

ТЕСТИРОВАНИЕ СПЛАВА МЕДИЦИНСКОЙ СТАЛИ НА КУЛЬТУРЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.

Котельников Г.П., Волова Л.Т., Николаенко А.Н., Иванов В.В.,

Болтовская В.В., Долгушкин Д.А., Стройкова А.Д.

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Самарский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Россия, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89*

РЕЗЮМЕ

Ежегодно в России выполняется свыше 100000 операций по эндопротезированию суставов, однако используемая в настоящее время медицинская сталь эндопротезов может оказывать токсическое действие на человека, поэтому мы провели тестирование *in vitro* на мезенхимальных стромальных клетках из костного мозга человека на биосовместимость и цитотоксичность опытных образцов медицинской стали

Объектом исследования служили опытные образцы сплава медицинской стали полученные путем механической обработки на фрезерном станке. В процессе работы проведена комплексная оценка биосовместимости и цитотоксичности предоставленных опытных образцов на мезенхимальных стромальных клетках из костного мозга человека. В исследовании были применены следующие методы: культуральные, флуоресцентная микроскопия с использованием набора флуорофоров LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Life technologies США); биохимический (MTT-тест). Культура мезенхимальных стромальных клеток была получена из костного мозга человека, после подписания информированного добровольного согласия. Результаты проведённого тестирования экспериментальных образцов свидетельствуют об отсутствии цитотоксичности. Большее количество жизнеспособных клеток и равномерно распределенных по поверхности было отмечено на гладкой поверхности. Количество жизнеспособных клеток при MTT-тесте – 90,5%. Исследуемый сплав медицинской стали не является цитотоксичным. Адгезия

клеток напрямую зависит от характера поверхности материала, большая адгезивная активность отмечена на гладких участках, чем на шероховатых. Полученные результаты исследований *in vitro* могут быть использованы для усовершенствования технологии разработки биосовместимых имплантатов с хорошими возможностями для остеоинтеграции.

Ключевые слова: голеностопный сустав, эндопротез, стромальные клетки костного мозга, МТТ-тест

TESTING OF A MEDICAL STEEL ALLOY ON A CULTURE OF HUMAN MESENCHYMAL STROMAL CELLS.

Kotelnikov G.P., Volova L.T., Nikolaenko A.N., Ivanov V.V.,
Boltovskaya V.V., Dolgushkin D.A., Stroikova A.D.

*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Samara
State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Russian Federation, 443099, Samara, Chapayevskaya Str., 89*

ABSTRACT

More than 100,000 joint replacement surgeries are performed annually in Russia, but the medical steel of endoprotheses currently used can have a toxic effect on humans, so we conducted *in vitro* testing on mesenchymal stromal cells from human bone marrow for biocompatibility and cytotoxicity of medical steel prototypes. The object of the study were prototypes of an alloy of medical steel obtained by machining on a milling machine. In the process of work, a comprehensive assessment of the biocompatibility and cytotoxicity of the provided prototypes on mesenchymal stromal cells from human bone marrow was carried out. The following methods were used in the study: culture, fluorescence microscopy using the LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit fluorophores (Life technologies USA); biochemical (MTT-test). The culture of mesenchymal stromal cells was obtained from human bone marrow, after signing an informed voluntary consent. The results of the testing of experimental samples indicate the absence of cytotoxicity. A greater number of

viable cells and evenly distributed over the surface was observed on a smooth surface. The number of viable cells in the MTT test was 90.5%. The investigated alloy of medical steel is not cytotoxic. The adhesion of cells directly depends on the nature of the surface of the material, greater adhesive activity is noted on smooth areas than on rough ones. The obtained results of in vitro studies can be used to improve the technology for the development of biocompatible implants with good opportunities for osseointegration.

Keywords: ankle joint, endoprosthesis, bone marrow stromal cells, MTT-test

Введение.

Ежегодно в России выполняется свыше 100000 операций по эндопротезированию суставов. Более 90% составляют вмешательства на крупных суставах – тазобедренном, коленном, плечевом. Значительно меньшее количество в общую статистику привносит эндопротезирование таких сложноустроенных суставов, как локтевой, голеностопный, лучезапястный, мелкие суставы кисти и стопы [1]. Несомненно, что эндопротезирование на сегодняшний день является основным методом хирургического лечения дегенеративных заболеваний суставов, позволяющий избежать инвалидизации и значительно улучшить качество жизни пациентов различных возрастных категорий. Однако, несмотря на очевидные успехи в хирургии тазобедренного и коленного суставов, наглядно подтверждённые статистическими ежегодными сводками российского и мирового масштабов, отмечается значительное отставание в результатах эндопротезирования голеностопного сустава [2]. Это связано в первую очередь с его уникальными анатомо-биомеханическими свойствами: являясь по своей структуре блоковидным, голеностопный сустав обладает одной степенью свободы движений, при этом небольшая амплитуда его движений сочетается с колоссальной осевой нагрузкой и постоянными кратковременными волнами высокой кинетической энергии, возникающих при ходьбе, беге и прыжках [3]. Кажется абсолютно немыслимым, что все эти нагрузки, вся энергия и масса человеческого тела приходится на таранную

