

УДК 669.721.5:621.7.044, P.A.C.S. 62.20.-x

Biocompatibility and cytotoxicity in vitro of the alloy Mg-1.03%Zn-0.66%Ca strengthened by rotary swaging

Биосовместимость и цитотоксичность in vitro сплава Mg-1,03%Zn-0,66%Ca, упрочненного ротационной ковкой

*N. S. Martynenko*¹, *N. Yu. Anisimova*², *M. V. Kiselevskiy*³, *N. Yu. Tabachkova*⁴,
*D. R. Temralieva*⁵, *D. V. Prosvirnin*⁶, *A. V. Koltygin*⁷, *V. D. Belov*⁸,
*M. M. Morozov*⁹, *V. S. Yusupov*¹⁰, *S. V. Dobatkin*¹¹, *Yu. Z. Estrin*¹²

*Н. С. Мартыненко*¹, *Н. Ю. Анисимова*², *М. В. Киселевский*³, *Н. Ю. Табачкова*⁴,
*Д. Р. Темраниева*⁵, *Д. В. Просвирнин*⁶, *А. В. Колтыгин*⁷, *В. Д. Белов*⁸,
*М. М. Морозов*⁹, *В. С. Юсупов*¹⁰, *С. В. Добаткин*¹¹, *Ю. З. Эстрин*¹²

^{1, 5, 6, 9, 10, 11} A. A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science of the RAS, Leninsky Pr. 49, Moscow, 119334, Russia

^{2, 3, 4, 5, 7, 8, 11} National University of Science and Technology «MISIS», Leninsky Pr. 4, Moscow, 119049, Russia

^{2, 3} «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoye Highway 23, Moscow, 115478, Russia

⁴ A. M. Prokhorov General Physics Institute of the RAS, Vavilov Str. 38, Moscow, 119991, Russia

¹² Monash University, VIC 3800, Clayton, Melbourne, Australia

¹² The University of Western Australia, WA 6009, Crawley, Perth, Australia

¹ nataliasmartynenko@gmail.com

^{1, 5, 6, 9, 10, 11} Институт металлургии и материаловедения им. А. А. Байкова РАН, Россия, 119334, Москва, Ленинский пр., 49

^{2, 3, 4, 5, 7, 8, 11} Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Россия, 119049, Москва, Ленинский пр., 4

^{2, 3} «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России, Россия, Москва, 115478, Каширское шоссе, 23

⁴ Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН, Россия, Москва, 119991, ул. Вавилова, 38

¹² Университет им. Монаша, Австралия, Мельбурн, Клейтон, VIC 3800

¹² Университет Западной Австралии, Австралия, Перт, Кроули, WA 6009

¹ nataliasmartynenko@gmail.com

ABSTRACT

It was shown that rotary forging (RF) of the Mg-1.03%Zn-0.66%Ca alloy leads to a decrease in the average grain size to $4.5\pm 1.2\ \mu\text{m}$ and the precipitation of Mg_2Ca particles with a size of $\sim 300\ \text{nm}$ and $\text{Mg}_6\text{Zn}_3\text{Ca}_2$ particles with a size of $\sim 100\ \text{nm}$. The formation of such a microstructure led to a pronounced hardening (the ultimate strength increased to $276\pm 6\ \text{MPa}$) without a significant decrease in ductility. In addition, RF led to an increase in the fatigue limit of the alloy from 120 to 135 MPa and did not worsen its resistance to chemical corrosion. In vitro studies have shown that the alloy induces hemolysis without suppressing the viability of leukocytes and has a more pronounced cytotoxic effect on tumor cells as compared to untransformed MMSCs. There was no significant difference in the latter effect between the initial and deformed states.

KEYWORDS

Magnesium alloys; rotary forging; mechanical characteristics; degradation; in vitro biocompatibility; in vitro cytotoxicity.

