

УДК 576.3.08

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-16-29

Для цитирования: Дружинина Т.В., Талалаев С.Я., Закиров Н.П., Щаденко С.В., Хабибуллин Ш.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Клеточные реакции на трехмерные матриксы из полимолочной кислоты и гидроксиапатита, полученные методом 3D-печати. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 16–29

Клеточные реакции на трехмерные матриксы из полимолочной кислоты и гидроксиапатита, полученные методом 3D-печати

Дружинина Т.В.¹, Талалаев С.Я.¹, Закиров Н.П.¹, Щаденко С.В.^{2,3},
Хабибуллин Ш.А.³, Хлусов И.А.²⁻⁴, Литвинова Л.С.⁵

¹ ФГУП «Экспериментально-производственные мастерские» ФМБА России
Россия, 123182, г. Москва, Щукинская ул., 5/2

² Сибирский государственный медицинский университет
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

³ Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

⁴ ООО «Биоконструктор-С»
Россия, 634061, г. Томск, ул. Сибирская, 31

⁵ Балтийский федеральный университет имени И. Канта
Россия, 236041, г. Калининград, ул. А. Невского, 14

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – оценить *ex vivo* физико-химические и биологические свойства трехмерных (3D) биodeградируемых матриксов «полимолочная кислота – фосфаты кальция», полученных с помощью аддитивных технологий (3D-печати), как потенциальных материалов для восстановления костной ткани.

Материал и методы. Экспериментальные образцы (диски толщиной 1,2–1,6 мм и диаметром 8 или 11 мм) композитных биodeградируемых 3D-матриксов (далее – 3D-композиты) получены из исходной смеси 95 мас% полимолочной кислоты (PLA) и 5 мас% гидроксиапатита (НАР) методом компьютерного проектирования в программной среде Blender и последующего послойного наплавления нитей (диаметр 1,75 мм) при помощи 3D-принтера. В качестве контроля служили матриксы из 100 мас% PLA. Одна из поверхностей образцов была текстурирована бороздками шириной 0,3–0,5 мм. Изучали физико-химические свойства образцов диаметром 11 мм: геометрию, массу, морфологию, шероховатость, электростатический потенциал и смачиваемость поверхности, элементный состав. Биологические испытания включали изучение 24-часовой цитотоксичности образцов диаметром 8 мм на культуре мононуклеарных лейкоцитов здорового добровольца или лейкозных Т-лимфобластоподобных клеток человека линии Jurkat 5332 (далее Jurkat Т-клетки). В 21-суточной культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) жировой ткани человека определяли остеогенный потенциал образцов диаметром 11 мм по секреции остеокальцина, минерализации межклеточного матрикса, визуализированной окраской ализарином.

Основные результаты. Характеристики трехмерных биodeградируемых матриксов PLA-НАР, полученных методом 3D-печати, во многом соответствуют физико-химическим параметрам, критичным для восстановления костной ткани. При небольшом содержании кальция и фосфора (1–2 мас.%) они способствовали *ex vivo* минерализации межклеточного вещества, сформированного в культуре ММСК жировой

✉ Хлусов Игорь Альбертович, e-mail: khlusov63@mail.ru

ткани человека. При 24-часовом контакте *in vitro* с 3D-композитами PLA-HAP в отличие от PLA-образцов на 9–10% возросло число погибших (преимущественно путем некроза) лейкозных Jurkat T-клеток, но не мононуклеарных лейкоцитов здорового добровольца.

Заключение. Полярная реакция здоровых и опухолевых клеток на образцы PLA-HAP в случае увеличения содержания фосфатов кальция в составе 3D-композита может иметь значение при разработке новых материалов для эндопротезирования и остеосинтеза переломов у больных, страдающих гемобластозами.

Ключевые слова: 3D-моделирование, прототипирование, биodeградируемые диски, *in vitro*, цитотоксичность, стромальные стволовые клетки, секреция остеокальцина, окраска ализарином красным.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в тканевой биоинженерии и регенеративной медицине растет применение биodeградируемых (со)полимеров. Среди часто изучаемых материалов – полимеры монокарбоновых кислот: молочной, гликолевой, масляной, валериановой [1]. Широкое использование в клинической практике нашли имплантаты, выполненные из полигликолевой и (или) полимолочной кислот (PLA), которые являются частично кристаллизованными полимерами с линейной структурой [2].

В клинической практике растет количество операций, сделанных с использованием имплантатов, выполненных из различных полимерных или биополимерных рассасывающихся материалов, которые должны в разные сроки в зависимости от их состава контролируемо замещаться костной тканью. Однако имплантаты из PLA расщепляются и замещаются костной тканью, по данным разных авторов, не ранее, чем через 7 лет после имплантации [3]. По другим данным, PLA-винты находятся в живой кости человека не менее 5 лет. Во всех динамических клинических наблюдениях не отмечено ни одного случая замещения рассасывающегося полимерного имплантата костью в указанные сроки [4]. При этом на российском рынке ортопедии и травматологии представлены исключительно изделия зарубежных фирм Smith&Nephew, Stryker, Depuy Mitek, Karl Storz, Inion. В связи с этим разработка импортозамещающих технологий изготовления и модификации имплантатов из биodeградируемых (со)полимеров и их композитов является весьма актуальной.

Обширные дефекты костей (например, при онкологии) требуют использования имплантатов со сложной геометрией, которую можно получить с помощью компьютерной томографии раневого дефекта, обработки первичных изображений для трехмерной (3D) реконструкции зоны интереса,

изготовления индивидуального изделия. В этом плане при создании 3D-конструкций (матриц, скеффолдов, каркасов и т.п.) перспективным подходом признаны различные способы послойного формирования 3D-объектов по их компьютерным образам (технологии прототипирования). Проблема заключается в хрупкости получаемых изделий (струйная печать, стереолитография), невысокой точности в микрометровом масштабе либо неприменимости для биополимеров (лазерное спекание, послойная полимеризация).

