов и пролиферации ММСК [17]. Данное явление можно рассматривать как результат замедления химической коррозии сплава. Было показано, что потеря массы образца, обработанного методом МОД, уменьшается до  $0,80 \pm 0,06$  мг/(см<sup>2</sup>·день) по сравнению с  $1,09 \pm 0,24$  мг/(см<sup>2</sup>·день) в исходном состоянии. Авторами также была отмечена тенденция к снижению количества выделившегося водорода. Таким образом, можно предположить, что изменение структуры сплава на УМЗ действительно оказывает положительный эффект на динамику биодеструкции.

Опираясь на вышеизложенное, можно заключить, что перспективность использования сплава WE43 для изготовления ортопедических изделий, в частности для металлотезы или имплантатов с целью возмещения дефектов костной ткани, значительно возрастет после обработки методом МОД благодаря снижению объема газообразования в области хирургического вмешательства, а также улучшению прочностных и цитокондуктивных качеств. Последние, как ожидается, ускорят фиксацию медицинского изделия в области остеосинтеза, а также его интеграцию в окружающие ткани, обеспечив стабилизацию контактных поверхностей и максимальную функциональную компенсацию для восполнения опороспособности кости. Замедление биodeградации УМЗ-сплава, отмечаемое в том числе в условиях *in vivo* [22], будет



способствовать пролонгации эксплуатационного периода разрабатываемого медицинского изделия, поскольку обеспечит приближение скорости протекания процессов биорезорбции к кинетике репаративных процессов в области восполняемого дефекта. Разработка медицинских изделий, обладающих подобными свойствами, является особенно актуальной задачей для детской ортопедии с целью сокращения количества повторных операций, а также для травматологии и онкологии, сопряженных с необходимостью проведения расширенных резекций костей, обеспечивающих удаление разрушенных или поврежденных опухолью тканей, ведущих к усилению риска инвалидизации пациента. Представляется необходимым, чтобы терапия данной группы онкологических пациентов включала не только мероприятия по лечению основного заболевания (химиорадитерапия, экстирпация поврежденных тканей), но и проведение реконструктивных операций по восполнению костных дефектов и восстановлению функциональности опорно-двигательной системы. Кроме того, стоит отметить, что ранее проведенное исследование показало, что коинкубация сплава WE43 с опухолевыми клетками линий LNCaP и MDA-MB-231 снижает их жизнеспособность и способность к пролиферации [23]. Это делает сплав WE43 перспективным

материалом с противоопухолевой активностью для создания имплантатов и крепежных элементов для ортопедической онкологии. Поэтому дальнейшее изучение биodeградируемых материалов на основе сплавов магния, подвергнутых различным методам механической обработки для программирования скорости их биодеструкции и повышения биосовместимости, будет способствовать созданию новых биоматериалов, перспективных для применения в медицинской практике, в том числе и в онкоортопедии.

### Заключение

Анализ приведенных данных показывает, что обработка сплава WE43 методом МОД способствует снижению скорости биodeградации, в частности стабилизирует интенсивность газообразования и деструкции образца, что улучшает его биосовместимость, стимулируя колонизацию клетками его поверхности. В целом полученные результаты дают основание рекомендовать обработку сплава посредством МОД для создания на его основе медицинских изделий для целей онкоортопедии. Ожидается, что использование данного подхода повысит стабильность остеосинтеза, обеспеченного металлоконструкциями на основе WE43, обработанного МОД, а также снизит объем и интенсивность газообразования в области имплантации.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rajan A.V., Sundaram C.M., Rajesh A.V. Mechanical and morphological investigation of bio-degradable magnesium AZ31 alloy for an orthopedic application. *Mater Today Proc* 2020;21(1):272–7. DOI: 10.1016/j.matpr.2019.05.429.
2. Bin B.S.J., Tan Y.T., Fong K.S., Tan M.J. Effect of severe plastic deformation and post-annealing on the mechanical properties and bio-corrosion rate of AZ31 magnesium alloy. *Proced Eng* 2017;207:1475–80. DOI: 10.1016/j.proeng.2017.10.916.
3. Razavi M., Fathi M., Savabi O. et al. *In vivo* assessments of bioabsorbable AZ91 magnesium implants coated with nanostructured fluoridated hydroxyapatite by MAO/EPD technique for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015;48:21–7. DOI: 10.1016/j.msec.2014.11.020.
4. Öcal E.B., Esen Z., Aydinol K., Dericioğlu A.F. Comparison of the short and long-term degradation behaviors of as-cast pure Mg, AZ91 and WE43 alloys. *Mater Chem Phys* 2020;241:122350. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2019.122350.
5. Li M., Benn F., Derra T. et al. Microstructure, mechanical properties, corrosion resistance and cytocompatibility of WE43 Mg alloy scaffolds fabricated by laser powder bed fusion for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021;119:11623. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111623.
6. Rahman M., Li Y., Wen C. Realization and characterization of double-layer Ca-P coating on WE43 Mg alloy for biomedical applications. *Surf Coat Technol* 2020;398:126091. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2020.126091.
7. Ijiri M., Shimonishi D., Tani S. et al. Improvement of corrosion resistance of magnesium alloy by high-temperature high-pressure cavitation treatment. *Int J Lightweight Mater Manuf* 2019;2(3):255–60. DOI: 10.1016/j.ijlmm.2019.02.001.
8. Chen J., Tan L., Yu X. et al. Mechanical properties of magnesium alloys for medical application: A review. *J Mech Behav Biomed Mater* 2018;87:68–79. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2018.07.022.
9. Sekar P., S N., Desai V. Recent progress in *in vivo* studies and clinical applications of magnesium based biodegradable implants — A review. *J Magnes Alloy* 2021. DOI: 10.1016/j.jma.2020.11.001.
10. Liu D., Yang D., Li X., Hu S. Mechanical properties, corrosion resistance and biocompatibilities of degradable Mg-RE alloys: A review. *J Mater Res Technol* 2019;8(1):1538–49. DOI: 10.1016/j.jmrt.2018.08.003.
11. Toong D.W.Y., Ng J.C.K., Huang Y. et al. Bioresorbable metals in cardiovascular stents: Material insights and progress. *Materialia* 2020;12:100727. DOI: 10.1016/j.mtl.2020.100727.
12. Liu C., Ren Z., Xu Y. et al. Biodegradable Magnesium Alloys Developed as Bone Repair Materials: A Review. *Scanning* 2018;2018:9216314. DOI: 10.1155/2018/9216314.
13. Willumeit R., Möhring A., Feyerabend F. Optimization of cell adhesion on mg based implant materials by pre-incubation under cell culture conditions. *Int J Mol Sci* 2014;15(5):7639–50. DOI: 10.3390/ijms15057639.
14. Cecchinato F., Agha N.A., Martinez-Sanchez A.H. et al. Influence of Magnesium Alloy Degradation on Undifferentiated Human Cells. *PLoS*