АННОТАЦИЯ

Было показано, что ротационная ковка (РК) сплава Mg-1,03%Zn-0,66%Ca приводит к уменьшению среднего размера зерна до $4,5 \pm 1,2$ мкм и выпадению частиц Mg₂Ca размером ~300 нм и частиц Mg₂Zn₃Ca₂ размером ~100 нм. Формирование такой микроструктуры привело к выраженному упрочнению (предел прочности увеличился до 276 ± 6 МПа) без существенного снижения пластичности. Кроме того, РК привела к увеличению предела усталости сплава со 120 до 135 МПа и не ухудшила его стойкости к химической коррозии. Исследования *in vitro* показали, что сплав вызывает гемолиз, не подавляя жизнеспособность лейкоцитов, и оказывает более выраженное цитотоксическое воздействие на опухолевые клетки по сравнению с нетрансформированными мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК). Существенной разницы последнего эффекта между исходным и деформированным состоянием не наблюдалось.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Магниевого сплавы; ротационная ковка; механические характеристики; деградация; биосовместимость *in vitro*; цитотоксичность *in vitro*.

Введение

Сплавы системы Mg-Zn-Ca являются одними из наиболее перспективных магниевых сплавов медицинского назначения, благодаря хорошей биосовместимости магния и легирующих элементов [1–3]. Наряду с хорошей биосовместимостью, легирование Zn и Ca обеспечивает сплавам данной системы приемлемую скорость деградации, позволяющую использовать их для создания биорезорбируемых имплантатов. Однако, из-за малого количества легирующих элементов, прочность медицинских магниевых сплавов системы Mg-Zn-Ca находится на достаточно низком уровне. Поэтому упрочнение таких сплавов (при этом без потери их коррозионной стойкости) является приоритетной задачей. Проведенные ранее исследования показали, что перспективным методом упрочнения магниевых сплавов без потери коррозионной стойкости является ротационная ковка (РК) [4, 5]. Ротационная ковка – это промышленно применимый деформационный метод, позволяющий измельчать микроструктуру магниевых сплавов вплоть до ультрамелкозернистого (УМЗ) состояния [5–7]. Преимуществами данного метода деформации являются его относительно малая себестоимость, малые потери металла при обработке и простота наладки оборудования. Кроме того, РК позволяет получать длинномерные заготовки различного диаметра, что упрощает получение конечного изделия. Поэтому целью данного исследования было изучение влияния РК на структуру, механические свойства, усталост-

ную прочность и скорость деградации сплава Mg-1,03%Zn-0,66%Ca, перспективного для использования в медицине. Дополнительно была исследована биосовместимость сплава *in vitro*, а также его цитотоксичность по отношению к мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам (ММСК) и опухолевым клеткам линии K562 *in vitro*. Последний аспект важен с учетом потенциального использования сплава в ортопедических имплантатах, особенно для замещения костной ткани, пораженной остеосаркомой после резекции.

1. Материалы и методы

В качестве материала исследования в настоящей работе был использован сплав Mg-1,03%Zn-0,66%Ca. В исходном состоянии сплав гомогенизировали при температуре 450 °С в течение 5 часов (охлаждение в воде). РК проводили на ротационно-ковочной машине РКМ 2129.02 (подробнее см. [6]) в несколько проходов со ступенчатым снижением температуры обработки от 400 °С до 300 °С (шаг 50 °С). Суммарная логарифмическая степень деформации составила 2,77 ($\epsilon = \ln(A_0/A_f)$, где A_0 и A_f – начальная и конечная площади поперечного сечения заготовок соответственно). Микроструктуру исследовали с помощью оптического микроскопа Axio Observer D1m Carl Zeiss в продольном сечении образцов. Микроструктуру сплава после РК изучали методом просвечивающей электронной микроскопии с использованием микроскопа JEOL JEM 2010 (Jeol, Токио, Япония), оснащенного анализатором энергодисперсионной