Кроме того, аддитивные технологии (3D-печать) не означают однозначную остеоинтеграцию имплантируемого материала. Соблюдаются только принципы точной подгонки материала к геометрии макроскопического дефекта, их биомеханической совместимости. Способность искусственного материала стимулировать рост здоровых костных клеток (регенеративная медицина) выходит за рамки данной технологии.

Для преодоления проблемы предлагаются различные технологические комбинации биodeградируемых полимеров, например с фосфатами кальция [5, 6], известными остеозамещающими материалами.

Цель исследования – оценить *ex vivo* физико-химические и биологические свойства 3D-биodeградируемых матриц «полимолочная кислота – фосфаты кальция», полученных с помощью 3D-печати, как потенциальных материалов для восстановления костной ткани.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В экспериментах *in vitro* применяли 19 экспериментальных образцов композитных биodeградируемых 3D-матриц (далее – 3D-композиты). Образцы изготовлены в виде дисков толщиной 1,2–1,6 мм и диаметром 11 или 8 мм из исходной смеси 95 мас.% полимолочной кислоты (Natural Works Ingeo 40-43d, NatureWorks LLC, США) и 5 мас.% гидроксиапатита (HAP), введенного в форме частиц размером менее 75 мкм (табл. 1).

| Сравнение симулированных в компьютерной модели и реальных параметров экспериментальных образцов композитных биодеградируемых 3D-матриц из полимолочной кислоты и частиц гидроксиапатита, мм | | | | | | |
|---|----------------|------------------|----------------|------------------|------------------------|--------------------------|
| Маркировка | Диаметр модели | Диаметр образцов | Толщина модели | Толщина образцов | Ширина бороздок модели | Ширина бороздок образцов |
| M03 | 11 | 11 | 1,5 | 1,4–1,6 | 0,3–0,5 | 0,4–0,5 |
| M02 | 8 | 8 | 1,3 | 1,2–1,3 | 0,3–0,5 | 0,4–0,5 |

Порошок синтетического НАР получен механохимическим способом [7]. В качестве контроля использовали 19 дисков из 100 мас.% полилактида (PLA). Нить диаметром 1,75 мм для изготовления образцов получали при 121 °С с помощью экструдера Wellzoom Type A (Shenzhen Mistar Technology Co., КНР).

Проектирование 3D-моделей образцов осуществлялось в программной среде с открытым исходным кодом Blender. 3D-модели различались диаметром изделия, толщиной и размерами бороздок на поверхности (см. табл. 1, рис. 1). Макрорельеф (бороздки) создавали для улучшения потенциальных остеогенных свойств экспериментальных образцов согласно алгоритму работ, ранее проведенных на кальцийфосфатных материалах [8].

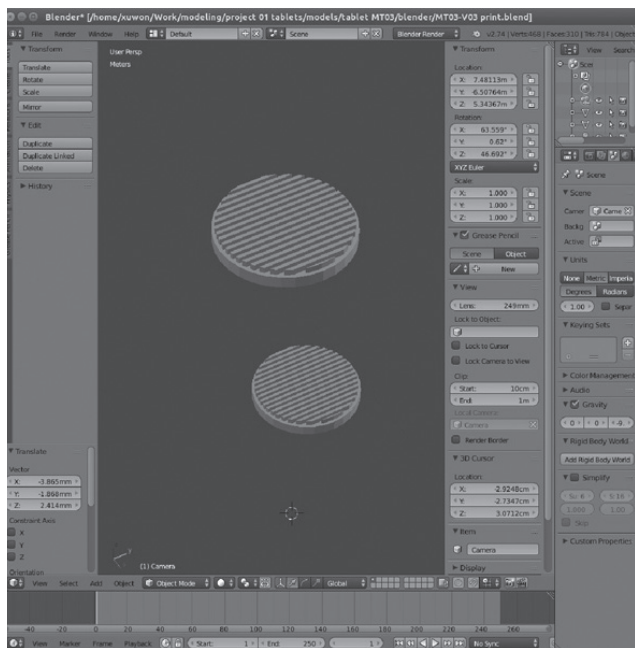


Рис. 1. Сравнение компьютерных моделей M03 (диаметр 11 мм) и M02 (диаметр 8 мм) экспериментального образца композитных биодеградируемых 3D-матриц: изометрическая проекция

Построенные 3D-модели экспериментальных образцов подвергали анализу методом конечных элементов. Для симуляционного анализа (верификации) сочетания морфологических и (или) меха-

нических свойств 3D-модели использовали FEM Workbench программного продукта FreeCAD. Подготовка верифицированных 3D-моделей к 3D-печати, заключающаяся в преобразовании модели из STL формата в G-code, осуществлялась с использованием программы Makerbot Desktop. Образцы получали методом послойного наплавления нитей (FFF) при помощи 3D-принтера CreatBot Duo (CreatBot 3D Printer, КНР). Массу напечатанных изделий определяли на аналитических электронных весах GR-202 (A&D, Япония) I класса точности по ГОСТ Р 53228-2008.

Исследование морфологии и элементного состава поверхности образцов осуществляли при помощи растрового электронного микроскопа (РЭМ) LEO EVO 50 – INCA Energy 350 (Carl Zeiss Jena, Германия) с приставкой для микроанализа EDAX, которая была использована для определения элементного состава покрытия. Оптическую отражающую микроскопию макрорельефа поверхности проводили с помощью инвертированного металлографического микроскопа Olympus GX-71 (Япония).

По шесть штук PLA-образцов и 3D-композитов использовали для тестирования их физико-химических свойств. Шероховатость поверхности 3D-образцов определяли с помощью профилометра-296 (Россия) согласно ГОСТ 2789-73 по индексу R_a , значение которого рассчитывалось как среднее арифметическое отклонение профиля поверхности в пределах базовой длины измерения 1,5 мм.

