

Исследование биосовместимости *in vitro* ультрамелкозернистых биорезорбируемых сплавов на основе Zn

Н.С. Мартыненко¹, Н.Ю. Анисимова¹⁻³, М.В. Киселевский^{2,3}, О.В. Рыбальченко¹, Д.Р. Темралиева^{1,3}, Д.В. Просвирнин¹, С.В. Пивоварчик¹, Д.В. Филоненко⁴, С.В. Добаткин^{1,3}

¹ФГБУН «Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН»; Россия, 119334 Москва, Ленинский пр-т, 49;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»; Россия, 119049 Москва, Ленинский пр-т, 4;

⁴отдел общей онкологии ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы»; Россия, 111123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86

Контакты: Наталья Сергеевна Мартыненко nataliasmartynenko@gmail.com

Введение. В сравнении с магниевыми сплавами сплавы на основе цинка обладают преимуществами при использовании в качестве биодеградируемых имплантируемых ортопедических металлоконструкций за счет отсутствия газообразования, однако уступают по механическим свойствам.

Цель исследования – изучить влияние обработки методом кручения под высоким давлением (КВД) на прочность, пластичность, коррозионную стойкость, антимикробные свойства, поверхностную колонизацию клетками и биосовместимость сплавов на основе цинка.

Материалы и методы. В работе были исследованы сплавы системы Zn-x%Mg (где x = 0; 1 и 1,7 %) в исходном недеформированном состоянии и после КВД. Механические свойства исследовали на испытательной машине Instron 3382 при комнатной температуре. Биосовместимость сплавов оценивали по гемолитической активности и цитотоксичности. Кроме того, исследовали стимуляцию колонизации мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками поверхности образцов, а также наличие антимикробных свойств в отношении культуры *Escherichia coli*. Для изучения скорости деградации образцы сплавов инкубировали в стандартной питательной среде в течение 8 сут, оценивая изменение их массы относительно исходного значения.

Результаты. Установлено, что КВД приводит к росту прочности чистого цинка в 2 раза, а сплавов Zn-1%Mg и Zn-1,7%Mg – в 3 и 5,5 раза соответственно, при увеличении их пластичности. При этом деформационная обработка практически не влияет на коррозионную стойкость исходных материалов. В ходе проведенных исследований не выявлено достоверного увеличения гемолитической активности и бактерицидности сплавов. Однако наблюдали достоверное снижение способности клеток к колонизации поверхности чистого цинка после КВД.

Заключение. КВД приводит к существенному росту прочности изученных материалов при одновременном увеличении их пластичности. При этом проведенные исследования не показали достоверного ухудшения биосовместимости сплавов на основе цинка после КВД. Можно предположить, что выявленный цитотоксический эффект, очевидно, был опосредован не столько методом обработки сплава, сколько его химическим составом. Это позволяет оценить обработанные КВД исследованные сплавы системы Zn-x%Mg (и в частности, сплав Zn-1,7%Mg) как перспективную основу для разработки биодеградируемых ортопедических медицинских изделий.

Ключевые слова: цинковые сплавы, имплантат, биодеградация, биосовместимость, антимикробные свойства

Для цитирования: Мартыненко Н.С., Анисимова Н.Ю., Киселевский М.В. и др. Исследование биосовместимости *in vitro* ультрамелкозернистых биорезорбируемых сплавов на основе Zn. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(3):40–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-40-49

Study of biocompatibility *in vitro* of ultrafine-grained Zn-based bioresorbable alloys

Natalia S. Martynenko¹, Natalia Yu. Anisimova¹⁻³, Mikhail V. Kiselevskiy^{2,3}, Olga V. Rybalchenko¹, Diana R. Temralieva^{1,3}, Dmitry V. Prosvirnin¹, Svetlana V. Pivovarchik¹, Dmitrii V. Filonenko⁴, Sergey V. Dobatkin^{1,3}

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

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

³National University of Science and Technology «MISIS»; 4 Leninsky Ave., Moscow 119991, Russia;

⁴General Oncology Department of the A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department; 86 Entuziastov Shosse, Moscow 111123, Russia

Contacts: Natalia Sergeevna Martynenko nataliasmartynenko@gmail.com

Background. Zinc alloys have advantages for use as biodegradable implantable orthopedic metal structures due to the absence of gas formation in comparison with magnesium alloys. But their mechanical properties are often has lower values.

Aim. Investigation of effect of high-pressure torsion (HPT) on strength, ductility, corrosion resistance, antimicrobial properties, surface cell colonization and biocompatibility of Zn-based alloys.

Materials and methods. The alloys of the Zn-x%Mg system (where x = 0; 1 and 1.7 %) in the initial undeformed state and after HPT were investigated in this work. Mechanical properties were studied on an Instron 3382 testing machine at room temperature. The biocompatibility of the alloys was evaluated by hemolytic activity and cytotoxicity assesment. We also studied the stimulation of colonization of the surface of the samples by mesenchymal multipotent stromal cells, as well as the presence of antimicrobial properties relative to the *Escherichia coli* culture. To study the degradation rate, the alloy samples were incubated in a standard nutrient medium for 8 days, assessing the change in their mass relative to the initial value.

Results. It has been established that HPT leads to an increase in the strength of pure Zn 2 times, and of Zn-1%Mg and Zn-1.7%Mg alloys by 3 and 5.5 times, respectively, with an increase in their ductility. At the same time, deformation treatment has practically no effect on the corrosion resistance of the initial materials. No significant increase in the hemolytic activity and bactericidal activity of the alloys was revealed during studies. However, a significant decrease in the ability of cells to colonize the surface of pure zinc was observed after HPT.

Conclusion. HPT leads to a significant increase in the strength and ductility of studied materials. At the same time, a decrease in the biocompatibility of zinc-based alloys after HPT did not observed. It was found that the discovered cytotoxic effect was obviously caused not so much by the alloy processing method as by its chemical composition. This makes it possible to evaluate the studied alloys of the Zn-x%Mg system treated by HPT (and, in particular, the Zn-1.7%Mg alloy) as a promising structure for the development of biodegradable orthopedic products.