рентгеновской спектроскопии (EDS). Механические свойства оценивали с помощью испытательной машины Instron 3382 на плоских образцах с поперечным сечением 2×1 мм и рабочей длиной 5,75 мм. Испытания на усталость проводились по схеме циклического растяжения на установке ElectroPuls™ E3000 (частота испытаний 30 Гц, коэффициент напряжений $R = 0,1$) на плоских образцах с поперечным сечением 1×1 мм и длиной 5,75 мм. Исследования скорости деградации проводили при 37°C в сыворотке крови крупного рогатого скота (FBS) в течение 1, 3 и 14 дней. Удаление продуктов коррозии, а также расчет скорости деградации проводили в соответствии со стандартом ASTM_G1-03-E.

Для оценки гемосовместимости исследовали жизнеспособность клеток и коэффициент гемолиза. Подробности методики можно найти в [8]. Для исследования специфической цитотоксичности образцы инкубировали с опухолевыми клетками (4×10^4 клеток/мл) и нетрансформированными клетками ($4,6 \times 10^4$ клеток/мл) в питательной среде в 24-луночных культуральных планшетах в течение 2 дней в атмосфере 5% CO_2 при 37°C . В качестве модели опухолевых клеток использовали клетки K562 (из коллекции НИИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина, Россия). ММСК третьего пассажа, полученные из костного мозга собаки, использовали в качестве модельных нетрансформированных клеток (см. подробности в [8]). Все исследования и манипуляции с животными проводились в соответствии с регламентом Локальной этической комиссии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

2. Результаты и их обсуждения

На рис. 1 представлены результаты исследования микроструктуры сплава Mg-1,03%Zn-0,66%Ca в исходном состоянии и после РК при 300°C . В исходном состоянии структура сплава состоит из равноосных зерен со средним размером $54,1 \pm 2,5$ мкм. После

РК в продольном сечении прутка наблюдалась частично рекристаллизованная микроструктура со средним размером зерна $4,5 \pm 1,2$ мкм. При этом исследование микроструктуры сплава методом ПЭМ выявило наличие частиц двух типов в сплаве после РК. Частицы первого типа сформировались преимущественно на границах зерен. Средний размер этих частиц составляет ~ 300 нм. Частицы второго типа в основном располагаются в теле зерна, и их средний размер составляет ~ 100 нм. Основываясь на предыдущих результатах EDS, а также на литературных данных, частицы были идентифицированы как соединения Mg_2Ca и $\text{Mg}_6\text{Zn}_3\text{Ca}_2$ соответственно [9, 10]. Однако, следует отметить, что объемная доля обеих частиц настолько мала, что их невозможно обнаружить методом рентгеноструктурного анализа.

Измельчение зерна после РК привело к значительному упрочнению сплава. Условный предел текучести после РК увеличился со 121 ± 8 МПа до 210 ± 8 МПа, а предел прочности вырос с 217 ± 3 МПа до 276 ± 6 МПа (табл. 1). При этом формирование однородной, частично рекристаллизованной структуры, несмотря на уменьшение зерна более чем в 10 раз, не уменьшило пластичности сплава при растяжении. Повышение прочности сопровождалось умеренным снижением относительного удлинения с $22,0 \pm 1,8\%$ в исходном состоянии до $18,3 \pm 2,9\%$ после РК (что укладывается в ошибку эксперимента). Кроме того, измельчение зерна привело к увеличению предела усталости, измеренного на базе 10^7 циклов нагружения, который вырос со 120 МПа в первоначальном состоянии до 135 МПа после РК. Следует также отметить, что усталостное разрушение образцов в обоих микроструктурных состояниях происходило в основном в области малоциклового усталости (до 10^5 циклов нагрузки). Данное наблюдение позволяет предположить, что основная часть усталостного ресурса до разрушения связана со стадией возникновения усталостной трещины.

