

Исследование цитотоксического эффекта магниевых сплавов на клеточные культуры

Для корреспонденции:

Андрей Александрович Бойков,
fimarik@gmail.com

Поступила в редакцию 7 июня 2019 г.
Исправлена 28 октября 2019 г.
Принята к печати 6 ноября 2019 г.

Цитировать:

Фролова Т.С., Бойков А.А.,
Таркова А.Р., Орищенко К.Е.,
Прохорихин А.А., Малаев Д.У., Синицина О.И.,
Байструков В.И., Кретов Е.И., Прямов М.В.,
Мерсон Д.Л., Виноградов А.Ю. Оценка
эффективности спинальной нейростиму-
ляции у больных критической ишемией
нижних конечностей с помощью
опросника WIQ.

Патология кровообращения

и кардиохирургия. 2019;23(3):22-29.

[http://dx.doi.](http://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2019-3-22-29)

[org/10.21688/1681-3472-2019-3-22-29](http://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2019-3-22-29)

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии
конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке
Министерства науки РФ в рамках
проекта RFMEFI58317X0070.

ORCID ID

А.А. Бойков, <https://orcid.org/0000-0002-3129-5572>

А.Р. Таркова, <https://orcid.org/0000-0002-4291-6047>

А.А. Прохорихин, <https://orcid.org/0000-0002-3247-8290>

Д.У. Малаев, <https://orcid.org/0000-0001-6032-788X>

В.И. Байструков, <https://orcid.org/0000-0003-2883-6574>

Д.Л. Мерсон, <https://orcid.org/0000-0001-5006-4115>

А.Ю. Виноградов, <https://orcid.org/0000-0001-9585-2801>

© Т.С. Фролова, А.А. Бойков, А.Р. Таркова,
К.Е. Орищенко, А.А. Прохорихин,
Д.У. Малаев, О.И. Синицина,
В.И. Байструков, Е.И. Кретов, М.В. Прямов,
Д.Л. Мерсон, А.Ю. Виноградов, 2019.

Статья открытого доступа,
распространяется по лицензии
[Creative Commons Attribution 4.0.](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Т.С. Фролова^{1,4}, А.А. Бойков², А.Р. Таркова², К.Е. Орищенко¹,
А.А. Прохорихин², Д.У. Малаев², О.И. Синицина^{1,4},
В.И. Байструков², Е.И. Кретов², М.В. Прямов²,
Д.Л. Мерсон³, А.Ю. Виноградов³

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский
исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохра-
нения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

³ Тольяттинский государственный университет, Тольятти, Российская Федерация

⁴ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Российская Федерация

Актуальность. Имплантация металлического стента всегда сопровождается риском возникновения неблагоприятных событий, таких как долгосрочная дисфункция эндотелия, постоянное физическое раздражение стенки сосуда, хронические локальные воспалительные реакции, высокий риск тромбообразования и прочее. В связи с этим актуальна разработка биodeградируемых стентов, которые будут обеспечивать необходимую поддержку на период заживления стенки сосуда и полностью резорбироваться без негативного влияния. С этой точки зрения магниевые сплавы являются самыми подходящими ввиду относительно низкой коррозионной стойкости и высокой биосовместимости.

Цель. Исследовать цитотоксическую активность различных сплавов на основе магния в условиях *in vitro*.

Методы. Для исследования методом деформационных термообработок получены 7 образцов магниевых сплавов с различным пределом текучести: 1 — MgZnZr (ZK60) 310 МПа, 2 — MgZnCa (ZX10) 60 МПа, 3 — MgZnCa (ZX40) 130 МПа, 4 — MgYZn (WZ31) 300 МПа, 5 — MgYZn (WZ31) 275 Мпа, 6 — MgYZn (WZ20) 340 МПа, 7 — MgZnZr (ZK60) 180 МПа. Данные образцы предварительно инкубировались в культуральной среде для получения экстракта, который в дальнейшем тестировался на immortalized фибробластах человека. Для исследования цитотоксической активности экстрактов применялись следующие методы: микротетразолиевый тест, проточная цитофлуориметрия, световая микроскопия, измерение pH экстрактов.

Результаты. По итогам микротетразолиевого теста экстракт образца 7 проявил выраженную цитотоксичность: средняя выживаемость клеток $48,2 \pm 1,0\%$, слабый цитотоксический эффект проявил экстракт образца 5 — $81,4 \pm 14,0\%$. Микроскопический анализ показал меньшую плотность клеток в поле зрения для образцов 5 и 7. Проточная цитофлуориметрия выявила значительное увеличение некротических клеток для образца 7 (8,25%), для образцов 1 и 5 отмечено небольшое усиление некроза клеток (3,449 и 3,626% соответственно). Наиболее высокие показатели pH среды отмечены для образцов 5 и 7 (pH = 8,5).