Keywords: zinc alloys, bioresorption, biodegradation, biocompatibility, antimicrobial properties

For citation: Martynenko N.S., Anisimova N.Yu., Kiselevskiy M.V. et al. Study of biocompatibility *in vitro* of ultrafine-grained Zn-based bioresorbable alloys. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(3):40–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-40-49

Введение

Повреждение костной ткани, включая оскольчатые и компрессионные переломы, является одним из наиболее распространенных видов травм. В подавляющем большинстве случаев такие травмы приводят к снижению запаса прочности кости и нарушению ее опорной функции. Для того чтобы не снижалось качество жизни пациентов с такими травмами, часто требуется временная реконструкция костных структур с помощью винтов, пластин, скоб и т. п. В настоящее время для данных целей чаще всего используют биоинертные титан и сплавы на его основе, а также коррозионностойкую сталь [1–3]. Данные материалы обладают высокими прочностными характеристиками и могут успешно выполнять функцию временного костного каркаса. Однако большим недостатком является то, что их прочность существенно превышает прочность кортикальной кости, что может приводить к ее повреждению имплантатом за счет так называемого эффекта «экранирования напряжений»

[4]. Это существенно повышает риск повторного перелома кости в области крепления имплантата. Кроме того, биоинертные имплантаты необходимо удалять после заживления перелома, что приводит к повторной травматизации костной и окружающих тканей и увеличению времени реабилитации пациента. Поэтому в последние два десятилетия интерес исследователей и врачей-специалистов направлен на разработку материалов нового поколения для остеосинтеза — биodeградируемых изделий (имплантатов, металлоконструкций и остеофиксаторов) [5–6]. Такие имплантаты могут постепенно резорбироваться в организме пациента, перенося нагрузку на кость. Кроме того, благодаря постепенной деградации таких имплантатов отпадает потребность в проведении повторной операции, что способствует скорейшему выздоровлению пациента. Долгое время основными кандидатами на роль материалов для создания металлических биоразлагаемых имплантатов являлись магний и сплавы на его основе [7–8]. Они обладают

приемлемым уровнем биосовместимости и прочностными характеристиками, сходными с характеристиками костной ткани. Однако основным недостатком магниевых сплавов является довольно высокая скорость их деградации, из-за чего имплантат может выйти из строя быстрее, чем произойдет полное заживление кости. Кроме того, деградация магниевых сплавов сопровождается выделением газообразного водорода, что может приводить к образованию в тканях газовых пузырей и ухудшать адгезию клеток на поверхности изделия. А.С. Hänzi и соавт. [9] показали, что при имплантации образцов сплава Mg–Y–Zn карликовым свиньям в печень и малый сальник наблюдалось ограниченное газообразование, тогда как введение образца сплава в прямую мышцу живота приводило к существенному скоплению водорода в области имплантации. N. Anisimova и соавт. [10] также наблюдали активное газовыделение с образованием воздушных карманов при деградации сплавов Mg–6%Ag и Mg–10%Gd *in vivo*. Поэтому, несмотря на преимущества, магниевые сплавы не всегда могут быть применимы в остеосинтезе.

В отличие от быстрорастворимых магниевых сплавов, цинк и сплавы на его основе демонстрируют более подходящую скорость деградации без выделения избыточного водорода [11–13]. В настоящее время большое внимание уделяется исследованиям, направленным на изучение влияния состава цинковых сплавов на их прочностные и коррозионные свойства, а также биосовместимость. Ранее было показано, что имплантация штифтов из чистого цинка в ткани прямой кишки мышей не вызывает серьезных побочных эффектов. Также было обнаружено, что чистый цинк ингибирует острое воспаление за счет повышенной экспрессии ENA-78 и F4/80 [14]. Исследование биосовместимости сплавов Zn–0,05%Mg–x%Ag *in vivo* при имплантации в искусственно сформированный дефект дистального отдела бедренной кости кроликов также не показало очевидной токсичности сплава в течение 24-недельного периода имплантации [15]. Интересно, что чистый цинк и сплав Zn–0,05%Mg показали сильную антибактериальную активность в отношении *Escherichia coli* (*E. coli*) и *Staphylococcus aureus* [16]. Однако в случае сплава Zn–Mg–Fe (98 масс. % \leq Zn \leq 99,5 масс. %; 0,01 масс. % \leq Mg \leq 0,5 масс. % и 0,01 масс. % \leq Fe \leq 0,5 масс. %) наблюдалось накопление цинка в прилегающих к кости тканях при хорошей биосовместимости *in vivo* [17]. При этом, несмотря на приведенные результаты, накопленная статистика по исследованию биосовместимости сплавов на основе цинка все еще остается довольно скудной и противоречивой. Поэтому исследование влияния цинка и его сплавов на различные аспекты биосовместимости в настоящее время является актуальной задачей.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении биосовместимости сплавов системы Zn–Mg (0; 1 и 1,7 % Mg) в исходном (крупнозернистом) и упрочненном методом кручения под высоким давлением (КВД) состояниях. Применение КВД позволяет существенно повысить прочность цинковых сплавов за счет сильного измельчения их микроструктуры [18–20], что является очередным шагом на пути к разработке конечного медицинского изделия.

Материалы и методы

Материалы исследования. В настоящей работе в качестве материалов исследования были выбраны чистый цинк и 2 сплава с номинальным составом Zn–1%Mg и Zn–1,7%Mg в исходном, крупнозернистом (отжиг) и мелкозернистом (упрочненном КВД) состояниях. Химический состав изучаемых материалов представлен в табл. 1. Деформацию чистого цинка проводили из литого состояния. Сплавы Zn–1%Mg и Zn–1,7%Mg перед деформацией подвергали гомогенизационному отжигу при 340 °С в течение 20 ч (охлаждение водой) для выравнивания химического состава сплавов. КВД проводили на дисках диаметром 20 мм и толщиной 1,5 мм при комнатной температуре под давлением 4 ГПа ($n = 10$).

Таблица 1. Химический состав изучаемых материалов
Table 1. Chemical composition of materials

Сплав Alloy	Zn, масс. % Zn, wt. %	Mg, масс. % Mg, wt. %
Zn	Основа Balance	–
Zn–1%Mg	Основа Balance	0,98 ± 0,03
Zn–1,7%Mg	Основа Balance	1,73 ± 0,05

Исследование механических свойств. Механические характеристики исследуемых материалов определяли на испытательной машине Instron 3382 со скоростью растяжения 1 мм/мин при комнатной температуре. Испытания проводили на плоских образцах с площадью поперечного сечения 2 мм × 1 мм и рабочей длиной 5,75 мм.