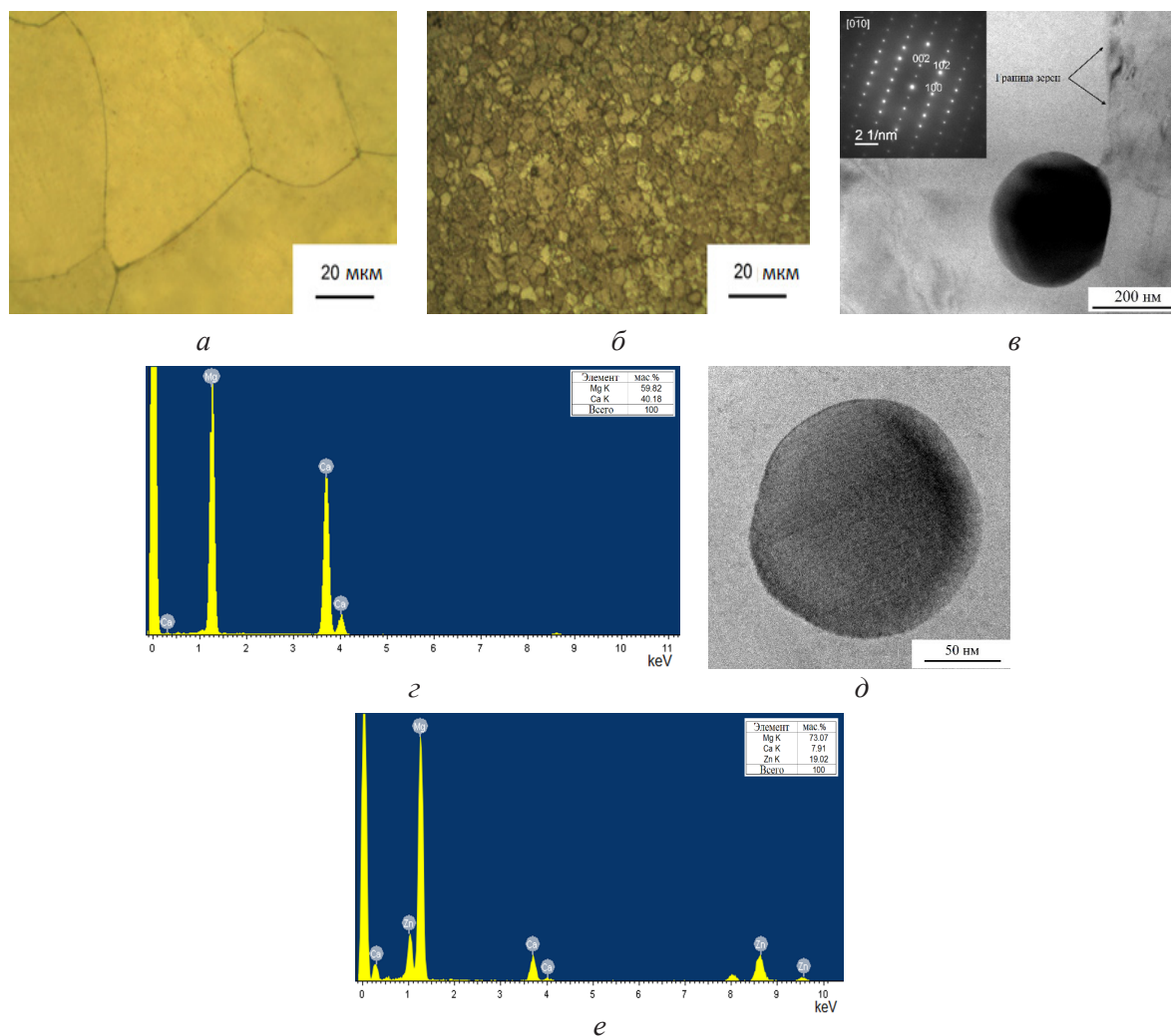


Рис. 1. Структура сплава в исходном состоянии (*a*) и после РК при 300 °C (*б*), частица Mg_2Ca с соответствующей дифракцией во вставке (*в*), EDS для частицы Mg_2Ca (*з*), частица $Mg_6Zn_3Ca_2$ (*д*), EDS для частицы $Mg_6Zn_3Ca_2$ (*е*)