Электростатический потенциал поверхности определяли специализированным аппаратным комплексом для измерения поверхностной плотности заряда и потенциала поверхности, как описано нами ранее [9]. В основу методики измерения потенциала покрытий положен метод подъемного электрода (метод Егучи).

Измерения краевого угла смачивания деионизированной водой и глицерином проводили на воздухе методом лежащей капли (3 мкл) при комнатной температуре посредством Contact Angle Measuring Module DSA20 EasyDrop (KRÜSS, Германия) с помощью программного обеспечения DSA1, как описано ранее [10]. Поверхностную

энергию рассчитывали по уравнению Оуэнса – Вендта [11].

Перед биологическими испытаниями образцы автоклавируют в течение 30 мин при 121 °С и 1 атм. Для тестирования цитотоксичности *in vitro* использовали восемь экспериментальных образцов 3D-компонитов и восемь PLA-дисков диаметром 8 мм (контроль). На трех тестируемых или контрольных образцах изучали их влияние на жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови здорового добровольца. Еще по пять экспериментальных образцов из каждой исследуемой группы применяли для изучения их цитотоксичности в отношении линии Jurkat 5332 лейкозных Т-лимфобластоподобных клеток человека (далее Jurkat Т-клетки).

В качестве здоровых клеток-мишеней использовали первичную культуру мононуклеарных лейкоцитов крови. Периферическую кровь здорового добровольца собирали в стерильных условиях в пробирки Vacuette (BD Diagnostics, США). Фракцию мононуклеарных лейкоцитов выделяли из крови методом центрифугирования в течение 10 мин при 500 g с использованием градиента плотности Ficoll-Paque (Pharmacia, Швеция) ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) и двукратным отмыванием взвеси клеток от реактива фосфатным буфером.

Взвесь мононуклеарных лейкоцитов (исходная жизнеспособность более 95% согласно тесту с 0,4%-м трипановым синим) культивировали в пяти конических пластиковых пробирках объемом 15 мл при температуре 37 °С в концентрации 3×10^6 нуклеаров/мл культуральной среды следующего состава: 100% среды DMEM/F12 (1:1) (Gibco Life Technologies, США), 10 mM буфера HEPES (Sigma-Aldrich, США), 280 мг/л L-глутамин (Sigma-Aldrich, США).

Для изучения цитотоксичности в отношении опухолевых клеток применяли Jurkat Т-клетки (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург) с исходной жизнеспособностью 98% согласно тесту с 0,4%-м трипановым синим. Jurkat Т-клетки культивировали в пяти лунках 24-луночного планшета (Orange Scientific, Бельгия) при температуре 37 °С и 5% CO₂ в концентрации 1×10^4 клеток/мл полной питательной среды, состоящей из 90% RPMI-1640 (Sigma, США), 10% инактивированной (56 °С в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров (Sigma-Aldrich, США) и 0,3 мг/мл L-глутамин (Sigma-Aldrich, США).

В культуральные сосуды помещали по одному тестируемому образцу и сокультивировали клеточную взвесь в течение 24 ч. Контролем служила клеточная взвесь без экспериментальных образцов.

После инкубации клеточную взвесь центрифугировали при 500 g в течение 15 мин, надосадок замещали 1 мл культуральной среды. Клеточный осадок ресуспендировали для оценки жизнеспособности клеток. Жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов крови оценивали согласно рекомендациям ISO 10993-5 по их способности исключать окрашивание (не окрашиваться) 0,4%-м раствором трипанового синего (Sigma-Aldrich, США). Число окрашенных и (или) неокрашенных лейкоцитов определяли в камере Горяева с помощью микроскопа ZEISS Axio Observer A1 (Carl Zeiss Microscopy, Германия).

Процентное соотношение живых и погибших (апоптоз, некроз) форм Jurkat Т-клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии на аппарате Guava EasyCytePlus (Millipore, США) с использованием реагента и программы Guava Via Count (Millipore, США).

Для определения *in vitro* влияния образцов на остеогенный потенциал стромальных стволовых клеток использовали по пять штук 3D-компонитов или PLA-образцов диаметром 11 мм. В качестве клеток-мишеней использовали культуру постнатальных стромальных стволовых клеток (далее – мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК)), выделенных из жировой ткани человека методом липоаспирации (разрешение № 4 от 23.10.2013 локального этического комитета Инновационного парка Балтийского федерального университета имени И. Канта, г. Калининград). Подобные клетки *in vitro* способны дифференцироваться и давать начало трем типам клеток (остеобласты, хондробласты, фибробласты), что соответствует критериям стволовых клеток, установленным The International Society for Cellular Therapy (ISCT) [12].

ММСК в концентрации 3×10^4 клеток/лунку помещали в 24-луночные планшеты (Orange Scientific, Бельгия) в 1 мл среды обычного состава (контроль роста 1): 90% среды DMEM/F12 (1 : 1) (Gibco Life Technologies, США), 10% сыворотки крови плодов коровы (Sigma-Aldrich, США), 50 мг/л гентамицина (Invitrogen, Великобритания), 280 мг/л L-глутамин (Sigma-Aldrich, США). В часть лунок перед добавлением культуральной среды помещали тестируемые образцы в количестве 1 штука/лунку.

Для выявления потенциальной способности коммитирования ММСК в остеобласты часть клеток культивировали в 1 мл бессывороточной остеогенной среды из набора StemPro® Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя (контроль роста 2).

Супернатанты (межклеточные жидкости) отделяли от клеточных культур на 14-, 17-, 21-е сут культивирования, собирали в пробирки, центрифугировали при 500 g в течение 10 мин. Количественное определение остеокальцина осуществляли с помощью тест-системы Osteometer BioTech A/S N-MID Osteocalcin One Step ELISA (Nordicbioscience diagnostics, Дания) для иммуноферментного анализа (ИФА). Исследование проводилось по стандартной схеме проведения ИФА.