кость, являющейся опорной площадкой как для голеностопного сустава, так и для всего организма в целом [4]. Исходя из сложности анатомии, биомеханики, а также высоких требований, предъявляемых к голеностопному суставу, вопросы его эндопротезирования являются животрепещущими как в среде клиницистов, так и в сообществах инженеров-конструкторов: продолжается поиск технических и материаловедческих решений для создания оптимальной конструкции эндопротеза голеностопного сустава. Ассортимент нозологий, поражающих голеностопный сустав, требующих хирургического лечения, довольно велик: более 50% патологии занимают остеоартриты различной этиологии; до 25% - последствия травматических повреждений области голеностопного сустава и стопы; гнойно-септические поражения костей, туберкулёз, опухолевые поражения составляют меньшую, но не менее значимую группу заболеваний. В связи с этим нозологическим разнообразием медицинскому сообществу требуется прийти к унификации процесса лечения, но не в ущерб стабильности и долговечности имплантата.

Одним из самых распространённых материалов для изготовления эндопротезов, в том числе голеностопных, является сплав кобальта, хрома и молибдена. Сплавы CoCrMo состоят из 58,9–69,5% Co, 27,0–30% Cr, 5,0–7,0% Mo и небольшого количества других элементов (Mn, Si, Ni, Fe и C). Эти металлические сплавы можно разделить на 2 категории: высокоуглеродистые сплавы (содержание углерода $> 0,20\%$) и низкоуглеродистые сплавы (содержание углерода $< 0,08\%$). Кроме того, металлические сплавы можно производить с использованием 2 различных технологий, таких как литье и ковка; размер зерна ковкого сплава обычно составляет менее 10 мкм, тогда как размер зерна литого материала составляет от 30 до 1000 мкм. Кобальт и хром присутствуют в окружающей среде и в продуктах питания. Они необходимы человеку в качестве микроэлементов в организме, но в высокой концентрации токсичны. У пациентов с парами Co-Cr металл-металл, подвергающимися износу с выделением кобальта и хрома в синовиальную жидкость, могут

возникать повышенные уровни циркулирующих ионов Со и Сг, мигрировавших в кровь [5].

Цель исследования - определение безопасности и цитотоксичности опытных образцов медицинской стали на мезенхимальных стромальных клетках из костного мозга человека *in vitro*.

В рамках поставленной цели решались следующие задачи:

- провести комплексную оценку жизнеспособности мезенхимальных стромальных клетках (МСК) костного мозга человека на поверхности экспериментальных образцов металлической медицинской стали с помощью флуоресцентных красителей Live-Dead с использованием люминесцентной микроскопии.

- провести исследование на МСК костного мозга предоставленных образцов на цитотоксичность при помощи биохимического метода колориметрическим тестом для оценки метаболической активности клеток на основе восстановительной способности ферментов (МТТ-тест).

Материалы и методы.

Тестируемые образцы были предоставлены на исследование в лабораторию культур клеток биотехнологического центра «БиоТех» в двойных стерильных пакетах. Металлические образцы были предоставлены в виде дисков диаметром 5 мм сплава металлов кобальт-хром- вольфрам полученные из цельно плавленого листа путем механической обработки на фрезерном станке. При осмотре образцов – диски правильной цилиндрической формы, толщиной 2мм, поверхность матовая, белого цвета, рисунок 1.



Рисунок 1. Внешний вид образцов медицинской стали.

В тестировании образцов была использована первичная культура МСК человека, полученная из костного мозга. Исследование проведено согласно межгосударственному стандарту ГОСТ ISO 10993-5-2011, ГОСТ ISO10993-12-2015.

В исследовании были применены следующие методы: МТТ-тест, флуоресцентная микроскопия с использованием набора Live-Dead

Ход и метод эксперимента

В Самарском государственном медицинском университете, в лаборатории культур клеток биотехнологического центра, оснащенной комплексом «чистых помещений» класса Б с возможностью создания зон класса А в соответствии со стандартом ISO 5, был проведен наш эксперимент. Благодаря современному оборудованию и описанным характеристикам лаборатории все исследования на культурах клеток были выполнены в стерильных условиях.