Выводы. Результаты тестов *in vitro* на цитотоксичность доказывают, что состав магниевое сплава и тип деформационной термомеханической обработки напрямую влияют на величину клеточного некроза, морфологию клеток и pH среды.

Ключевые слова: биodeградируемый стент; биосовместимость; артерии нижних конечностей; ишемическая болезнь сердца; магниевый сплав; эндоваскулярная хирургия

Введение

В последнее время наблюдается значительный рост применения и активное внедрение биорезорбируемых и биосовместимых материалов в медицине [1–3]. Говоря об успешности развития эндоваскулярных методов лечения ишемической болезни сердца, его врожденных пороков, а также атеросклеротических поражений периферических артерий, следует отметить, что разработка и производство различных биорезорбируемых имплантатов являются одним из перспективных и активно развивающихся направлений. В качестве основы для изготовления данных изделий используют различные сплавы коррозионно-стойких металлов: нитинол, нержавеющую сталь, кобальт-хром. Однако постоянное присутствие металлического каркаса в сердечно-сосудистой системе человека имеет недостатки, которые ограничивают более широкое использование. К таковым относятся: долгосрочная дисфункция эндотелия, задержка повторной эндотелизации, высокий риск тромбообразования, постоянное физическое раздражение стенки сосуда, хронические локальные воспалительные реакции, неспособность адаптироваться к росту у молодых пациентов и невозможность повторного хирургического вмешательства [4–8]. Если учесть, что основной эффект имплантации данных металлических устройств обеспечивается за счет эффекта каркаса, а ремоделирование и заживление участка, подверженного стентированию, происходит в течение 6–12 мес., то дальнейшее присутствие металлического устройства по истечении этого времени не дает никаких полезных эффектов [9]. Таким образом, разработка биорезорбируемых имплантатов, которые обеспечивают необходимую поддержку на период заживления сосудистой стенки и полностью резорбируются без побочных эффектов для организма, имеет большие перспективы и может стать четвертой революцией в эндоваскулярной хирургии.

При анализе мировой литературы установлено, что биорезорбируемый сердечно-сосудистый имплантат должен соответствовать следующим характеристикам: биосовместимость продуктов биодеградации, оптимальное время полной резорбции, достаточная радиальная жесткость на период полной неоэндотелизации [10]. С данной точки зрения магний — наиболее подходящий металл ввиду приемлемых параметров коррозионной стойкости и биосовместимости как его самого, так и продуктов его дегра-

дации [11, 12]. Более того, для замедления скорости деградации и повышения прочности магний может быть легирован одним или несколькими элементами (редкоземельными металлами, цинком и др.) [13]. В настоящее время имеется большое количество различных сплавов на основе магния, а их состав чаще всего разрабатывают в зависимости от конкретной области применения. Требование биосовместимости резко сужает диапазон допустимых легирующих элементов, что исключает из составов биодеградируемых материалов таких металлов, как алюминий, никель и так далее. С учетом роста многообразия магниевых сплавов очевидно, что поиск наиболее оптимального состава продолжается наряду с недостаточной изученностью процессов их биосовместимости, биодеградации и резорбции.

Всестороннее исследование вышеупомянутых процессов позволит существенно продвинуться в данном направлении и создать биорезорбируемый сердечно-сосудистый имплантат на основе магниевых сплавов с оптимальными характеристиками, полностью отвечающими современным требованиям медицинских изделий. В настоящей статье представлены результаты исследований цитотоксической активности различных сплавов на основе магния в условиях *in vitro*.

Методы

Образцы сплавов на основе магния предоставлены ФГБОУ ВО «Тольяттинский государственный университет» совместно с ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России для исследования цитотоксической активности. Условные обозначения, спецификация образцов и краткие сведения о видах применяемых деформационных обработок с указанием температурных режимов приведены в табл. 1. Для испытаний выбраны сплавы из трех систем легирования: Mg-Zn-Zr (ZK60), Mg-Zn-Ca (ZX10, ZX40) и Mg-Y-Zn (WZ20, WZ31). Все исследуемые сплавы относятся к категории биосовместимых и рассматриваются в качестве кандидатов для производства соответствующих имплантатов. Микроструктурой и механическими свойствами этих сплавов можно управлять в широких пределах путем деформационных термообработок. Для примера в табл. 1 приведены значения условного предела текучести на растяжение. Как можно видеть, данный параметр существенно отличается для выбранных