- One 2015;10(11):e0142117.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0142117.
15. Zharebtsov S., Kudryavtsev E., Kostjuchenko S. et al. Strength and ductility-related properties of ultrafine grained two-phase titanium alloy produced by warm multiaxial forging. *Mater Sci Eng A* 2012;536:190–6. DOI: 10.1016/j.msea.2011.12.102.
  16. Dobatkin S.V., Lukyanova E.A., Martynenko N.S. et al. Strength, corrosion resistance, and biocompatibility of ultrafine-grained Mg alloys after different modes of severe plastic deformation. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng* 2017;194:012004. DOI: 10.1088/1757-899X/194/1/012004.
  17. Martynenko N., Lukyanova E., Anisimova N. et al. Improving the property profile of a bioresorbable Mg-Y-Nd-Zr alloy by deformation treatments. *Materialia* 2020;13:100841. DOI: 10.1016/j.mtl.2020.100841.
  18. Choudhary R., Venkatraman S.K., Bulygina I. et al. Biomineralization, dissolution and cellular studies of silicate bioceramics prepared from eggshell and rice husk. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021;118:111456. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111456.
  19. Imwinkelried T., Beck S., Schaller B. Pre-clinical testing of human size magnesium implants in miniature pigs: Implant degradation and bone fracture healing at multiple implantation sites. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2020;108:110389. DOI: 10.1016/j.msec.2019.110389.
  20. Gartzke A.-K., Julmi S., Klose C. et al. A simulation model for the degradation of magnesium-based bone implants. *J Mech Behav Biomed Mater* 2020;101:103411. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2019.103411.
  21. Hou R., Victoria-Hernandez J., Jiang P. et al. *In vitro* evaluation of the ZX11 magnesium alloy as potential bone plate: Degradability and mechanical integrity. *Acta Biomater* 2019;97:608–22. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.07.053.
  22. Dobatkin S., Martynenko N., Anisimova N. et al. Mechanical properties, biodegradation, and biocompatibility of ultrafine grained magnesium alloy WE43. *Materials (Basel)* 2019;12(21):3627. DOI: 10.3390/ma12213627.
  23. Anisimova N., Kiselevskiy M., Martynenko N. et al. Cytotoxicity of biodegradable magnesium alloy WE43 to tumor cells *in vitro*: Bioresorbable implants with antitumor activity? *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2020;108B:167–73. DOI: 10.1002/jbm.b.34375.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность к.т.н. Н.Ю. Юрченко и д.т.н., профессору А.Г. Салищеву за проведение мультиосевой деформации.

**Acknowledgement.** The authors are grateful to Dr. N.Yu. Yurchenko and Prof. A.G. Salishchev for carrying out multi-axial deformation.

#### Вклад авторов

Н.С. Мартыненко: получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

Н.Ю. Анисимова: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

К.М. Новрузов: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

С.В. Добаткин, Ю.З. Эстрин: формальный анализ, редактирование;

М.В. Киселевский: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, формальный анализ, редактирование.

#### Author's contribution

N.S. Martynenko: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript;

N.Yu. Anisimova: research design development, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript;

K.M. Novruzov: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

S.V. Dobatkin, Yu.Z. Estrin: formal analysis and editing;

M.V. Kiselevskiy: review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained, formal analysis and editing.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

Н.С. Мартыненко / N.S. Martynenko: <https://orcid.org/0000-0003-1662-1904>

Н.Ю. Анисимова / N.Yu. Anisimova: <https://orcid.org/0000-0002-4370-6578>

К.М. Новрузов / K.M. Novruzov: <https://orcid.org/0000-0002-0773-255X>

С.В. Добаткин / S.V. Dobatkin: <https://orcid.org/0000-0003-4232-927X>

М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

Ю.З. Эстрин / Yu.Z. Estrin: <https://orcid.org/0000-0001-7784-5704>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено в рамках федеральной исследовательской программы, контракт № AAAA-A19-119021990077-8.

**Financing.** The study was funded through the federal research program, contract No AAAA-A19-119021990077-8.

**Соблюдение правил биоэтики.** Проведение экспериментов с использованием клеточных культур было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

**Compliance with principles of bioethics.** The experiments using cell cultures were approved by the local ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia.

**Статья поступила:** 19.03.2021. **Принята к публикации:** 16.04.2021.

**Article submitted:** 19.03.2021. **Accepted for publication:** 16.04.2021.