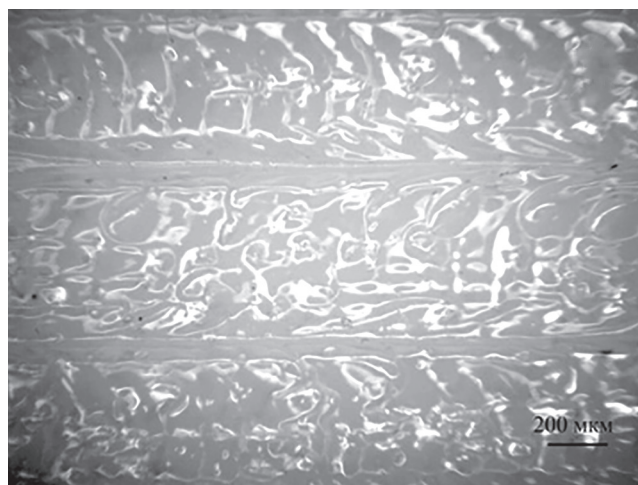
Через 21 сут культивирования тестируемые образцы удаляли, сушили на воздухе. Клетки, прилипшие к пластику в лунках, окрашивали 2%-м раствором красителя ализарин красный S. A5533 (Sigma-Aldrich, США). Участки розово-малинового окрашивания, свидетельствующие об осаждении кальция (процессе минерализации) на костных клетках, документировали с помощью программы ZEN 2012 (Carl Zeiss Microscopy, Германия) на микроскопе ZEISS Axio Observer A1 (Carl Zeiss Microscopy, Германия).

Статистическая обработка данных осуществ-

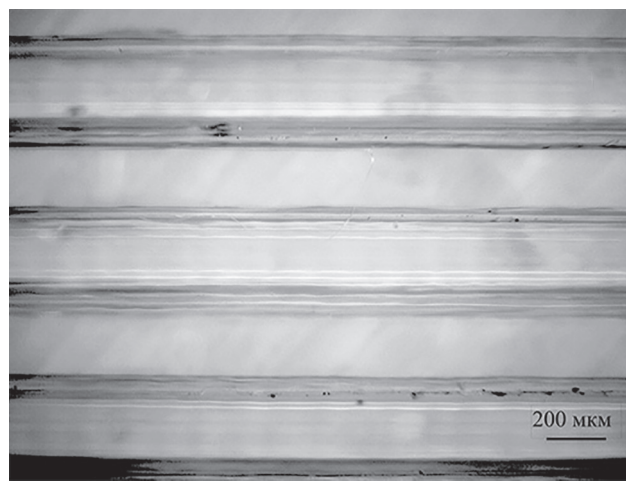
лялась с помощью программы STATISTICA for Windows 10.0. Рассчитывали параметры распределений: медиану (Me), 25%-й квартиль (Q_1) и 75%-й квартиль (Q_3). Для оценки статистической значимости различий применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ с помощью отражающей оптической микроскопии (рис. 2), модельных и реальных параметров изделий, полученных после 3D-печати (см. табл. 1), подтвердил возможность применения выбранного метода прототипирования для воспроизведения в реальном образце геометрических характеристик, смоделированных на компьютере. Расстояние между бороздками в 3D-композитах примерно в 1,5 раза превышало таковое в PLA-образцах, что может быть связано с большей вязкостью композитного материала, которая влияет на скорость выхода нити из сопла печатающего устройства.



а



б

Рис. 2. Отражающая оптическая микроскопия макрорельефа поверхности: а – композитных биодеградируемых 3D-матриц; б – полилактидных дисков без добавления гидроксиапатита. Темное поле, ув. 10

Известно, что масса имплантатов является одним из критических параметров его использования в клинической практике. Взвешивание 3D-композитов показало, что их масса статистически значимо не отличалась от массы чистых PLA-образцов с сопоставимым диаметром и рельефом. При диаметре 11 мм средняя масса пяти PLA-дисков составила (165 ± 1) мг, что соответствовало массе пяти экспериментальных образцов 3D-композитов (165 ± 17) мг. Для сравнения: масса композитов «титан-кальцийфосфатное

микродуговое покрытие», широко применяемых в ортопедии и травматологии при аналогичных размерах варьирует в пределах 400–600 мг.

Таким образом, добавление частиц НАР в полимерный состав не вызывает значимых изменений в массе образцов и, с другой стороны, позволяет надеяться на улучшение биологических свойств 3D-композитов при испытаниях *in vitro* и *in vivo* в приложении к биоинженерии костной ткани.

Согласно выполненным физико-химическим тестам (табл. 2), 3D-печать не влияла на извест-

ные из литературных источников [2] гидрофобные свойства PLA-образцов (контактный угол смачивания водой 82°). Приблизительно равномерное распределение дисперсионной и по-

лярной составляющей поверхностной энергии обусловлено наличием в составе полимера неполярных (C—C, C—H) и полярных связей (C—O, C=O).