Таблица 1 Состав и методы получения испытанных образцов биodeградируемых магниевых сплавов

№	Тип	Состав (масс. %)	Обработка/Температура	Предел текучести, МПа
1	MgZnZr (ZK60)	Mg-6Zn-0,5Zr	Э+РКУП/350 °С	310
2	MgZnCa (ZX10)	Mg-0.9Zn-0,1Ca	Э/325 °С, 5:1	60
3	MgZnCa (ZX40)	Mg-4Zn-0,15Ca	РКУП/415 °С	130
4	MgYZn (WZ31)	Mg-1Zn-2,9Y	РКУП/500 °С + РК 25 °С	300
5	MgYZn (WZ31)	Mg-1Zn-2,9Y	РКУП/425 °С	275
6	MgYZn (WZ20)	Mg-0,75Zn-2Y	Э/350 °С, 5:1	340
7	MgZnZr (ZK60)	Mg-6Zn-0,5Zr	ВИК 300 °С	180

Примечание. ВИК — всесторонняя изотремическая ковка; Э — экструзия; РКУП — равноканальное угловое прессование; РК — ротационная ковка

сплавов. Подробно режимы обработки и получающиеся микроstructures будут описаны в специально посвященной публикации. Краткую информацию об использованных технологиях можно найти в указанных статьях [14–17].

Для исследования цитотоксических свойств сплавов использованы следующие методы: микротетразолиевый (МТТ) тест — оценка общей токсичности сплавов; проточная цитофлуориметрия — определение наличия цитостатических свойств; световая микроскопия — оценка изменения морфологии клеток; измерение pH экстрактов — оценка влияния магния в составе сплава на кислотность среды. Все образцы предварительно инкубировались в культуральной среде для получения экстракта, который в дальнейшем тестировался на иммортализованных фибробластах человека.

Иммортализованные фибробласты человека (ATCC number CRL-4058), использованные в качестве клеточной линии, культивировались в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей

сыворотки (Gibco) без антибиотика в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С и влажности 80%.

Получение экстрактов из сплавов. Для исследования цитотоксической активности сплавов получены экстракты из предоставленных образцов, согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011. Образцы помещались в лунки 6-луночного планшета с культуральной средой. При получении экстрактов сделана поправка на разную площадь поверхности. Минимальный объем среды, необходимый для экспериментов и использованный для наименьшего образца, составлял 3 мл. Для остальных объем среды рассчитывался пропорционально площади поверхности образца (табл. 2) [18]. Образцы инкубировались при 37 °С в течение 24 ч на орбитальном шейкере OS-20 (Biosan) с частотой 80 оборотов в минуту.

Спустя 24 ч инкубации полученные экстракты инкубировали с клетками в МТТ-тесте (1 мл) и 6-луночных планшетах (2 мл), которые использовали для микроскопии и проточной цитофлуориметрии.

Таблица 2 Расчет объема среды для получения экстрактов из образцов в зависимости от площади поверхности

Образец	a, мм	b, мм	c, мм	S, мм ²	V, мл
1	20,0	9,9	1,75	500,65	9,26
2	10,85	5,3	1,8	173,15	3,20
3	10,85	19,45	1,8	531,15	9,82
4	20,1	11	1,7	547,94	10,13
5	20,1	11	1,65	544,83	10,07
6	10,95	5,12	1,56	162,27	3,0
7	14,73	9,81	1,82	378,33	6,99

МТТ-тест выполнялся по стандартной методике [19]. В 96-луночный планшет раскапывали по 100 мкл суспензии клеток (плотность 3×10^4 кл/мл). Клетки инкубировали в термостате в течение 24 ч для прикрепления. Затем среду заменяли на экстракт из сплавов. Для учета концентрационной зависимости экстракта были сделаны разведения в 2, 4, 6, 8 и 10 раз. Для каждого образца выполнено по 3 повторности. В качестве отрицательного контроля использована культуральная среда, в качестве положительного – цитотоксический агент доксорубин. Спустя 24 часа инкубации к клеткам раскапывали краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (Sigma) по 10 мкл в лунку (концентрация красителя 3 мг/мл PBS). Через 2 ч среду отбирали, а образовавшийся формазан растворяли в 100 мкл изопропанола (Sigma). Измерение проводили с помощью планшетного спектрофотометра MultiScan FC (ThermoFischer Scientific) на длине волны 620 нм. Итоговые результаты представлены в виде средней выживаемости клеток в % по результатам 3 измерений \pm SEM.