Оборудование, реактивы и материалы, использованные при выполнении исследования:

- Ламинарный бокс БАВп-01 «Ламинар-С» (ЗАО «Ламинарные системы», Миасс, РФ) второго класса биологической защиты;
- Рефрижераторная центрифуга Eppendorf 5702R (Германия)
- CO₂-инкубатор MCO-18AC (Sanyo – Incubator, MCO-18 A, Япония);
- Система визуализации – аппаратно-программный комплекс (АПК) на основе инвертированного микроскопа Olympus IX 83 с флуоресцентным модулем, фазовым контрастом, с цветной цифровой CCD камерой DP74 SC100 («Olympus», Япония), стационарного компьютера, с программным обеспечением CellSens Dimensions V2 («Olympus», Япония)
- Автоматический цифровой счётчик клеток Scepter™ (Merck Millipore, Германия)
- Микропланшетный спектрофотометр Multiskan SkyHigh (ThermoFisher scientific, США)

Реактивы и расходные материалы, которые были использованы в культуральных работах соответствовали квалификации «для культур клеток»:

- культуральные флаконы 25см² и 75 см² («TPP», Швейцария); чашки Петри диаметром 3,5 см («Orange Scientific», Бельгия); 48-луночные планшеты («TPP», Швейцария); пипетки 2 мл, 5 мл, 10 мл, стерильные («Orange Scientific», Бельгия); центрифужные пробирки 15 мл, 50 мл стерильные («Jet BioFil», Китай); наконечники для дозаторов, Top-Line®, 100-1000мкл, без фильтра, DNase-RNase-Free, стерильные, («Orange Scientific», Бельгия); наконечники для дозаторов желтые 5-200 мкл («Thermo Fisher Scientific», Россия);

Реактивы для выращивания клеток производства ООО «Биолот» Россия:

- сыворотка крови плодов коровы жидкая, стерильная;
- среда питательная: α -МЕМ с L- глутамином, жидкая, стерильная;
- раствор Хенкса без фенолового красного стерильный;
- Версена раствор 0,02%, стерильный;
- Трипсина раствор 0,25%, стерильный;
- Трипанового синего 4% раствор.

Для визуализации адгезированных на поверхности образцов клеток, для проведения исследования на инвертированном микроскопе с флуоресцентным блоком был использован набор флуорофоров LIVE/DEAD TM Cell-Mediated Cytotoxicity Kit (Invitrogen, USA);

Для проведения МТТ- теста использовался: 3-(4,5-dimethyl -2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide.

Флуоресцентная микроскопии с использованием набора Live-Dead

Для выявления живых и поврежденных клеток на поверхности исследуемых образцов использовали флуоресцирующие красители (набор Live-Dead TM Cell-Mediated Cytotoxicity Kit) по протоколу производителя [6]. В отличие от химических красителей флуоресцентные белки, модифицированные для локализации в определенных структурах клетки, не оказывают каких-либо значимых эффектов на их функционирование и не обладают цитотоксичностью, поэтому являются витальными красителями. Данный набор содержит растворы кальцеина-АМ и этидий гомодимера-1 и нужен для одновременного флуоресцентного окрашивания живых и мертвых клеток. Кальцеин-АМ окрашивает только жизнеспособные клетки. Альтернативно, окрашивающий ядра краситель этидий гомодимер-1 не проходит через жизнеспособную клеточную мембрану, а проникает через мертвую клеточную мембрану и достигает ядра, встраивается в двойную спираль ДНК клетки, при этом излучается красная флуоресценция (λ_{ex} 535 нм, λ_{em} 617 нм). Зеленым цветом светятся живые клетки, а в мертвых визуализируется ярко- красное ядро.

В лунки 48- луночного планшета вносили опытные образцы в количестве 4 шт.

Лунки были разделены на опытные и контрольные.

После этого, на поверхность опытных образцов высевали клетки в дозе 2×10^4 на образец. На поверхность контрольных образцов клетки не были заселены. Затем в лунки с образцами осторожно заливали полную ростовую среду. Для оценки состояния культуры клетки были заселены в лунки в той же дозе, то есть 2×10^4 . Планшет помещали в CO₂ – инкубатор. Длительность

эксперимента– 5 суток. Ежедневно при помощи инвертированного микроскопа велось наблюдение за контрольными и опытными лунками.