Т а б л и ц а 2

| Сравнительные физико-химические характеристики полилактидных образцов и композитных биodeградируемых 3D-матриков (диаметр 11 мм) полимолочной кислоты с частицами гидроксиапатита, изготовленных методом послойного наплавления нитей, Me (Q ₁ ; Q ₂) | | | | | |
|--|---|------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------|
| № п/п | Параметр | Ед. изм. | 3D-композиты PLA-HAP | PLA-диски | <i>p</i> |
| 1 | Амплитуда электростатического потенциала поверхности (рельефная сторона), <i>n</i> = 25 | В | -36,3 (-36,3; 13,4) | -36,3 | < 0,001 |
| 2 | Амплитуда электростатического потенциала поверхности (гладкая сторона), <i>n</i> = 25 | В | -36,3 (-36,3; -13,2) | -36,3 | < 0,001 |
| 3 | Индекс Ra шероховатости поверхности (гладкая сторона), <i>n</i> = 50 | мкм | 0,70 (0,46; 0,94) | 0,70 (0,54; 1,07) | > 0,05 |
| 4 | Наличие кальция в составе образца, <i>n</i> = 20 | массовые % | 1,52 (1,20; 1,95) | 0 | < 0,001 |
| 5 | Наличие фосфора в составе образца, <i>n</i> = 20 | массовые % | 0,77 (0,65; 1,0) | 0 | < 0,001 |
| 6 | Соотношение кальция (атомные %) к фосфору (атомные %), <i>n</i> = 20 | усл. ед. | 1,45 (1,39; 1,52) | 0 | < 0,001 |
| 7 | <i>Концентрации токсичных элементов в образцах</i> | | | | |
| 7.1 | Al (<i>n</i> = 20) | атомные % | 0 (0; 0,01) | 0 | > 0,05 |
| 7.2 | Mn (<i>n</i> = 6–9) | атомные % | 0 <i>n</i> = 9 | 0,01 (0; 0,01) <i>n</i> = 6 | > 0,05 |
| 7.3 | Fe (<i>n</i> = 6–9) | | 0 <i>n</i> = 9 | 0 <i>n</i> = 6 | > 0,05 |
| 7.4 | Sn (<i>n</i> = 6–9) | | 0,01 (0; 0,01) <i>n</i> = 9 | 0 <i>n</i> = 6 | > 0,05 |
| 8 | Контактный угол смачивания водой (<i>n</i> = 9) | | градус | 82 (73; 83) | 82 (81; 85) |
| 9 | Величина поверхностной энергии (<i>n</i> = 9) | мН/м | 28 (25; 31) | 26 (25; 27) | > 0,05 |
| 9.1 | дисперсионная компонента | мН/м | 7 (4; 15) | 15 (13; 17) | > 0,05 |
| 9.2 | полярная компонента | мН/м | 21 (11; 25) | 11 (8; 14) | > 0,05 |

Пр и м е ч а н и е. *n* – количество измерений.

Считается, что увеличение гидрофильности полимерной поверхности улучшает клеточную адгезию [13]. Введение HAP в полимерный материал существенно не меняло гидрофильность и (или) гидрофобность 3D-композитов. Вместе с тем тенденция к 3-кратному увеличению медианы распределения полярной компоненты поверхностной энергии предполагает наличие в составе композитов дополнительных заряженных частиц.

Микроанализ элементного состава в точечных областях 3D-композитов показал наличие фосфора и кальция в концентрации 1–2 мас.% соответственно. В свою очередь чистые PLA-образцы состояли на 65–70 мас.% из углерода и 30–35 мас.% кислорода.

Наличие кальция и фосфора в имплантатах является важнейшим условием их остеогенной активности [14]. При этом медленная динамика растворения полилактидных матриц [15] позволяет их рассматривать в качестве потенциальных

систем длительного высвобождения ионов кальция и фосфора. Примеси токсичных металлов, которые могли присутствовать в исходных ингредиентах и инкорпорироваться в процессе изготовления образцов, не определялись или были обнаружены в следовых количествах (см. табл. 2). Это позволило исключить их вклад в возможную цитотоксичность тестируемых образцов.

Другими характеристиками, способствующими росту костных клеток и биоинженерии костной ткани, являются микрорельеф (шероховатость) поверхности [14], отрицательный знак ее заряда и оптимальная величина электростатического потенциала [16]. Известно, что полимеры в сравнении с металлами и керамикой имеют низкие значения поверхностной энергии [17], что позволяет микротопографии поверхности играть ведущую роль в регуляции жизнедеятельности клеток [10].

В этом плане 3D-композиты PLA-HAP при одинаковой шероховатости поверхности с PLA-

образцами имеют биомедицинское преимущество в ограничении амплитуды поверхностного потенциала в сравнении с PLA-образцами (см. табл. 2). Амплитуда отрицательного электростатического потенциала на PLA-поверхности превышала предел измерительного прибора (36,3 В). На трех из пяти изученных 3D-композитов зафиксировано снижение амплитуды и (или) реверсия знака заряда (с отрицательного на положительный) на разных сторонах образцов. Можно предположить неравномерное распределение частиц НАР при изготовлении композитной нити для 3D-печати и (или) печати самих образцов как следствие изменения вязкости композитного материала.

При оценке перспектив новых материалов биомедицинского назначения международные и российские стандарты рекомендуют начинать изучение их биосовместимости с тестов *in vitro* [18]. Перед проведением исследований *in vivo* новых композитов уже известных материалов следует исключить их потенциальную токсичность в отношении морфологии и функциональной активности клеток млекопитающих.

Одним из основных методов, согласно рекомендациям ISO 10993-5, ГОСТ Р ИСО 10993-5, является определение способности клеток противостоять проницаемости мембран для витальных красителей (жизнеспособности) после прямого контакта с изделием и (или) воздействия его

вытяжек. Подходящим объектом для изучения цитотоксичности являются клетки крови и иммунной системы, реагирующие на любое экстремальное воздействие на организм [19].

Мононуклеарные лейкоциты крови принимают активное участие в реакциях приживления и (или) отторжения имплантатов [18]. Согласно полученным результатам, доля жизнеспособных лейкоцитов при добавлении к клеточной суспензии тестируемых образцов 3D-композитов PLA-НАР составила 100%, PLA-дисков – 80–100%, что статистически значимо не отличалось от показателя в контрольной культуре клеток (100%), не контактировавших с искусственными материалами.

На лейкозных Jurkat T-клетках изучают иммунные и цитотоксические реакции на биоматериалы [20]. В представленных исследованиях не применялись митогены, цитокины и химические активаторы, увеличивающие концентрацию факторов роста в супернатантах клеточных культур в сотни раз [21], что способствует адаптации (выживанию) культуры Jurkat T-клеток *in vitro*, трудно достижимой в естественных условиях.