Микроскопический анализ. Выполнялся на прижизненных образцах клеток. Для этого клетки высаживали в лунки 6-луночного планшета (по 10 тыс. клеток в лунку) и инкубировали в термостате в течение 24 ч для прикрепления. Затем среду заменяли на экстракт из сплавов (по 2 мл в лунку). Клетки инкубировали в течение 24 ч, затем проводили микроскопический анализ с помощью инвертированного микроскопа AxioVert Observer.Z1 (Carl Zeiss). Фотографии получены с помощью программного обеспечения Zen 2 (Carl Zeiss). В качестве отри-

цательного контроля использовали культуральную среду, в качестве положительного – цитостатик митомин.

Проточная цитофлуориметрия. Выполнялась с помощью прибора AttuneNxT (ThermoFischer Scientific). После микроскопического анализа клетки из лунок снимали с помощью трипсина и дважды отмывали PBS по 1 мл. После второй отмывки клетки суспензировали в 1 мл PBS, окрашивали йодидом пропидия (ThermoFischer Scientific) и далее анализировали с помощью цитофлуориметра. Конечный результат представлен в виде соотношения живых и мертвых клеток при анализе не менее 60000 клеток.

pH среды. Измерения проводились в Институте неорганической химии СО РАН с использованием прибора SevenCompact pH/Ion S220 (Mettler Toledo).

Результаты

МТТ-тест выполнен для оценки общей цитотоксичности полученных экстрактов на иммортализованных фибробластах. Итоги представлены в виде средней выживаемости клеток в % по результатам трех измерений \pm SEM в табл. 3.

Микроскопический анализ проведен для исследования изменений морфологии клеток после 24 ч инкубации с экстрактами (рис. 1).

Проточная цитофлуориметрия выполнялась для уточнения механизма токсичности экстрактов (цитостатичность/цитотоксичность) с окрашиванием клеток йодидом пропидия. В случае цитостатического механизма доля мертвых клеток в популяции

Таблица 3 Оценка выживаемости иммортализованных человеческих фибробластов после инкубации с экстрактами в течение 24 ч

Разведение экстракта, кратность	Образец						
	1	2	3	4	5	6	7
0	90,2 \pm 10	95,4 \pm 7	96,3 \pm 3	107,8 \pm 6	81,4 \pm 14	100,8 \pm 13	48,2 \pm 1
2	99,0 \pm 5	97,6 \pm 8	93,3 \pm 9	105,3 \pm 8	87,9 \pm 10	95,2 \pm 2	84,5 \pm 3
4	107,7 \pm 13	99,1 \pm 6	93,3 \pm 4	100,1 \pm 8	91,3 \pm 1	102,0 \pm 1	90,2 \pm 7
6	93,9 \pm 2	94,5 \pm 3	93,0 \pm 2	112,0 \pm 13	91,6 \pm 14	96,0 \pm 4	100,8 \pm 5
8	95,7 \pm 15	96,9 \pm 6	92,9 \pm 1	113,1 \pm 19	97,4 \pm 5	103,4 \pm 9	95,3 \pm 1
10	96,4 \pm 12	97,8 \pm 5	103,2 \pm 2	98,7 \pm 9	97,2 \pm 15	98,3 \pm 6	96,5 \pm 5

Примечание. Положительный контроль — доксорубин 5 мкМ, выживаемость $33,6 \pm 2\%$; отрицательный контроль — культуральная среда без антибиотика, выживаемость 100%