В конце эксперимента опытные и контрольные образцы извлекали из лунок и проводили пробоподготовку по протоколу производителя. Трижды промывали образцы от культуральной среды, поверхность обрабатывали флуоресцентным красителем и проводили исследования на инвертированном микроскопе с флуоресцентным блоком.

МТТ-тест.

Данный метод является показателем жизнеспособности клеток. При помощи данного метода по интенсивности накопления кристаллов формазана в цитоплазме можно судить об уровне митохондриального дыхания клетки. Количество образуемого в клеточной массе формазана прямо пропорционально количеству живых клеток. Интенсивность окрашивания количественно определяли при помощи спектрофотометра. Число живых и поврежденных клеток оценивали в процентах по отношению к контрольным образцам [7-10].

При проведении МТТ - теста были применены экстракты из предоставленных образцов, согласно ГОСТу ISO10993-12-2015 [2], которые исключили дополнительную травматизацию клеток в монослое.

Экстракты из предоставленных образцов были приготовлены согласно приведенной таблице 1.

Таблица 1.

**Стандартные площади поверхности и объемы экстрагирующей
жидкости**

Толщина, мм	Соотношение при экстракции (площадь поверхности или масса/объем) $\pm 10\%$	Пример материалов
<0,5	6 см /мл	Пленка, листы и стенки трубок
От 0,5 до 1,0	3 см /мл	Стенки трубок, пластины, небольшие литые изделия
>1,0	3 см /мл	Крупные литые изделия
<0,5	6 см /мл	Пленка, листы и стенки трубок
От 0,5 до 1,0	3 см /мл	Стенки трубок, пластины, небольшие литые изделия
>1,0	3 см /мл	Крупные литые изделия
>1,0	1,25 см /мл	Эластомерные покрытия
Цельные изделия неправильной формы	0,2 г образца/мл	Порошок, гранулы, пена, литые изделия/не абсорбенты
Пористые изделия неправильной формы (материалы низкой плотности)	0,1 г/мл	Мембраны, ткань

Для приготовления экстрактов образцы переносили в стерильную культуральную емкость, затем в нее добавляли 10% культуральную среду,

объем которой рассчитывали согласно таблице 1. Экстракцию осуществляли при 37°C в CO₂ инкубаторе в течение 48 часов.

Параллельно проводили посев МСК в 48- луночный планшет в опытные (5 лунок) и контрольные лунки (3 лунки). Клетки снимали со дна культурального флакона обычным способом и засевали в опытные лунки в посевной дозе 2×10^4 клеток/см². Через 24 часа проводили полную смену среды в опытных лунках на новую, содержащую полученный экстракт. В контрольные лунки с клетками – вносили полную ростовую среду. Длительность исследования составляла 48 часов с момента внесения экстрактов.

Из каждой лунки отбирали ростовую среду, затем вносили 100 мкл раствора тетразолиевого красителя, перемешивали осторожными круговыми движениями и помещали планшет в термостат на 4 часа при 37°C. По окончании инкубации среду из каждой лунки осторожно удаляли при помощи пипетки. В каждую лунку планшета добавляли 250 мкл диметилсульфоксида, вновь перемешивали круговыми движениями и оставляли планшет на 5 минут при комнатной температуре до полного растворения формазана. В лунки вносили раствор диметилсульфоксида, затем отбирали из каждой лунки по 200 мкл полученного раствора. Измеряли экстинкцию при 540 нм на микропланшетном спектрофотометре. Рассчитывали процентное содержание живых клеток в лунке с исследуемыми образцами. Полученные данные подвергали статистической обработке в программе SigmaPlot 12.0 (Systat Software, США) с использованием критерия нормальности распределения Шапиро-Уилка и t-критерия. Результат выражали в виде средней арифметической и ошибки средней арифметической. Статистически значимыми считали различия при вероятности ошибки первого рода менее 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Перед проведением МТТ – теста, клетки в лунках были осмотрены при помощи инвертированного микроскопа.

МСК в контрольных лунках сформировали равномерный монослой, рисунок 2. При осмотре опытных лунок с внесенным экстрактом из образца состояние клеток не отличалось от контрольной культуры, рисунок 3. Результаты МТТ-теста приведены в таблице 2.