В среде без митогенов 3D-композиты вызывали статистически значимое снижение на 9–10% жизнеспособности опухолевых клеток крови в сравнении как с контролем (культура клеток без образцов), так и с PLA-дисками (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

| Результаты <i>in vitro</i> цитотоксичности тестируемых образцов после 24 ч сокультивирования с опухолевыми Jurkat T-клетками, Me (Q ₁ ; Q ₃) | | | | |
|---|---|---|--|---|
| № п/п | Группа наблюдений | Jurkat T-клетки, n = 15 | | |
| | | Количество жизнеспособных клеток, % | Количество погибших клеток, % | |
| | | | Апоптоз | Некроз |
| 1 | Культура клеток без образцов (контроль токсичности) | 81,5 (80,1; 83,6) | 4,6 (4,2; 4,9) | 14,8 (12; 15,6) |
| 2 | Культура клеток в присутствии 3D-композитов PLA-НАР | 72,9 (69,4; 78,6) $p_1 < 0,0004$ $p_3 < 0,00002$ | 5,6 (4,7; 6,3) $p_1 < 0,02$ $p_3 < 0,009$ | 21,0 (17; 24) $p_1 < 0,0007$ $p_3 < 0,00004$ |
| 3 | Культура клеток в присутствии PLA-дисков | 82,6 (80,7; 87,1) | 4,4 (3,9; 5,1) | 12,4 (8; 13,5) $p_1 < 0,04$ |

П р и м е ч а н и е. n – количество исследованных проб; p_1 , p_3 – статистически значимые различия с группами 1 и 3 соответственно.

Гибель клеток была обусловлена усилением процессов апоптоза и в большей степени некроза. При этом PLA-изделия, напротив, уменьшали число некротических форм Jurkat T-клеток по сравнению с контролем без образцов.

Изменение морфофункционального состояния Jurkat T-клеток было установлено ранее при краткосрочном контакте с кальцийфосфатным (КФ) покрытием, сформированным методом вы-

сокочастотного магнетронного распыления на титане [22]. При этом микродуговые КФ-покрытия при 24-часовом контакте снижают выживаемость культуры Jurkat T-клеток [23]. Возможно, существуют общие закономерности негативной реакции Jurkat T-клеток на фосфаты кальция, которые способны выделяться в межклеточную жидкость при биодеградации композитных материалов. В этом плане полученные результаты

согласуются с некоторыми литературными ссылками о цитотоксичности аморфных (растворимых) фосфатов кальция [24].

Существующие в настоящее время основные классы материалов для биологии и медицины (металлы и их сплавы, разновидности керамики, полимеры, углеродные волокна) при всех достоинствах не удовлетворяют полностью характеристикам живых тканей. В конечном итоге это приводит к клинической ситуации, которая называется «неуспех имплантата»: расшатывание, нарушение его целостности, присоединение инфекционных агентов, что заставляет удалять изделие раньше положенного срока службы. Возникают реальные социально-экономические потери для самого пациента и государства.

Поэтому разработка композитных матриц, которые способны воспроизводить клеточное и тканевое микроокружение, рассматривается как обещающее направление биоинженерии

биологических тканей. При этом считается, что особенности внеклеточного матрикса способны регулировать направление дифференцировки и созревания стромальных стволовых клеток [25].

Способность клетки к дифференцировке и созреванию возможно определить с помощью цито(гисто)химических и биохимических методик. В качестве молекулярного маркера остеогенной дифференцировки ММСК часто используется остеокальцин – межклеточный белок, являющийся растворимым компонентом костного матрикса и выделяемый секреторными (зрелыми) остеобластами [26].

Согласно данным табл. 4, длительное культивирование ММСК жировой ткани человека в стандартной культуральной среде (без остеогенных добавок; контроль роста 1) на пластике не сопровождалось значительной секрецией остеокальцина в изученные сроки эксперимента.

Таблица 4

| Концентрация остеокальцина (нг/мл) в межклеточной среде культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (контроль роста 1) в различные сроки контакта с тестируемыми образцами, $Me(Q_1; Q_3)$ | | | | |
|--|---|--|--|----------------------|
| № п/п | Группа наблюдений | Сроки контакта, сут | | |
| | | 14 | 17 | 21 |
| 1 | Контрольная культура клеток без образцов (контроль роста 1) | 0,82 (0,76; 0,88) | 0,88 (0,82; 0,94) | 0,94 (0,94; 1,0) |
| 2 | Культура клеток в присутствии 3D-композитов PLA-НAP | 0,59 (0,53; 0,70) | 0,70 (0,59; 0,76) | 0,88 (0,88; 1,0) |
| 3 | Культура клеток в присутствии PLA-дисков | 0,88 (0,88; 1,00) | 0,70 (0,70; 1,05) | 1,09 (0,41; 1,35) |
| 4 | Культура клеток без образцов в бессывороточной остеогенной среде (контроль роста 2) | 1,29 (1,26; 1,50) $p_{1,2} < 0,01$ | 1,70 (1,05; 1,87) $p_{1,2} < 0,02$ | 0,88 (0,88; 1,17) |

Примечание. p_1, p_2 – статистически значимые различия с группами 1, 2 соответственно; количество исследованных образцов (лунок в планшете) в каждой группе $n = 5$.

Соответственно ММСК жировой ткани, взаимодействующие с тестируемыми 3D-композитами и PLA-образцами, не получали преимуществ в секреции остеокальцина в сравнении с контролем роста 1 (см. табл. 4).

Остеогенная среда включает в свой состав гуморальные индукторы генов дифференцировки и созревания (как правило, дексаметазон, бета-глицерофосфат, аскорбиновую кислоту). Результаты показали, что специализированная остеогенная среда (контроль роста 2) только в 1,5–2 раза в сравнении с контролем роста 1 стимулировала секрецию остеокальцина на 14–17-е сут. К концу периода наблюдений (21-е сут) концентрация белка в контроле роста 2 значительно уменьшилась и не отличалась от таковой в других группах наблюдения (см. табл. 4).