Fig. 1. Structure of the alloy in the initial state (*a*) and after RF at 300 °C (*b*), Mg_2Ca particle with the corresponding diffraction in the insert (*c*), EDS for Mg_2Ca particle (*d*), $Mg_6Zn_3Ca_2$ particle (*e*), EDS for $Mg_6Zn_3Ca_2$ particle (*f*)

Таблица 1
Table 1

Механические характеристики (предел прочности (σ_B), условный предел текучести ($\sigma_{0,2}$), удлинение (δ) и предел усталости (σ_R)) сплава в исходном состоянии и после РК
Mechanical characteristics (ultimate strength (σ_B), conditional yield strength ($\sigma_{0,2}$), elongation (δ) and fatigue strength (σ_R)) of the alloy in the original state and after RF

Состояние	σ_B , МПа	$\sigma_{0,2}$, МПа	δ , %	σ_R , МПа
Исходное	217±3	121±8	22,0±1,8	120
РК при 300 °C	276±6	210±8	18,3±2,9	135

Проведенное исследование показало, что формирование частично рекристаллизованной структуры после РК не ухудшает коррозионную стойкость сплава после 1, 3 и 14 дней в FBS (табл. 2). Увеличение времени инкубации также не влияет на скорость разложения. Скорость деградации сплава составила: $0,22 \pm 0,01$ мм/год и $0,28 \pm 0,01$ мм/год после 1 дня инкубации, $0,22 \pm 0,07$ мм/год и $0,22 \pm 0,01$ мм/год после 3 дней инкубации и $0,29 \pm 0,09$ мм/год и $0,44 \pm 0,09$ мм/год после 14 дней инкубации для исходного и деформированного сплава соответственно.

Исследование гемосовместимости показало, что инкубация сплава в исходном

состоянии и после РК с эритроцитами вызывало гемолиз, уровень которого соответствовал $8 \pm 2\%$ и $8 \pm 4\%$ через 2 часа, $12 \pm 2\%$ и $13 \pm 3\%$ через 4 часа, и $46 \pm 1\%$ и $43 \pm 10\%$ через 24 часа соответственно. Анализ цитотоксичности показал, что инкубация со сплавом в обоих состояниях не привела к значительному снижению жизнеспособности лейкоцитов по сравнению с контролем ($98 \pm 4\%$ и $91 \pm 3\%$ для исходного и кованого состояний соответственно). Сравнительный статистический анализ результатов не выявил какой-либо существенной разницы между уровнями цитотоксической активности сплава в двух микроструктурных состояниях (рис. 2).

Таблица 2
Table 2

Скорость деградации сплава Mg-1,03%Zn-0,66%Ca до и после РК (300 °C) в FBS

The rate of degradation of the Mg-1.03%Zn-0.66%Ca alloy before and after RF (300 °C) in FBS

Состояние	Скорость деградации, мм/год		
	1 день	3 дня	14 дней
Исходное	$0,22 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,07$	$0,29 \pm 0,09$
РК при 300 °C	$0,28 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,09$