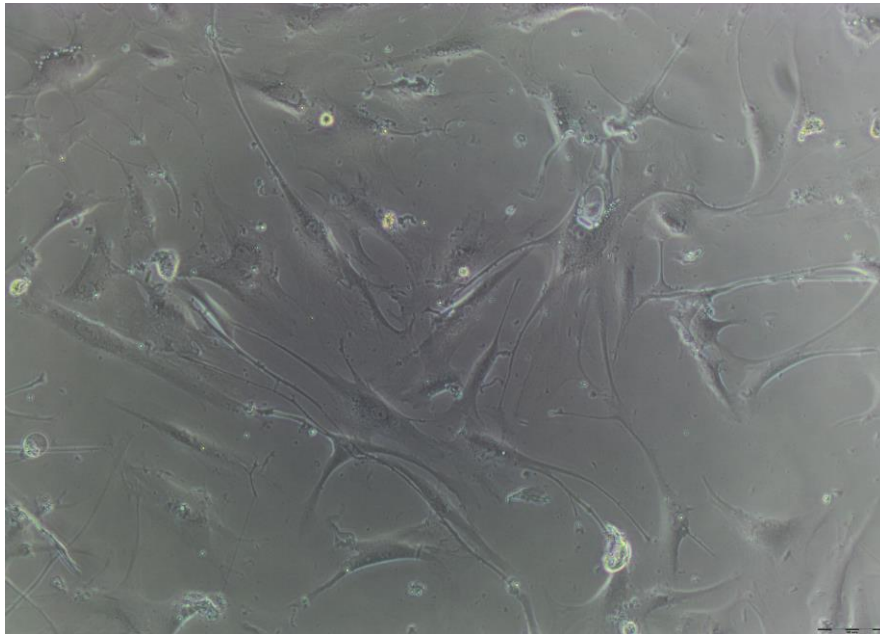


Рисунок 2. 48 часов эксперимента мезенхимальных стромальных клеток из костного мозга человека: контрольная культура. Инвертированный микроскоп, фазовый контраст. Увеличение 100

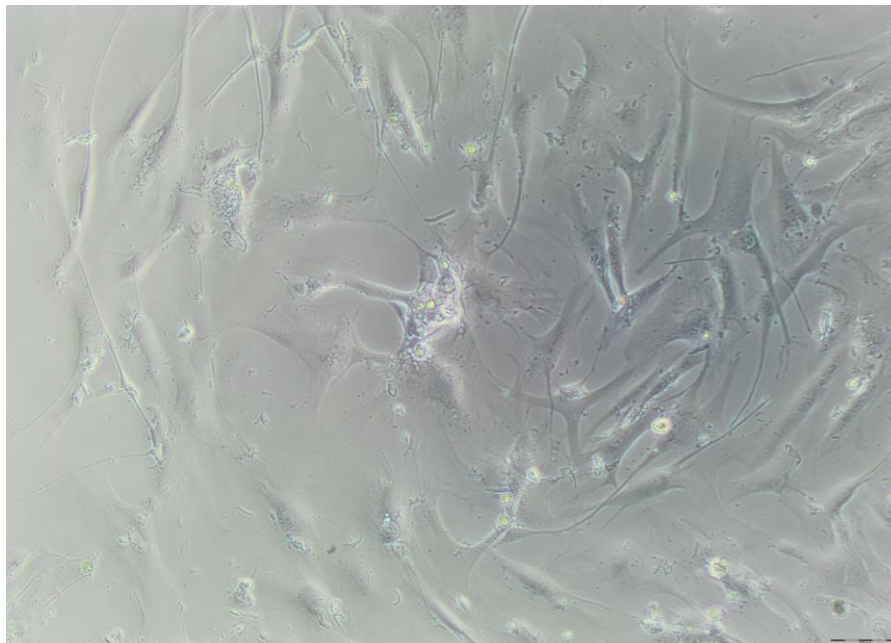


Рисунок 3. 48 часов эксперимента мезенхимальных стромальных клеток из костного мозга человека: мезенхимальные стромальные клетки с экстрактом из

образца металлической медицинской стали. Инвертированный микроскоп,
фазовый контраст. Увеличение 100

Таблица 2.

Результаты МТТ –теста

Показатели	среда +экстракт	Опыт (клетки+ экстракт)	Клетки (Контроль)	Фон (бланк дмсо)
Оптическая плотность:	0,078	0,762	0,805	0,0495
Среднее М	0,003	0,024	0,036	0,0008
Ошибка средней, m		90,5%	100%	
% содержания живых клеток				
	4	5	3	3
Количество лунок, n				

$p=0,332$

Нет отличий в жизнеспособности клеток между контролем (клетки) и опытом (клетки+экстракт), $p=0,332$, несмотря на снижение показателя на 9,5%

Исследование образцов при помощи флуоресцентного набора Live-Dead

При исследовании клеток на жизнеспособность с применением флуоресцентного набора Live-Dead можно отметить, что клетки МСК в контрольных лунках имели зеленое окрашивание, что соответствовало о жизнеспособности клеток. Визуализировались единичные поврежденные клетки с ярко-красным ядром, что характерно для данной культуры, рисунок 4.