Другими словами, использованная культура ММСК обладала слабыми секреторными способностями, что не позволило в использованные сроки эксперимента установить влияние тестируемых матриц на выделение остеокальцина в межклеточную жидкость. Тем не менее тестируемые образцы, как минимум, не снижали способность ММСК секретировать остеокальцин в стандартной культуральной среде без остеогенных добавок.

Более наглядные результаты были получены при окраске клеточных культур ализарином красным на 21-е сут исследования (рис. 3). Ализарин красный имеет сродство к катионам, в том числе кальция, и дает прочное окрашивание в местах его отложения (участках минерализации – кальцификации).

В специализированной остеогенной среде (контроль роста 2) к 21-м сут эксперимента отмечены множественные участки культуры клеток с интенсивным малиново-красным окрашиванием (рис. 3, з), свидетельствующие об отложении солей кальция на клетках. Согласно известному ионному составу культуральной среды, это, прежде всего, фосфаты кальция, являющиеся, как известно [26], основным компонентом минерального матрикса кости. Напротив, в контроле роста 1 (рис. 3, а) ММСК практически не воспринимали краситель.

На границе раздела «образец – клетки» матрицы PLA и PLA-НАР способствовали формированию участков фибробластоподобных клеток со слабым малиновым окрашиванием клеточных скоплений (рис. 3, б, в). В порядке убывания степени окраски исследуемые группы располагаются в следующем порядке: контроль роста 2 > культура клеток в присутствии 3D-композитов PLA-НАР > культура клеток в присутствии PLA образцов > контроль роста 1.

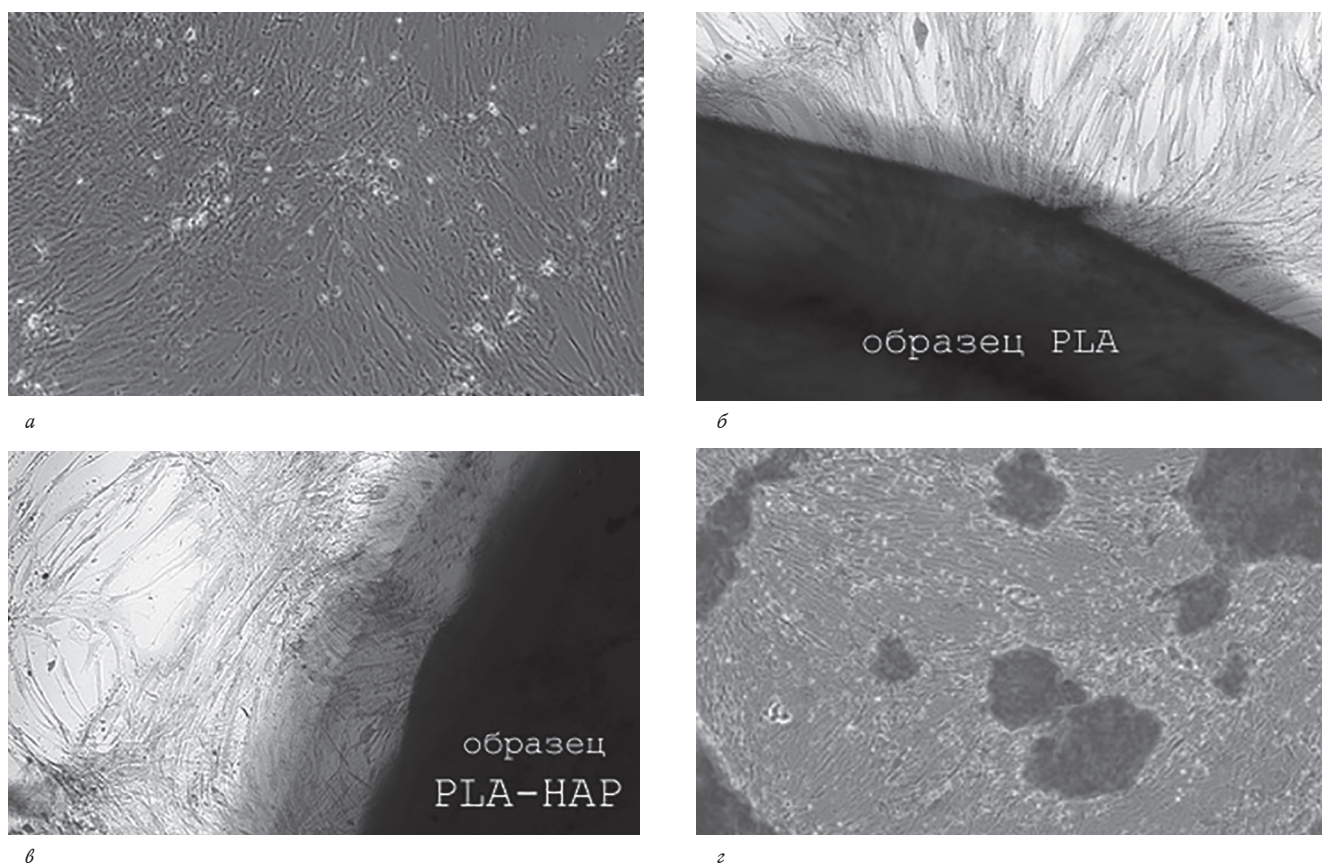


Рис. 3. 21-суточная культура ММСК жировой ткани человека с участками минерализации, окрашенными ализарином красным: а – контроль роста 1 (стандартная культуральная среда); б – культура клеток в присутствии PLA-образцов; в – культура клеток в присутствии 3D-композитов PLA-НАР; з – контроль роста 2 (бессывороточная остеогенная среда). Ув. 100

Таким образом, композитные биodeградируемые 3D-матрицы PLA-НАР способны усиливать *in vitro* минерализацию межклеточного матрикса. Это может быть проявлением их специфической остеогенной активности (механизма действия) в отношении стимулирования роста, дифференцировки и созревания ММСК в костные клетки. Известно, что минерализация межклеточного матрикса является одной из основных функций остеобластов [26].