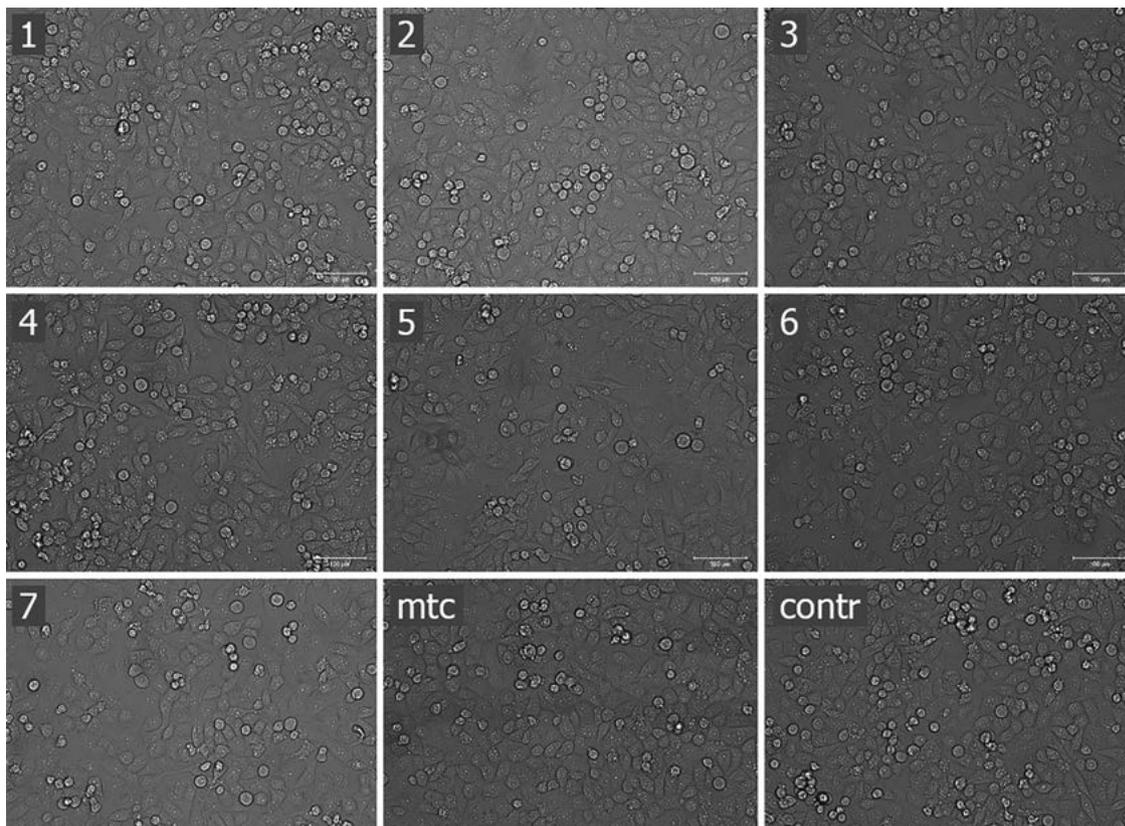


Рис. 1. Микроскопический анализ клеток после 24 ч инкубации: 1–7 — с экстрактами сплавов, mtc — положительный контроль (цитостатик митомицин), contr — отрицательный контроль (клетки с культуральной средой)

не увеличится, в случае усиления некроза должен наблюдаться существенный прирост процента мертвых клеток (окрашенных йодидом пропидия). Результаты представлены в виде доли некротических клеток в популяции при анализе не менее 60 тыс. клеток ниже и рис. 2.

Образец	Некроз, % клеток
контроль	0,491
митомицин	1,026
1	3,449
2	1,917
3	2,001
4	0,838
5	3,626
6	1,056
7	8,25

pH среды. Так как сплавы, содержащие магний, при взаимодействии с водой могут образовывать гидроксид и защелачивать среду, проведено измерение pH после инкубации экстрактов с клетками, результаты которого представлены ниже.