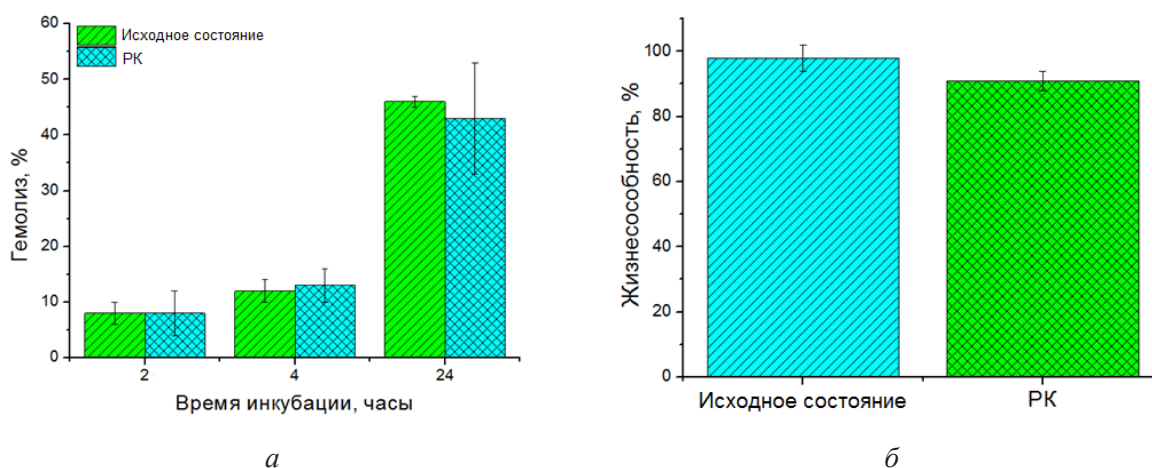


Рис. 2. Биосовместимость *in vitro* сплава Mg-1,03%Zn-0,66%Ca до и после РК

Fig. 2. Biocompatibility *in vitro* of the Mg-1.03%Zn-0.66%Ca alloy before and after RK

Инкубация сплава в исходном состоянии и после РК с опухолевыми клетками в течение 3 суток увеличивала концентрацию мертвых клеток по сравнению с контролем, тогда как изменение этого параметра для культуры ММСК не могло быть установлено с достаточной статистической достоверностью. Совместная инкубация со сплавом также приводила к увеличению концентрации клеток с признаками апоптоза, что было заметно более выраженным в культуре опухолевых клеток по сравнению с эффектом воздействия сплава на ММСК. Не было обнаружено значительных различий в реакции клеток на сплав в исходном состоянии и после РК (рис. 3).

То есть, исследование показало, что сплав в обоих состояниях индуцировал гемолиз, не подавляя жизнеспособность лейкоцитов. Сплав продемонстрировал специфическую цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток *in vitro*. Инкубация опухолевых клеток со сплавом вызвала заметное увеличение количества мертвых и апоп-

тотических опухолевых клеток линии K562 по сравнению с нетрансформированными ММСК. Не было заметной разницы между цитотоксичностью образцов в гомогенизированном исходном состоянии и образцов, обработанных RS.

Выводы

1. РК приводит к измельчению микроstructures более чем в 10 раз до $4,5 \pm 1,2$ мкм. Кроме того, после РК при 300°C были обнаружены частицы фаз Mg_2Ca и $\text{Mg}_6\text{Zn}_3\text{Ca}_2$, объемная доля которых невелика.

2. Измельчение микроstructures приводит к росту прочности сплава (σ_B вырос с 217 ± 3 до 276 ± 6 МПа) без существенного падения пластичности. При этом предел усталости сплава вырос со 120 до 135 МПа.

3. РК не ухудшает коррозионную стойкость сплава.

4. Было показано, что сплав $\text{Mg-1,03\%Zn-0,66\%Ca}$ в обоих состояниях индуцировал гемолиз, не подавляя жизнеспособность лейкоцитов.