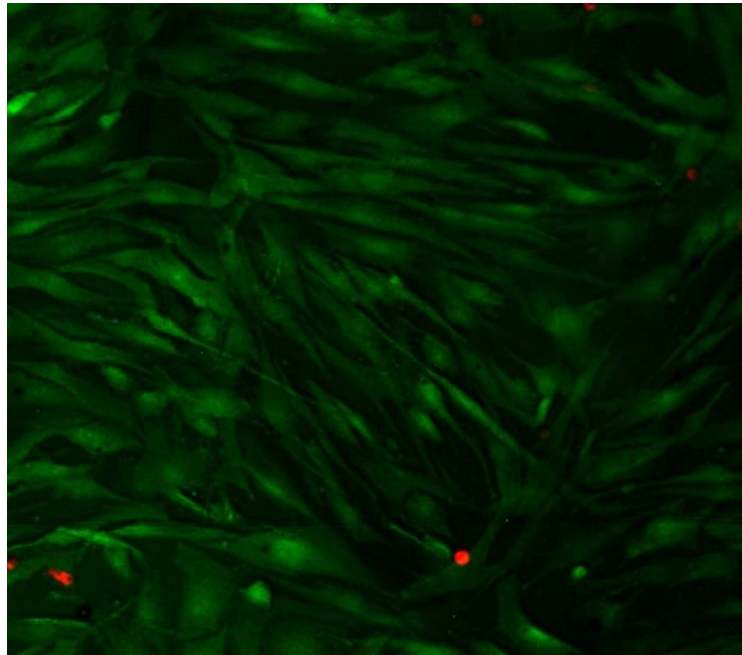


Рисунок 4. 5-е сутки эксперимента. Мезенхимальные стромальные клетки в контрольной лунке. Окраска флуоресцентным набором Live-Dead Инвертированный микроскоп с флуоресцентным блоком. Увеличение 100

При осмотре поверхности контрольного образца металлической медицинской стали можно выявить на ней царапины, которые образовались в процессе обработки, рисунок 5, а черный фон исключает наличие артефактов в процессе окраски, рисунок 6.

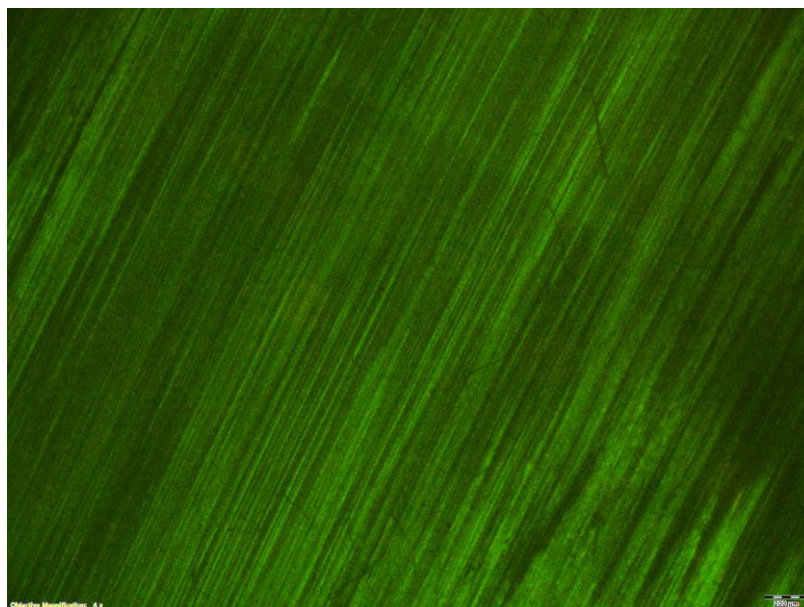


Рисунок 5. 5-е сутки эксперимента. Поверхность образца металлической медицинской стали. Окраска флуоресцентным набором Live-Dead Инвертированный микроскоп с флуоресцентным блоком. Увеличение x100



Рисунок 6. 5-е сутки эксперимента. Поверхность образца металлической медицинской стали. Окраска флуоресцентным набором Live-Dead Инвертированный микроскоп с флуоресцентным блоком. Увеличение x100

При осмотре поверхности опытного образца с заселенными клетками можно отметить, что клетки неравномерно распределены по поверхности образца, рисунок 7. Было отмечено, что на гладких участках клеток было больше, чем на шероховатой. Клетки по форме в опыте не отличались от контроля на пластике. Клетки плотно прилегали друг к другу и соединялись между собой при помощи отростков. Поврежденных клеток, с ярко-красными ядрами не было выявлено, рисунок 8.