Образец	pH
контроль	7,77
1	8,06
2	8,17
3	8,11
4	8,07
5	8,25
6	8,15
7	8,25
7	8,25

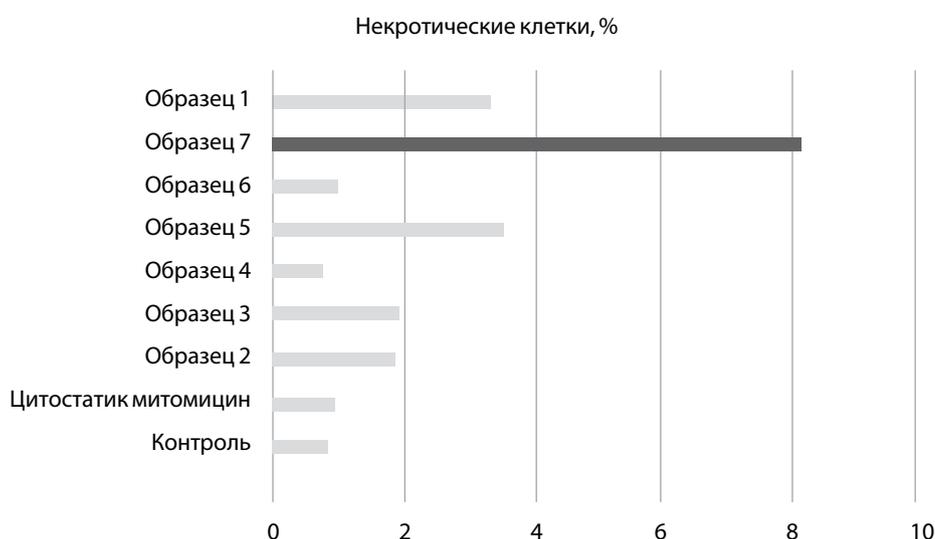


Рис. 2. Доля некротических клеток в популяции иммortalизованных человеческих фибробластов после инкубации с экстрактами (окрашивание йодидом пропидия, анализ не менее 60 тыс. клеток)

Обсуждение

Исследование посвящено оценке цитотоксичности семи магниевых сплавов, отличающихся между собой составом примесей и системой легирования. Наряду с изучением токсичности, мы исследовали и другие параметры, необходимые для оценки перспективности полученных сплавов для использования в сердечно-сосудистой хирургии: изменение морфологии клеток, степень их некротизации, изменение pH среды. Для этого из предоставленных магниевых сплавов мы получили экстракты с применением культуральной среды, которые использовали для оценки цитотоксичности. По итогам МТТ-теста показано, что экстракт образца 7 проявлял выраженную цитотоксичность, однако при разведении средой его негативное воздействие на клетки нивелировалось. Слабый токсический эффект проявился для образца 5. Образец 1 не проявил достоверной цитотоксичности, хотя тренд на негативный эффект можно отметить. Таким образом, из семи образцов выявлен лишь один относительно токсичный сплав, механизм действия которого проявился в увеличении доли некротических клеток: значительное усиление некроза отмечено при инкубации с экстрактом образца 7, что подтвердило его цитотоксический эффект. Для образцов 1 и 5 отмечено небольшое усиление некроза

клеток. Также показано, что внешний вид клеток существенно не изменился при воздействии экстрактов, а визуально меньшая плотность клеток заметна в поле зрения для цитостатика митомицина, образцов 5 и 7. Наиболее высокие показатели pH среды отмечены для образцов 5 и 7, проявляющих цитотоксический эффект в разной степени. Для экстрактов наиболее токсичных образцов наблюдалось самое высокое значение pH, существенно выходящее за пределы физиологической нормы, что могло объяснить усиление некроза клеток после инкубации с экстрактом.

Выводы

Представленные результаты тестов *in vitro* на цитотоксичность доказывают, что состав магниевых сплавов напрямую оказывает влияние на величину клеточного некроза, изменение морфологии клеток и pH среды.

Все исследованные сплавы продемонстрировали отрицательный цитотоксический эффект, что позволяет рассматривать их в качестве кандидатов для изготовления биорезорбируемых имплантатов. Цитотоксичность, проявляемая образцами 5 и 7, относится, скорее всего, не к системе легирования, а к его химической чистоте и наличию вредных примесей. В каждой группе сплавов присутствуют образцы, демонстрирующие превосходное соот-

ношение прочности и отрицательной цитотоксичности (образцы 1 — ZK60, 3 — ZX40, 6 — WZ20), что позволяет рационально выбирать оптимальную деформационную термомеханическую обработку для получения заданной микроструктуры в интересующей группе сплавов.

Углубленный анализ и сопоставление полученных результатов с данными о составе и структуре сплавов, коррозионными и механическими свойствами и дальнейшее исследование образцов в эксперименте *in vivo* на лабораторных животных позволят выявить дополнительные связи между характеристиками образцов и их биологической активностью.