Подготовка образцов к исследованию биологических свойств. Для исследований использовали образцы в форме 1/8 диска диаметром 20 мм и толщиной около 1 мм ($n = 12$). Перед началом проведения исследований образцы погружали на 24 часа в 70 % этанол, а затем сушили в стерильных условиях.

Гемолитическая активность и цитотоксичность образцов сплавов *in vitro*. Выделение клеток для получения биологических моделей и исследования указанных

параметров проводили в соответствии с описанными ранее методиками [21]. В качестве биологических моделей для изучения указанных параметров использовали эритроциты ($3 \pm 0,2 \times 10^7$ клеток/мл) и мононуклеарные лейкоциты крови мышей линии C57BL/6 ($6 \pm 0,12 \times 10^5$ клеток/мл), суспендированные в физиологическом растворе хлорида натрия («ПанЭко», Россия) или в питательной среде на основе Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) («ПанЭко», Россия), дополненной 5 % фетальной бычьей сыворотки (Hyclone, США), 2 мМ глутамин («ПанЭко», Россия), 50 ед/мл пенициллин-стрептомицин («ПанЭко», Россия) соответственно. В качестве контроля использовали суспензии клеток, которые инкубировали без образцов сплавов в аналогичных условиях. Индуцированный гемолиз оценивали через 4 ч, а цитотоксичность через 24 ч после начала коинкубации сплавов и клеточных суспензий при 37 °С в атмосфере 5 % углекислого газа согласно методике. Для оценки цитотоксичности исследовали активность лактатдегидрогеназы с использованием наборов реактивов Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с методикой производителя, измеряя адсорбцию при 450 нм против 620 нм на планшетном ридере Spark (Tecan, США). Гемолитическую активность оценивали, учитывая адсорбцию супернатанта при 540 нм (A540). Результат исследований был представлен как отношение измеренной адсорбции к контролю (% относительно контроля).

Исследование стимуляции клеточной колонизации. Для проведения данного исследования использовали мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), генерированные из костного мозга мышей в соответствии с ранее описанной методикой [22]. 12 000 клеток в объеме 20 мкл наносили в виде капли в центр образцов сплавов на дне лунок планшета для инкубации, выдерживали 30 мин, а затем осторожно вносили в лунку основной объем культивационной питательной среды. В контроле клетки инкубировали при аналогичных условиях, но без сплавов. Через 8 сут проводили учет результатов. Для регистрации клеточной активности на образцах сплавов использовали тест на лактатдегидрогеназу, измеряя адсорбцию при 450 нм на фоне 620 нм (A450 – A620).

Антибактериальные свойства исследуемых образцов сплавов оценивали на модели 20-часовой культуры *E. coli* (коллекция ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) после 24 ч инкубации в бульоне Мюллера–Хинтона при 37 °С в атмосфере 5 % углекислого газа. В контроле бактериальную культуру инкубировали без сплавов в таких же условиях. Для учета результатов использовали индикатор Alamar blue (Invitrogen, США) в соответствии

с инструкцией производителя с последующей регистрацией флуоресценции на планшетном ридере Spark (Tecan, США) при Ex530/Em590.

Все манипуляции и исследования были одобрены местным комитетом по этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (шифр темы ААА-А19-119061190077, протокол № 2 от 12.05.2019).

Исследование коррозионной стойкости. Исследования скорости деградации материалов проводили иммерсионным методом путем погружения образцов в питательную среду на основе DMEM. Испытания проводились при температуре 37 °С в течение 8 сут. Для каждого сплава исследование проводили на 3 образцах одного типа, предварительно обработанных погружением в этанол. Для удаления продуктов деградации образцы промывались в 10 % водном растворе персульфата аммония ((NH₄)₂S₂O₈) в течение 5 мин [23]. После удаления продуктов деградации образцы тщательно высушивали на воздухе и взвешивали на электронных весах Sartorius pro 11 (с точностью до 3 знаков на 1 мг). Значение скорости деградации рассчитывали по формуле [23]:

$$DR = 8,76 \times 10^4 \times \frac{m_0 - m_f}{A \times t \times \rho},$$

где DR – скорость деградации, мм/год; m_0 – исходная масса, г; m_f – конечная масса, г; t – время погружения, ч; A – площадь поверхности образца, см²; ρ – плотность сплава, г/см³.

Потерю массы рассчитывали по формуле:

$$ML = \frac{m_0 - m_f}{m_0} \times 100,$$

где ML – потеря массы, %; m_0 – исходная масса, г; m_f – конечная масса, г.

Статистический анализ данных. Результаты представлены в виде среднего значения и стандартной девиации учтенных в триплетах величин. Сравнительный анализ межгрупповых данных проводили с использованием t-критерия. Для оценки полученных результатов сравнивали активность сплавов после КВД с исходным образцом, а также с контролем, содержащим клетки, которые инкубировали в сходных условиях без сплавов. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Механические свойства. В табл. 2 представлены результаты исследования механических свойств сплавов до и после КВД.

Таблица 2. Механические свойства изучаемых материалов до и после кручения под высоким давлением (КВД)

Table 2. Mechanical properties of materials before and after high-pressure torsion (HPT)

Материал и его обработка Material and its processing		Предел текучести, МПа Yield stress, MPa	Предел прочности, МПа Ultimate tensile strength, MPa	Удлинение, % Elongation, %
Zn	Отжиг Annealing	67 ± 4	89 ± 6	5,0 ± 1,0
	КВД HPT	204 ± 30	260 ± 21	58,1 ± 21,1
Zn-1%Mg	Отжиг Annealing	153 ± 7	156 ± 3	0,2 ± 0,1
	КВД HPT	374 ± 5	459 ± 25	6,3 ± 3,3
Zn-1,7%Mg	Отжиг Annealing	47 ± 11	75 ± 14	0,3 ± 0,02
	КВД HPT	344 ± 2	411 ± 1	55,3 ± 22,3

Видно, что КВД приводит к существенному росту прочности изучаемых материалов. Так, прочность чистого цинка повысилась с 89 ± 6 МПа в исходном состоянии до 260 ± 21 МПа после КВД при увеличении пластичности с $5,0 \pm 1,0$ до $58,1 \pm 21,1$ %. В случае сплава Zn-1%Mg наблюдается рост прочности со 156 ± 3 до 459 ± 25 МПа при небольшом увеличении пластичности с $0,2 \pm 0,1$ до $6,3 \pm 3,3$ %. Наибольший прирост прочности наблюдается у сплава Zn-1,7%Mg после КВД: с 75 ± 14 до 411 ± 1 МПа при росте пластичности с $0,3 \pm 0,02$ до $55,3 \pm 22,3$ %.