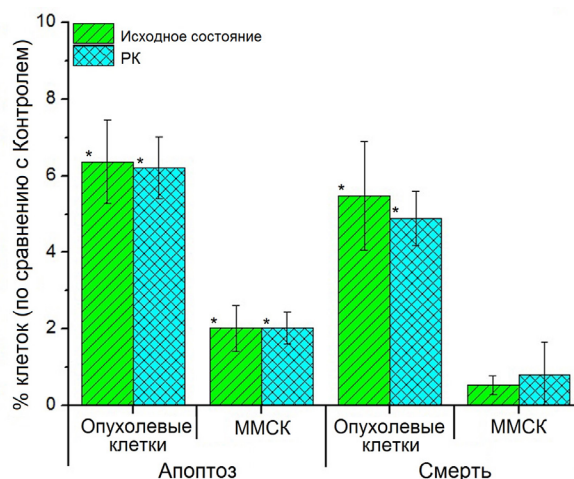


Рис. 3. Противоопухолевая цитотоксическая активность сплава до и после РК по сравнению с действием на нетрансформированные ММСК. На диаграммах представлено изменение количества апоптотических клеток (клетки Annexin V(+)) и мертвых клеток в культурах опухолевых клеток K562 и ММСК (* $p < 0,05$)

Fig. 3. Antitumor cytotoxic activity of the alloy before and after PK in comparison with the effect on nontransformed MMSC. The diagrams show the change in the number of apoptotic cells (Annexin V (+) cells) and dead cells in K562 and MMSC tumor cell cultures (* $p < 0.05$)

5. Показано, что сплав Mg-1,03%Zn-0,66%Ca оказывает цитотоксическое действие на линию опухолевых клеток K562, стимулируя апоптоз и гибель клеток. Интересно отметить, что данный эффект был более выражен для опухолевых клеток, чем для нетрансформированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания № 075-00328-21-00.

Список литературы

1. The functional properties of Mg-Zn-X biodegradable magnesium alloys / D. Merson et al. // *Materials*. 2020. V. 13, No. 3. Article number 544. DOI: 10.3390/ma13030544.

2. The role of zinc in the biocorrosion behavior of resorbable Mg-Zn-Ca alloys / M. Cihova et al. // *Acta Biomaterialia*. 2019. V. 100. P. 398–414. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.09.021.

3. In vitro and in vivo biocompatibility of Mg-Zn-Ca alloy operative clip / P. Ding et al. // *Bioact. Mater.* 2019. V. 4. P. 236–244. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2019.07.002.

4. Effect of microstructure on the corrosion resistance of the AE42 magnesium alloy processed by rotary swaging / P. Minárik et al. // *Acta Phys. Pol. A*. 2015. V. 128, No. 4. P. 805–807. DOI: 10.12693/APhysPolA.128.805.

5. Improving the property profile of a bioresorbable Mg-Y-Nd-Zr alloy by deformation treatments / N. Martynenko et al. // *Materialia*. 2020. V. 13. Article number 100841. DOI: 10.1016/j.mtla.2020.100841.

6. Effect of rotary swaging on microstructure, texture, and mechanical properties of a Mg-Al-Zn alloy / Y. Estrin et al. // *Adv. Eng. Mater.* 2020. V. 22, No. 1. Article number 1900506. DOI: 10.1002/adem.201900506.

7. Effects of Nd and rotary forging on mechanical properties of AZ71 Mg alloys / J. Chen et al. // *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*. 2015. V. 25, Iss. 10. P. 3223–3231. DOI: 10.1016/S1003-6326(15)63955-3.

8. The influence of ultrafine grained structure on the mechanical properties and biocompatibility of austenitic stainless steels / O. V. Rybalchenko et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2020. V. 108, No. 4. P. 1460–1468. DOI: 10.1002/jbm.b.34494.

9. Effect of secondary phase particles on the tensile behavior of Mg-Zn-Ca alloy / S. M. Baek et al. // *Mater. Sci. Eng.: A*. 2018. V. 735. P. 288–294. DOI: 10.1016/j.msea.2018.08.050.

10. Abdel-Gawad S. A., Shoeib M. A. Corrosion studies and microstructure of Mg-Zn-Ca alloys for biomedical applications // *Surfaces and Interfaces*. 2019. V. 14. P. 108–116. DOI: 10.1016/j.surfin.2018.11.011.