Список литературы / References

- Zhou W.R., Zheng Y.F., Leeflang M.A., Zhou J. Mechanical property, biocorrosion and in vitro biocompatibility evaluations of Mg-Li-(Al)-(RE) alloys for future cardiovascular stent application. *Acta biomater.* 2013;9(10):8488-98. PMID: 23385218. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.01.032>
- Salahshoor M., Guo Y. Biodegradable orthopedic magnesium-calcium (MgCa) alloys, processing, and corrosion performance. *Materials.* 2012;5(1):135-155. PMID: PMC5448945, PMID: 28817036. <https://doi.org/10.3390/ma5010135>
- Прохорихин А.А., Фартаков Е.И., Малаев Д.У., Бойков А.А., Ойду-Оол С.В., Байструков В.И., Гражданкин И.О., Зубарев Д.Д., Покушалов Е.А., Кретов Е.И. Оценка эффективности и безопасности биодеградируемого каркаса Absorb: 6-месячные результаты регистра GABI R: Russia. *Патология кровообращения и кардиохирургия.* 2019;23(15):S26-S33. <http://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2019-15-S26-S33> [Prokhorikhin A.A., Fartakov E.I., Malaev D.U., Boykov A.A., Oidup-Ool S.V., Baystrukov V.I., Grazhdankin I.O., Zubarev D.D., Pokushalov E.A., Kretov E.I. Efficacy and safety of bioresorbable vascular scaffold Absorb: 6-month outcomes of GABI-R: Russia registry. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery.* 2019;23(15):S26-S33. (In Russ.) <http://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2019-15-S26-S33>]
- Kaliyadan A., Siu H., Fischman D.L., Ruggiero N.J. 2nd, Jasti B., Walinsky P., Ogilby J.D., Savage M.P. "Very" very late stent thrombosis: acute myocardial infarction from drug-eluting stent thrombosis more than 5 years after implantation. *J Invasive Cardiol.* 2014;26(9):413-6. PMID: 25198482.
- Okura H., Takagi T., Yoshida K. Therapies targeting inflammation after stent implantation. *Curr Vasc Pharmacol.* 2013;11(4):399-406. PMID: 23905635.
- Alexy R.D., Levi D.S. Materials and manufacturing technologies available for production of a pediatric bioabsorbable stent. *BioMed Res Int.* 2013;2013:137985. PMID: 24089660, PMID: PMC3780513. <https://doi.org/10.1155/2013/137985>
- Pliam M.B., Zapolanski A., Anastassiou P., Ryan C.J., Manila L.L., Shaw R.E., Pira B.K. Influence of prior coronary stenting on the immediate and mid-term outcome of isolated coronary artery bypass surgery. *Innovations.* 2007;2(5):217-25. PMID: 22437130. <https://doi.org/10.1097/IML.0b013e31815bdbc1>
- Erne P., Schier M., Resink T.J. The road to bioabsorbable stents: reaching clinical reality? *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2006;29(1):11-6. PMID: 16195840. <https://doi.org/10.1007/s00270-004-0341-9>
- Peuster M., Wohlsein P., Brugmann M., Ehlerding M., Seidler K., Fink C., Brauer H., Fischer A., Hausdorf G. A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal—results 6–18 months after implantation into New Zealand white rabbits. *Heart.* 2001;86(5):563-569. PMID: PMC1729971, PMID: 11602554. <https://doi.org/10.1136/heart.86.5.563>
- Mao L., Shen L., Chen J., Zhang X., Kwak M., Wu Y., Fan R., Zhang L., Pei J., Yuan G., Song C., Ge J., Ding W. A promising biodegradable magnesium alloy suitable for clinical vascular stent application. *Scientific reports.* 2017;7:46343. Available from <https://www.nature.com/articles/srep46343>
- Li Z., Gu X., Lou S., Zheng Y. The development of binary Mg-Ca alloys for use as biodegradable materials within bone. *Biomaterials.* 2008;29(10):1329-44. PMID: 18191191. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.021>
- Heublein B., Rohde R., Kaese V., Niemeyer M., Hartung W., Haverich A. Biocorrosion of magnesium alloys: a new principle in cardiovascular implant technology? *Heart.* 2003;89(6):651-6. PMID: 12748224, PMID: PMC1767674. <https://doi.org/10.1136/heart.89.6.651>
- Moravej M., Mantovani D. Biodegradable metals for cardiovascular stent application: interests and new opportunities. *Int J Mol Sci.* 2011;12(7):4250-70. PMID: PMC3155349, PMID: 21845076. <https://doi.org/10.3390/ijms12074250>
- Vinogradov A., Vasilev E., Kopylov V.I., Linderov M., Brilevesky A., Merson D. High performance fine-grained biodegradable Mg-Zn-Ca alloys processed by severe plastic deformation. *Metals.* 2019;9(2):186. <https://doi.org/10.3390/met9020186>
- Vinogradov A., Vasilev E., Linderov M., Merson D. Evolution of mechanical twinning during cyclic deformation of Mg-Zn-Ca alloys. *Metals.* 2016;6(12):304. <https://doi.org/10.3390/met6120304>
- Vasilev E., Linderov M., Nugmanov D., Sitdikov O., Markushev M., Vinogradov A. Fatigue performance of Mg-Zn-Zr alloy processed by hot severe plastic deformation. *Metals.* 2015;5(4):2316-27. <https://doi.org/10.3390/met5042316>
- Orlov D., Raab G., Lamark T.T., Popov M., Estrin Y. Improvement of mechanical properties of magnesium alloy ZK60 by integrated extrusion and equal channel angular pressing. *Acta Materialia.* 2011;59(1):375-85. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2010.09.043>
- Zhang B., Hou Y., Wang X., Wang Y., Geng L. Mechanical properties, degradation performance and cytotoxicity of Mg-Zn-Ca biomedical alloys with different compositions. *Mater Sci Eng C.* 2011;31(8):1667-73. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.07.015>
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63. PMID: 6606682. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Investigation of the cytotoxic effects of magnesium alloys on cell cultures