Биосовместимость *in vitro*. Для оценки влияния КВД на биосовместимость сплавов оценивали усиление гемолитической активности и снижение вы-

живаемости лейкоцитов крови после совместной инкубации в сравнении с контролем.

Статистический анализ данных, представленных на рис. 1, показал, что ни один из исследованных сплавов не демонстрирует достоверную гемолитическую активность. Также можно сделать вывод о том, что обработка исходных материалов КВД не влияет на изменение данного параметра биологической активности.

С целью изучения возможного воздействия КВД на другие параметры биосовместимости было исследовано их влияние на выживаемость лейкоцитов после инкубации *in vitro* (рис. 2).

Статистический анализ полученных данных показал, что изменение химического состава и обработки сплавов влияют на проявление их цитотоксичности разнонаправленно. Так, было установлено, что чистый цинк в исходном состоянии достоверно угнетает выживаемость клеток при коинкубации ($p = 0,02$). Однако чистый цинк после КВД не вызывает достоверного снижения жизнеспособности клеток в сравнении с контролем ($p = 0,11$). С другой стороны, исходный сплав Zn-1%Mg не оказывает достоверного цитотоксического воздействия, тогда как после КВД эффект угнетения жизнеспособности лейкоцитов статистически достоверен ($p = 0,03$). Если рассматривать результаты изучения активности образцов сплава Zn-1,7%Mg, то можно отметить, что они в равной степени достоверно проявляют цитотоксичность вне зависимости от обработки: жизнеспособность клеток после инкубации с исходным сплавом Zn-1,7%Mg составляет 69 ± 8 %, со сплавом после КВД – 64 ± 9 %. Достоверность отличий от контроля для сплава в обоих состояниях составляет $p = 0,02$ при отсутствии различий в цитотоксичности сплава до и после КВД ($p = 0,51$).

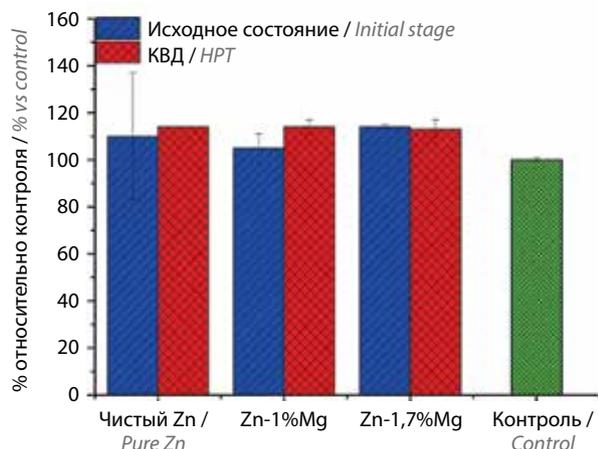


Рис. 1. Гемолитическая активность сплавов на основе цинка до и после КВД в сравнении с контролем. Здесь и на рис. 2–5: КВД – кручение под высоким давлением

Fig. 1. Hemolytic activity of zinc-based alloys before and after HPT in comparison with control. Here and on figures 2–5: HPT – high-pressure torsion

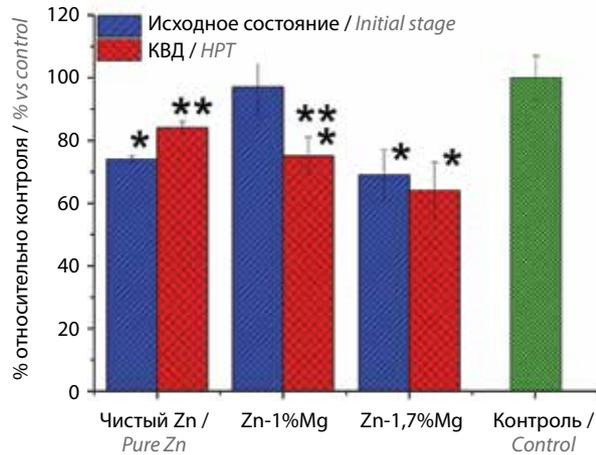


Рис. 2. Влияние сплавов на основе цинка до и после КВД на выживаемость лейкоцитов крови в сравнении с контролем. *Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$; **достоверное отличие от сплава того же состава после обработки КВД, $p < 0,05$

Fig. 2. The effect of zinc-based alloys before and after HPT on the survival of white blood cells in comparison with the control. *Significant difference from the control, $p < 0.05$; **significant difference from the alloy of the same composition after HPT treatment, $p < 0.05$

В целом можно констатировать, что в проведенных исследованиях не установлено достоверного ухудшения биосовместимости сплавов системы Zn-x%Mg после КВД. Можно предположить, что выявленный цитотоксический эффект, очевидно, был опосредован не столько методом обработки сплава, сколько его химическим составом.

Для более углубленной оценки влияния обработки КВД на биологические свойства сплавов исследовали их способность стимулировать колонизацию своей поверхности ММСК, обладающими остеогенным потенциалом, а также оказывать антибактериальный эффект.

Антибактериальный эффект. Известно, что в высоких концентрациях цинк обладает антибактериальными свойствами [16]. Учитывая биорезорбируемость цинксодержащих сплавов, изучаемых в ходе описанного исследования, можно было ожидать, что релиз ионов цинка в среду инкубации сможет обеспечить торможение роста бактериальной культуры или даже оказать бактерицидный эффект. Для проверки этой гипотезы были проведены исследования на тестовой культуре *E. coli* – грамотрицательных микроорганизмов, которые часто опосредуют развитие инфекционных процессов в костных тканях [24].