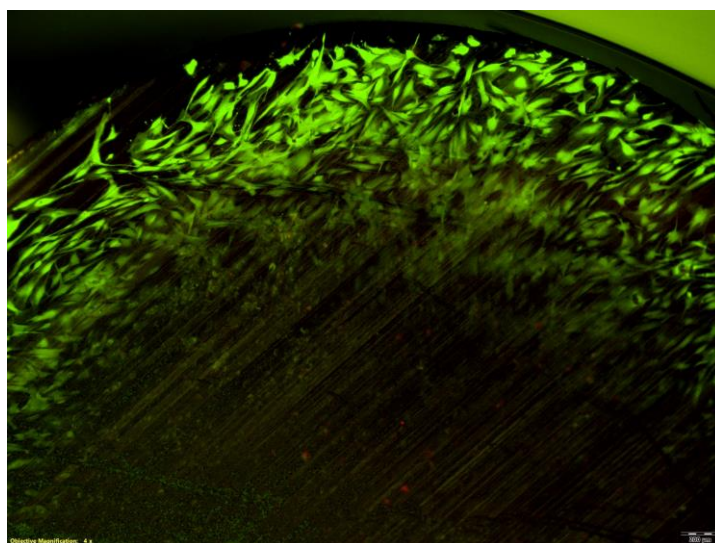


Рисунок 7. 5-е сутки эксперимента. Поверхность образца металлической медицинской стали с заселенными клетками: увеличение 40. Окраска

флуоресцентным набором Live-Dead Инвертированный микроскоп с флуоресцентным блоком

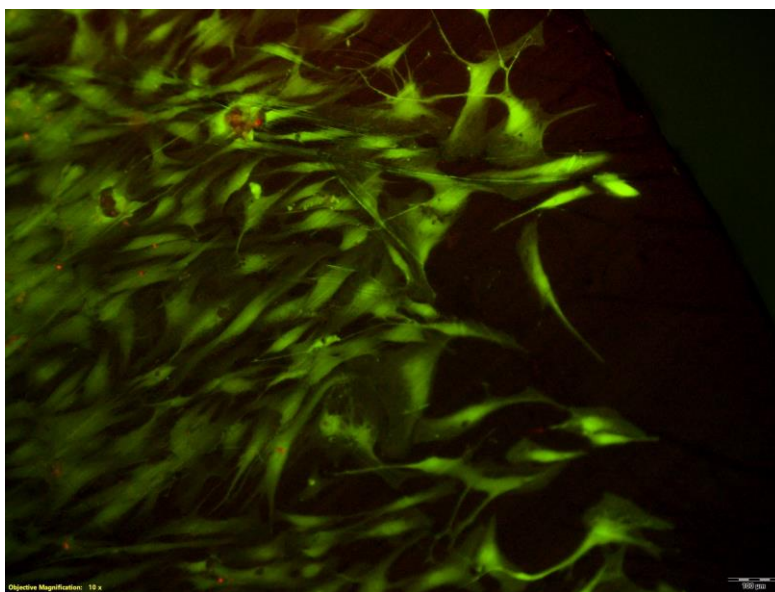


Рисунок 8. 5-е сутки эксперимента. Поверхность образца металлической медицинской стали с заселенными клетками: увеличение 100. Окраска флуоресцентным набором Live-Dead Инвертированный микроскоп с флуоресцентным блоком.

Результаты проведённого тестирования экспериментальных образцов свидетельствуют об отсутствии цитотоксичности. Большее количество жизнеспособных клеток и равномерно распределенных по поверхности было отмечено на гладкой поверхности. Количество жизнеспособных клеток при МТТ-тесте – 90,5%.

Полученные результаты исследований *in vitro* могут быть использованы для усовершенствования технологии разработки биосовместимых имплантатов с хорошими возможностями для остеоинтеграции. Для оценки безопасности и эффективности созданных металлических изделий необходимо провести доклинические исследования на организменном уровне *in vivo*.

Перспективы исследования. Разработка может быть в дальнейшем коммерциализована и применена в производстве изделий медицинского назначения для реконструктивной и регенеративной медицине, челюстно-

лицевой хирургии, стоматологии, травматологии и ортопедии. Для дальнейшего исследования необходимо провести эксперименты *in vivo*.

Заключение

Исследуемый сплав медицинской стали не является цитотоксичным. Адгезия клеток напрямую зависит от характера поверхности материала, большая адгезивная активность отмечена на гладких участках, чем на шероховатых.