Tatyana S. Frolova^{1,4}, Andrey A. Boykov², Alexandra R. Tarkova², Konstantin E. Orishchenko¹, Alexey A. Prokhorikhin², Dastan U. Malaev², Olga I. Sinitsina^{1,4}, Vitaly I. Baystrukov², Evgeny I. Kretov², Mikhail V. Pryamov², Dmitry L. Merson³, Alexey Yu. Vinogradov³

¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

² Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

³ Togliatti State University, Togliatti, Russian Federation

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Corresponding author. Andrey A. Boykov, fimarik@gmail.com

Background. Metallic stent implantation is associated with an increased risk of adverse events, such as prolonged endothelial dysfunction, constant traumatization of the vessel wall, chronic local inflammation and thrombosis. Thus, the development and manufacturing of bioresorbable stents, which maintain the required support during the vessel healing period and completely dissolve without any side effects, is highly relevant. At present, magnesium alloys are regarded the most applicable for this purpose due to their low corrosion resistance and high biocompatibility.

Aim. To assess the cytotoxicity of different magnesium alloys *in vitro*.

Methods. Using strain tempering, seven samples with different yield stress levels were produced: sample 1, MgZnZr (ZK60) 310 MPa; sample 2, MgZnCa (ZX10) 60 MPa; sample 3, MgZnCa (ZX40) 130 MPa; sample 4, MgYZn (WZ31) 300 MPa; sample 5, MgYZn (WZ31) 275 MPa; sample 6, MgYZn (WZ20) 340 MPa and sample 7, MgZnZr (ZK60) 180 MPa. The samples were incubated in a culture medium to obtain the extract, which was further tested on immortalised human fibroblasts. The cytotoxicity of the obtained extract was assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, flow cytometry, optical microscopy and pH test.

Results. In MTT assay, sample 7 was significantly cytotoxic (mean cell survival: 48% [2% ± 1%]), whereas sample 5 was slightly cytotoxic (mean cell survival: 81% [4% ± 14%]). In optical microscopy, the same samples showed the lowest cell density. In flow cytometry, the number of necrotic cells significantly increased in sample 7 (8.25%) and only slightly increased in samples 1 and 5 (3.449% and 3.626%, respectively). Furthermore, samples 5 and 7 showed the highest medium pH.

Conclusion. The composition and strain tempering method magnesium alloys are directly correlated with the degree of cell necrosis, change in morphology and medium pH *in vitro*.

Keywords: biocompatibility; biodegradable stents; coronary artery disease; endovascular surgery; magnesium alloys; peripheral artery disease

Received 7 June 2019. Revised 28 October 2019. Accepted 6 November 2019.

Funding: The work is supported by the Ministry of Science of Russian Federation (project RFMEFI58317X0070).

Conflict of interest: Authors declare no conflict of interest.

ORCID ID

A.A. Boykov, <https://orcid.org/0000-0002-3129-5572>

A.R. Tarkova, <https://orcid.org/0000-0002-4291-6047>

A.A. Prokhorikhin, <https://orcid.org/0000-0002-3247-8290>

D.U. Malaev, <https://orcid.org/0000-0001-6032-788X>

V.I. Baystrukov, <https://orcid.org/0000-0003-2883-6574>

D.L. Merson, <https://orcid.org/0000-0001-5006-4115>

A.Yu. Vinogradov, <https://orcid.org/0000-0001-9585-2801>

Copyright: © 2019 Frolova et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

How to cite: Frolova T.S., Boykov A.A., Tarkova A.R., Orishchenko K.E., Prokhorikhin A.A., Malaev D.U., Sinitsina O.I., Baystrukov V.I., Kretov E.I., Pryamov M.V., Merson D.L., Vinogradov A.Yu. Investigation of the cytotoxic effects of magnesium alloys on cell cultures. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2019;23(3):22-29. <http://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2019-3-22-29> (In Russ.).