По результатам проведенных бактериологических исследований не было отмечено замедления роста модельной культуры микроорганизмов, инкубированных в присутствии образцов изучаемых сплавов, в сравнении с контролем, где тестовую культуру микроорганизмов культивировали на дне лунки планшета без образцов ($p = 0,16$) (рис. 3).

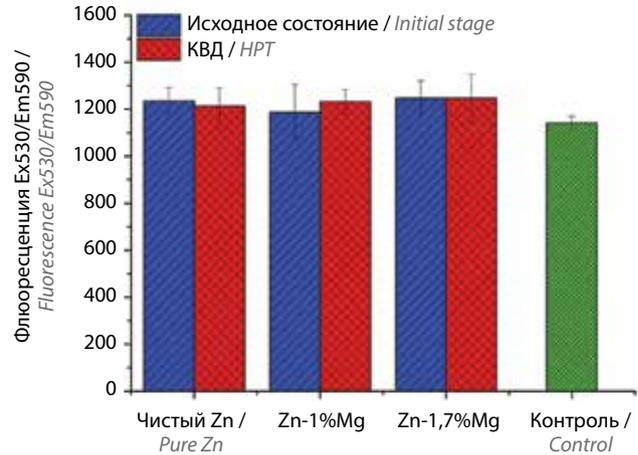


Рис. 3. Рост бактерий *E. coli* в присутствии образцов сплавов на основе цинка

Fig. 3. Growth of *E. coli* bacteria with samples of zinc-based alloys

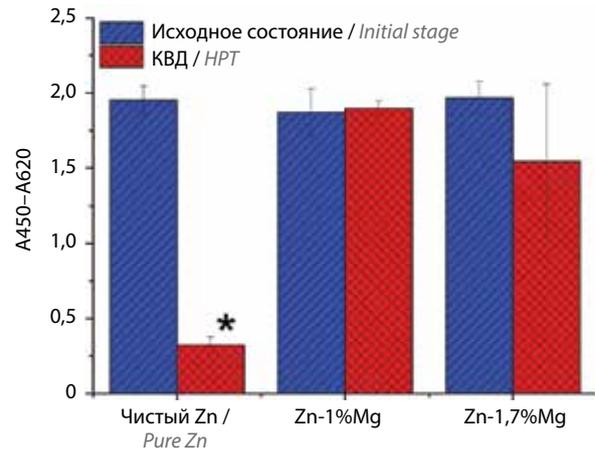


Рис. 4. Стимуляция колонизации поверхности образцов исследуемых материалов остеогенными клетками. A450–A620 – см. пояснение в разделе «Материалы и методы». * $p > 0,05$

Fig. 4. The stimulation of colonization on the surface of samples of studied materials by osteogenic cells. A450–A620 – see explanation in section “Materials and methods”. * $p > 0.05$

Это позволяет сделать вывод об отсутствии у изученных сплавов выраженных антибактериальных свойств. Отдельно следует отметить отсутствие достоверного изменения активности образцов после КВД по сравнению с исходным состоянием. Вероятно, скорость деградации сплавов в данном случае не способна обеспечить достаточное количество ионов Zn^{2+} для достижения антибактериального эффекта.

Стимуляция поверхностной клеточной колонизации. В качестве клеточной модели использовали ММСК – адгезионную культуру клеток, обладающую остеогенным потенциалом.

Данные, представленные на рис. 4, демонстрируют, что КВД способствовало снижению колонизации клетками образцов чистого цинка ($p < 0,001$).

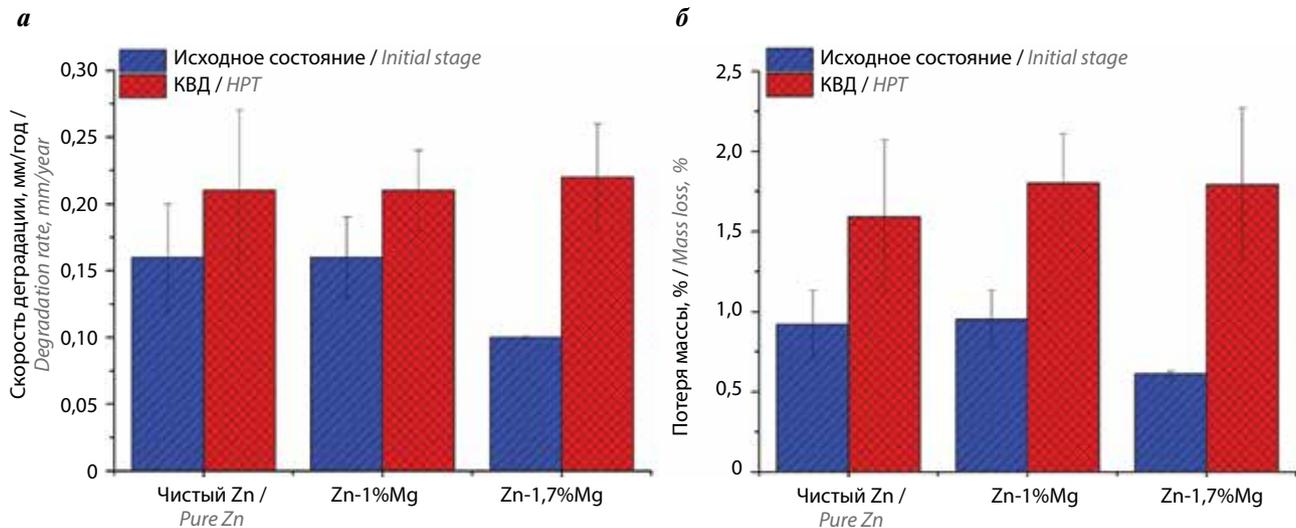


Рис. 5. Скорость деградации (а) и потеря массы (б) исследуемых материалов в исходном состоянии и после КВД

Fig. 5. The degradation rate (a) and the mass loss (б) of the studied materials in the initial state and after HPT

При этом КВД сплавов Zn-1%Mg и Zn-1,7%Mg не изменяла учитываемых биоактивных свойств этих сплавов ($p = 0,16$).