Список литературы

1. Капанджи А.И. *Нижняя конечность. Функциональная анатомия*. М.: Эксмо; 2010.
2. Saltzman CL, Salamon ML, Blanchard GM, et al. Epidemiology of ankle arthritis: report of a consecutive series of 639 patients from a tertiary orthopaedic center. *Iowa Orthop J*. 2005;25:44-46.
3. Brockett CL, Chapman GJ. Biomechanics of the ankle. *Orthop Trauma*. 2016;30(3):232-238. doi:10.1016/j.mporth.2016.04.015
4. Горбатов Р.О., Горин В.В., Павлов Д.В., Малышев Е.Е. Концепция современного артродезирования голеностопного сустава при посттравматическом крузартрозе III–IV стадии. *Современные технологии в медицине*. 2016; 8(8): 64-74.
5. Некишева А.А., Абдулазизов Б.Д.У., Пешеходько Д.И. Обзор материалов для изготовления эндопротезов тазобедренного сустава. *Медицина. Социология. Философия. Прикладные исследования*. 2020; 6: 48-54.
6. Афанасьев А.Н., Сапарова В.Б. Выбор оптимального метода детекции жизнеспособности клеточных культур на пролиферативную активность и цитотоксичность. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2021; 2: 16-24.

7. Аникина Л.В., Пухов С.А., Дубровская Е.С., Афанасьева С.В., Ключков С.Г. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и резазурина. *Фундаментальные исследования*. 2014; 12: 1423-1427.

8. Черепович В.С., Волочник Е.В., Антоненко Е.В., Лоткова Е.С., Романовская Т.В., Гринев В.В. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности. *Белорусский Медицинский журнал*. 2006; 2 (16): 106-108.

9. Wang S, Yu H, Wickliffe JK. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicol In Vitro*. 2011;25(8):2147-2151. doi:10.1016/j.tiv.2011.07.007

10. Leardini, A., O'Connor, J. J., & Giannini, S. MTT Cell Proliferation Assay Instruction Guide ATCC 30-1010K. 2020.

References

1. Kapanji A.I. *Lower limb. Functional anatomy*. M., Eksmo; 2010 (in Russian).

2. Saltzman CL, Salamon ML, Blanchard GM, et al. Epidemiology of ankle arthritis: report of a consecutive series of 639 patients from a tertiary orthopaedic center. *Iowa Orthop J*. 2005;25:44-46.

3. Brockett CL, Chapman GJ. Biomechanics of the ankle. *Orthop Trauma*. 2016;30(3):232-238. doi:10.1016/j.mporth.2016.04.015

4. Gorbatov R.O., Gorin V.V., Pavlov D.V., Malyshev E.E. The concept of modern arthrodesis of the ankle joint in post-traumatic crusarthrosis stage III-IV. *Sovremennye tehnologii v medicine - Modern technologies in medicine*. 2016; 8(8): 64-74 (in Russian).

5. Nekisheva A.A., Abdulazizov B.D.U., Peshekhodko D.I. Review of materials for the manufacture of hip endoprotheses. *Medicina. Sociologija*.

Filosofija. Prikladnye issledovanija - Medicine. Sociology. Philosophy. Applied research. 2020; (6): 48-54 (in Russian).

6. Afanasiev A.N., Saparova V.B. Choice of the optimal method for detecting the viability of cell cultures for proliferative activity and cytotoxicity. *Laboratornye zhivotnye dlja nauchnyh issledovanij - Laboratory animals for scientific research.* 2021; (2): 6-24 (in Russian).

7. Anikina L.V., Pukhov S.A., Dubrovskaya E.S., Afanas'eva S.V., Klochkov S.G. Comparative determination of cell viability using MTT and resazurin. *Fundamental'nye issledovanija - Fundamental research.* 2014; (12): 1423-1427 (in Russian).

8. Cherepovich V.S., Volochnik E.V., Antonenko E.V., Lotkova E.S., Romanovskaya T.V., Grinev V.V. Optimization of critical parameters of the MTT test to assess cellular and drug cytotoxicity. *Belorusskij Medicinskij zhurnal - Belarusian Medical Journal.* 2006; 2 (16): 106-108 (in Russian).

9. Wang S, Yu H, Wickliffe JK. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicol In Vitro.* 2011;25(8):2147-2151. doi:10.1016/j.tiv.2011.07.007

10. Leardini, A., O'Connor, J. J., & Giannini, S. MTT Cell Proliferation Assay Instruction Guide ATCC 30-1010K. 2020.