Коррозионная стойкость. Одним из наиболее важных эксплуатационных свойств биорезорбируемых сплавов является их коррозионная стойкость. Поэтому важно, чтобы деформационная обработка не приводила к сильному ускорению процесса деградации. В данной работе исследования коррозионной стойкости проводили в условиях, приближенных к условиям эксплуатации готового изделия (37 °C, биоактивная среда с сывороткой крови). Исследования коррозионной стойкости материалов представлены на рис. 5.

Исследования показали, что добавление 1 % магния в чистый цинк не приводит к изменению его коррозионной стойкости. Скорость деградации чистого цинка в исходном состоянии после 8 дней инкубации в растворе на основе среды DMEM составляет $0,16 \pm 0,04$ мм/год, в то время как сплава Zn-1%Mg – $0,16 \pm 0,03$ мм/год. При этом увеличение содержания магния до 1,7 % приводит к снижению скорости деградации до $0,10 \pm 0,00$ мм/год. Потеря массы материалов в исходном состоянии составляет $0,92 \pm 0,21$; $0,95 \pm 0,18$ и $0,61 \pm 0,02$ % для чистого цинка и сплавов Zn-1%Mg и Zn-1,7%Mg соответственно. В то же время КВД приводит к небольшому усилению процесса деградации. В случае чистого цинка и сплава Zn-1%Mg рост скорости деградации не превышает погрешности эксперимента, тогда как в случае сплава Zn-1,7%Mg рост скорости деградации превышает экспериментальную ошибку. Скорость деградации сплавов после КВД составляет $0,21 \pm 0,06$; $0,21 \pm 0,03$ и $0,22 \pm 0,04$ мм/год для чистого цинка и сплавов Zn-1%Mg и Zn-1,7%Mg соответственно, а потеря массы – $1,59 \pm 0,48$; $1,80 \pm 0,31$ и $1,79 \pm 0,48$ %.

Обсуждение

В последнее время цинк и сплавы на его основе вызывают широкий интерес в качестве материалов медицинского назначения для создания биodeградируемых имплантатов, металлоконструкций и фиксаторов, востребованных в том числе при остеореконструктивных операциях. Это обусловлено удовлетворительной биосовместимостью сплавов цинка, а также их способностью деградировать в тканях организма (они занимают промежуточное положение по скорости биорезорбции между сплавами магния и железа). В сравнении с магниевыми сплавами дополнительным преимуществом сплавов цинка после имплантации является отсутствие газообразования. Однако существенным недостатком исходных сплавов цинка, как уже было показано выше, являются его низкие механические характеристики по сравнению с аналогами. Поэтому в ходе представленного исследования было предложено провести деформационную обработку сплавов цинка различного состава с целью коррекции механических свойств с последующей оценкой биосовместимости и биоактивных свойств полученных образцов. Для этой цели использовали обработку сплавов методом КВД, которое часто применяют для повышения механических свойств сплавов.

Как показали проведенные исследования, КВД значительно улучшает механические свойства сплавов системы Zn-x%Mg. Так, прочность чистого цинка после КВД повышается в 2 раза, тогда как прочность сплавов Zn-1%Mg и Zn-1,7%Mg – в 3 и 5,5 раза соответственно. Такой рост прочности обусловлен сильным измельчением микроструктуры изученных материалов. В работе W. Bednarczyk и соавт. [18] было показано, что КВД сплава Zn-0,5%Cu приводит к его существенному упрочнению из-за измельчения

зерна вплоть до ультрамелкозернистого состояния. Схожая ситуация наблюдается и для сплава Zn-0,8%Ag, где измельчение зерна после КВД обеспечивало существенный прирост микротвердости [25]. Следует отметить, что КВД приводит не только к улучшению прочностных свойств изученных материалов, но также существенно повышает их пластичность, что, вероятно, обусловлено двумя факторами. Прежде всего, формированием благоприятного типа текстуры сплавов. В работе К. Ren и соавт. [26] было показано, что измельчение зерна и формирование благоприятной текстуры в сплаве Zn-1%Cu после равноканального углового прессования приводят не только к росту его прочности, но и к увеличению пластичности с 7,3 до 94,2 %. Другой причиной повышения пластичности изученных нами сплавов может быть дробление хрупкой эвтектической фазы Mg_2Zn_{11} . D. Hernández-Escobar и соавт. [20] наблюдали формирование больших (размером около 500 мкм) хрупких кластеров фазы Mg_2Zn_{11} в литом сплаве Zn-3%Mg. Последующее КВД привело к дроблению фазы с образованием более мелких зон, окруженных твердым раствором на основе цинка. Стоит отметить, что рост пластичности существенно расширяет возможности применения сплавов в ортопедии, позволяя изготавливать изделия различной формы и назначения, например скобы для остеосинтеза при переломе ребер.

В опытах *in vitro*, проведенных нами, было показано, что КВД не оказывало однозначного отрицательного воздействия на биосовместимость и биоактивность изучаемых сплавов на основе цинка и магния. В частности, мы не наблюдали достоверного изменения гемолитической активности у сплавов, различающихся как по химическому составу, так и по методу обработки. При этом цитотоксичность в отношении лейкоцитов крови проявлялась у различных образцов вне прямой зависимости от обработки КВД. Также было показано, что этот метод обработки не изменял интенсивность колонизации ММСК поверхности образцов после его применения в сравнении с образцами в исходном состоянии. Однако после КВД чистого цинка мы наблюдали достоверное угнетение стимуляции поверхностной колонизации клетками образцов, что заставляет ограничить вышеприведенный вывод об индифферентности биологических свойств сплавов на основе системы Zn-x%Mg к обработке КВД. В то же время значимое снижение коррозионной стойкости после КВД наблюдается только для сплава Zn-1,7%Mg, для которого не наблюдается существенного ухудшения биосовместимости *in vitro*. Для чистого цинка наблюдается лишь повышение скорости деградации в пределах погрешности эксперимента. Поэтому снижение способности к колонизации ММСК поверхности образцов чистого цинка после КВД не может быть обусловлено только сни-

жением его коррозионной стойкости, а опосредовано, вероятно, химическим составом продуктов деградации сплава, оказывающим на клетки цитопатогенное воздействие, или характером коррозии образца. Ранее в работе С. García-Minteguí и соавт. было показано, что деградация чистого цинка протекает в целом равномерно по всей поверхности исследуемого образца. В то же время в сплавах Zn-0,5%Mg и Zn-1%Mg наблюдалась локализация процесса деградации по границам зерен α -Zn, то есть в местах локализации фазы, богатой магнием [27]. Исходя из этого, можно сделать вывод, что продукты деградации чистого цинка будут богаты ионами Zn^{2+} , тогда как продукты деградации сплавов Zn-1%Mg и Zn-1,7%Mg должны содержать большое количество ионов Mg^{2+} , что стимулирует процесс поверхностной колонизации образцов. Данный вывод подтверждается исследованием S. Retegi-Carrión и соавт. [28], в котором было показано, что высвобождение ионов Mg^{2+} в процессе деградации биоразлагаемых мембран на основе полимолочной кислоты (PLA), содержащих магний, способствует улучшению пролиферации ММСК и усиливает остеоиндуктивный потенциал. Схожий эффект был продемонстрирован и в работе D. Li и соавт. [29], где было показано, что экстракты чистого магния и сплавов Mg-3%Zn и Mg-2%Zn-1%Mn, содержащие высокую концентрацию ионов Mg^{2+} , оказывают значительный стимулирующий эффект на остеогенную дифференцировку. Исходя из этого, можно предположить, что легирование чистого цинка магнием может способствовать пролиферации ММСК, а также увеличению остеоиндуктивного потенциала. Однако для подтверждения данной гипотезы, а также для установления приемлемой концентрации магния необходимо проведение дополнительных исследований.

Заключение

Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности разработки способов получения биодеградируемых металлоконструкций на основе сплавов системы Zn-x%Mg (где $x = 0; 1$ и $1,7$ %) методом КВД. Обоснованием данного заключения является то, что в исследовании установлено упрочнение сплавов после КВД. Прочность чистого цинка после КВД увеличивается практически в 2 раза, сплава Zn-1%Mg – в 3 раза, а сплава Zn-1,7%Mg – в 5,5 раза. При этом после КВД также наблюдается рост пластичности исследуемых материалов. В то же время коррозионная стойкость, биосовместимость и биоактивные свойства исходных материалов после КВД практически не изменяются. Исключение составляют только рост скорости деградации сплава Zn-1,7%Mg после КВД, небольшое увеличение цитотоксичности сплава Zn-1%Mg и снижение способности ММСК к колонизации поверхности образцов чистого цинка

после КВД. Полученные результаты могут послужить обоснованием выбора сплавов системы Zn-x%Mg после КВД в качестве основы для погружных биодеградируемых имплантатов, металлоконструкций

и фиксаторов, востребованных в том числе в процессе лечения и реабилитации онкологических больных, предполагающем проведение остеореконструктивных операций.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Коротких Н.Г., Степанов И.В., Ларина О.Е. и др. Применение минипластин из титана с покрытием из наноструктурного гидроксиапатита в комплексном лечении переломов нижней челюсти. Вестник новых медицинских технологий 2011;18(2):356–7.
Korotkih N.G., Stepanov I.V., Larina O.E. et al. Application of mini-plates made of titan with nano-structural hydroxiapatite in complex treatment of lower jaw fractures. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii = Journal of New Medical Technologies 2011;18(2):356–7. (In Russ.).
2. Медведев Ю.А., Шаманаева Л.С., Петрук П.С. и др. Применение имплантатов из тканевого никелида титана для реконструкции нижней стенки глазницы. Стоматология 2014;93(3):35–8.
Medvedev Yu.A., Shamanaeva L.S., Petruk P.S. et al. Nickelid titanium mesh for orbital floor reconstruction. Stomatologiya = Stomatology 2014;93(3):35–8. (In Russ.).
3. Xiao F., Zong C., Wang W. et al. Low-temperature fabrication of titania layer on 3D-printed 316L stainless steel for enhancing biocompatibility. Surf Coat Technol 2019;367:91–9. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2019.03.071
4. Pogrel M.A. The concept of stress shielding in nonvascularized bone grafts of the mandible – a review of 2 cases. J Oral Maxillofac Surg 2021;79(1):266.e1–266.e5. DOI: 10.1016/j.joms.2020.09.024
5. Han H.-S., Loffredo S., Jun I. et al. Current status and outlook on the clinical translation of biodegradable metals. Mater Today 2019;23:57–71. DOI: 10.1016/j.mattod.2018.05.018
6. Xia D., Yang F., Zheng Y. et al. Research status of biodegradable metals designed for oral and maxillofacial applications: a review. Bioact Mater 2021;6(11):4186–208. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.01.011
7. Tsakiris V., Tardei C., Clicinschi F.M. Biodegradable Mg alloys for orthopedic implants – a review. J Magnes Alloys 2021;9(6):1884–905. DOI: 10.1016/j.jma.2021.06.024
8. Киселевский М.В., Анисимова Н.Ю., Полоцкий Б.Е. и др. Биоразлагаемые магниевые сплавы – перспективные материалы медицинского назначения (обзор). Современные технологии в медицине 2019;11(3):146–57. DOI: 10.17691/stm2019.11.3.18
Kiselevsky M.V., Anisimova N.Yu., Polotsky B.E. et al. Biodegradable magnesium alloys as promising materials for medical applications (review). Sovremennye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine 2019;11(3):146–57. (In Russ.). DOI: 10.17691/stm2019.11.3.18
9. Hänzi A.C., Gerber I., Schinhammer M. et al. On the *in vitro* and *in vivo* degradation performance and biological response of new biodegradable Mg–Y–Zn alloys. Acta Biomater 2010;6(5):1824–33. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.10.008
10. Anisimova N., Kiselevskiy M., Martynenko N. et al. Anti-tumour activity of Mg-6%Ag and Mg-10%Gd alloys in mice with inoculated melanoma. Mater Sci Eng C 2021;130:112464. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112464
11. Kabir H., Munir K., Wen C., Li Y. Recent research and progress of biodegradable zinc alloys and composites for biomedical applications: biomechanical and biocorrosion perspectives. Bioact Mater 2021;6(3):836–79. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2020.09.013
12. Venezuella J., Dargusch M.S. The influence of alloying and fabrication techniques on the mechanical properties, biodegradability and biocompatibility of zinc: a comprehensive review. Acta Biomater 2019;87:1–40. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.01.035
13. Li G., Yang H., Zheng Y. et al. Challenges in the use of zinc and its alloys as biodegradable metals: perspective from biomechanical compatibility. Acta Biomater 2019;97:23–45. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.07.038
14. Chen Y., Huang P., Chen H. et al. Assessment of the biocompatibility and biological effects of biodegradable pure zinc material in the colorectum. ACS Biomater Sci Eng 2018;4(12):4095–103. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.8b00957
15. Xiao C., Shi X.Y., Yu W.T. et al. *In vivo* biocompatibility evaluation of Zn-0.05Mg-(0, 0.5, 1wt%)Ag implants in New Zealand rabbits. Mater Sci Eng C 2021;119:111435. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111435
16. Xiao C., Wang L., Ren Y. et al. Indirectly extruded biodegradable Zn-0.05wt%Mg alloy with improved strength and ductility: *in vitro* and *in vivo* studies. J Mater Sci Technol 2018;34(9):1618–27. DOI: 10.1016/j.jmst.2018.01.006
17. Shao X., Wang X., Xu F. et al. *In vivo* biocompatibility and degradability of a Zn–Mg–Fe alloy osteosynthesis system. Bioact Mater 2022;7:154–66. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.05.012
18. Bednarczyk W., Kawałko J., Wątroba M. et al. Microstructure and mechanical properties of a Zn-0.5Cu alloy processed by high-pressure torsion. Mater Sci Eng A 2020;776:139047. DOI: 10.1016/j.msea.2020.139047
19. Srinivasarao B., Zhilyaev A.P., Langdon T.G., Pérez-Prado M.T. On the relation between the microstructure and the mechanical behavior of pure Zn processed by high pressure torsion. Mater Sci Eng A 2013;562:196–202. DOI: 10.1016/j.msea.2012.11.027
20. Hernández-Escobar D., Unocic R.R., Kawasaki M., Boehlert C.J. High-pressure torsion processing of Zn–3Mg alloy and its hybrid counterpart: a comparative study. J Alloys Compd 2020;831:154891. DOI: 10.1016/j.jallcom.2020.154891
21. Rybalchenko O.V., Anisimova N.Yu., Kiselevsky M.V. et al. Effect of equal-channel angular pressing on structure and properties of Fe–Mn–C alloys for biomedical applications. Mater Today Commun 2022;30:103048. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2021.103048
22. 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 2021;118:111456. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111456
23. ASTM G1-03-E. Standard practice for preparing, cleaning, and evaluating corrosion test specimens. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2011.
24. Masters E.A., Ricciardi B.F., Bentley K.L.M. et al. Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management. Nat Rev Microbiol 2022;20(7):385–400. DOI: 10.1038/s41579-022-00686-0
25. Bednarczyk W., Kawałko J., Rutkowski B. et al. Abnormal grain growth in a Zn-0.8Ag alloy after processing by high-pressure

- torsion. *Acta Mater* 2021;207:116667. DOI: 10.1016/j.actamat.2021.116667
26. Ren K., Zhang K., Zhang Y. et al. Effect of ECAP temperature on formation of triple heterogeneous microstructure and mechanical properties of Zn–1Cu alloy. *Mater Sci Eng A* 2021;826:141990. DOI: 10.1016/j.msea.2021.141990
27. García-Mintegui C., Córdoba L.C., Buxadera-Palomero J. et al. Zn–Mg and Zn–Cu alloys for stenting applications: from nano-scale mechanical characterization to *in vitro* degradation and biocompatibility. *Bioact Mater* 2021;6(12):4430–46. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.04.015
28. Retegi-Carrión S., Ferrandez-Montero A., Eguiluz A. et al. The effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions loaded at degradable PLA membranes on the proliferation and osteoinduction of MSCs. *Polymers (Basel)* 2022;14(12):2422. DOI: 10.3390/polym14122422
29. Li D., Zhang D. Yuan Q. et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of the effect of biodegradable magnesium alloys on osteogenesis. *Acta Biomater* 2022;141:454–65. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.12.032

Благодарность. Авторы выражают благодарность к.т.н. В.Е. Баженову, к.т.н. А.В. Колтыгину и профессору, д.т.н. В.Д. Белову, а также кафедре литейных технологий и художественной обработки материалов НИТУ «МИСиС» за помощь в выплавке материалов исследования.

Acknowledgment. The authors are grateful to Dr. V.E. Bazhenov, Dr. A.V. Kolytgin and Professor, Dr. V.D. Belov, as well as to Department of Casting Technologies and Artistic Processing of Materials of the National University of Science and Technology "MISIS" for assistance in smelting research materials.

Вклад авторов

Н.С. Мартыненко, Н.Ю. Анисимова: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста статьи;

М.В. Киселевский, С.В. Добаткин: формальный анализ, научное редактирование;

О.В. Рыбальченко: обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных;

Д.Р. Темралиева, Д.В. Просвирнин, С.В. Пивоварчик, Д.В. Филоненко: получение данных для анализа, анализ полученных данных.

Author's contribution

N.S. Martynenko, N.Yu. Anisimova: research design development, review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;

M.V. Kiselevskiy, S.V. Dobatkin: formal analysis and scientific editing;

O.V. Rybalchenko: review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

D.R. Temralieva, D.V. Prosvirnin, S.V. Pivovarchik, D.V. Filonenko: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data.

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>

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

О.В. Рыбальченко / O.V. Rybalchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0403-0800>

Д.Р. Темралиева / D.R. Temralieva: <https://orcid.org/0000-0002-8392-7826>

Д.В. Просвирнин / D.V. Prosvirnin: <https://orcid.org/0000-0001-7155-0294>

С.В. Пивоварчик / S.V. Pivovarchik: <https://orcid.org/0000-0003-1073-5732>

Д.В. Филоненко / D.V. Filonenko: <https://orcid.org/0000-0002-9943-3054>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-23-00097).

Funding. This research was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 22-23-00097).

Статья поступила: 30.07.2022. Принята к публикации: 31.08.2022.

Article submitted: 30.07.2022. Accepted for publication: 31.08.2022.