По-видимому, наличие в составе 3D-композитов частиц НАР позволяет им при 21-суточном медленном растворении в клеточной культуре вы-

ступать для ММСК в качестве источника ионов кальция, фосфора, а также фосфатов кальция. Фосфаты кальция являются промоторами пролиферации остеобластов, вызывают их активацию [27], способствуют остеогенной дифференцировке ММСК [28]. При этом растворение фосфатов кальция является важным компонентом усиления их остеогенных свойств [29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что характеристики трехмерных биodeгра-

дируемых матриц PLA-НАР, полученных методом 3D-печати, во многом соответствуют физико-химическим параметрам, критичным для восстановления костной ткани. При небольшом содержании кальция и фосфора они способствуют *ex vivo* минерализации межклеточного вещества, формируемого в культуре ММСК жировой ткани человека. При 24-часовом контакте *in vitro* 3D-композиты PLA-НАР в отличие от PLA-образцов усиливают гибель лейкозных Т-лимфобластоподобных клеток человека линии Jurkat 5332, но не мононуклеарных лейкоцитов здорового добровольца.

Основная стратегия (иммуно)биотерапии лейкемии связана с индукцией апоптоза лейкозных клеток [30]. Полярная реакция здоровых и опухолевых клеток на образцы PLA-НАР в случае увеличения содержания фосфатов кальция и решения методических вопросов равномерности их распределения в композитном материале может иметь значение при разработке новых материалов для эндопротезирования и остеосинтеза переломов у больных, страдающих гемобластомами.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Работу с экспериментальными животными проводили в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985). Удостоверяем, что протокол исследования соответствовал этическим нормам и принципам биомедицинских исследований (решение локального этического комитета № 1923 от 15.03.2011 Сибирского государственного медицинского университета).

ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ

Авторы выражают признательность профессору Ю.П. Шаркееву и В.В. Чебодаевой (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск), а также канд. биол. наук В.В. Шуплецовой (Балтийский федеральный университет имени И. Канта, г. Калининград) за помощь в организации и проведении исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Volova T.G. Polyhydroxyalkanoates – Plastic materials of the 21st century: production, properties, application. NY: Nova Science Pub., 2004: 282.
2. Eling B., Gogolewski S., Pennings A.J. Biodegradable materials of poly(l-lactic acid): 1. Meltspun and solution spun fibers // *Polymer*. 1982; 23: 1587–1593.
3. Jukkala-Partio K., Laitinen O., Vasenius J., Partio E.K., Toivonen T., Tervahartiala P., Kinnunen J., Rokkanen P. Healing of subcapital femoral osteotomies fixed with self-reinforced poly-L-lactide screws. An experimental long-term study in sheep // *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 2022; 122: 360–364.
4. Загородний Н.В., Королев А.В., Ахпашев А.А., Гнелица Н.Н., Ильин Д.О., Хасаншин М.М., Лягин А.С. Поведение имплантатов в костной ткани в различные сроки согласно МРТ-исследованию // Режим доступа: <http://www.lechenie-sustavov.ru/patient/articles/povedenie-implantatov-v-kostnoj-tkani-v-razlichnye-sroki-soglasno-mrt-issledovaniyu/>
5. Shishatskaya E.I., Khlusov I.A., Volova T.G. A hybrid PHB-hydroxyapatite composite for biomedical application: production, *in vitro* and *in vivo* investigation // *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 2006; 17 (5): 481–498.
6. Tverdokhlebov S.I., Bolbasov E.N., Shesterikov E.V., Antonova L.V., Golovkin A.S., Matveeva V.G., Petlin D.G., Anissimov Y.G. Modification of polylactic acid surface using RF plasma discharge with sputter deposition of a hydroxyapatite target for increased biocompatibility // *Appl. Surf. Sci.* 2015; 329: 32–39.
7. Chaikina M.V., Uvarov N.F., Ulihin A.S., Khlusov I.A. Mechanochemical synthesis of nanosized functional materials with the apatite-type structure // *Problems of Materials Science.* 2008; 54 (2): 219–232.
8. Хлусов И.А., Карлов А.В., Суходоло И.В. Генез костной ткани на поверхности имплантатов для остеосинтеза // *Гений ортопедии.* 2003; 3: 16–26.
9. Khlusov I.A., Sharkeev Yu.P., Pichugin V.F., Legostaeva E.V., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Sokhonevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Khlusova M.Yu., Gutor S.S., Tolkacheva T.V. Influence of the Structure of the Titanium Oxide Coating Surface on Immunocompetent Tumor Cells // *Russian Physics Journal.* 2016; 58 (11): 1527–1533.
10. Bykova Iu., Weinhardt V., Kashkarova A., Lebedev S., Baumbach T., Pichugin V., Zaitsev K., Khlusov I. Physical properties and biocompatibility of UHMWPE-derived materials modified by synchrotron radiation // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2014; 25 (8): 1843–1852. doi: 10.1007/s10856-014-5222-4.
11. Owens D.K., Wendt R.C. Estimation of the surface free energy of polymers // *J. Appl. Polym. Sci.* 1969; 13: 1741–1747.
12. Kfoury Y., David T., Scadden D.T. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche // *Cell Stem Cell.* 2015; 16: 239–253.

13. Steward A.J., Liu Y., Wagner D.R. Engineering cell attachments to scaffolds in cartilage tissue engineering // *Biomater. Regen. Med. Eng.* 2011; 63: 74–82.
14. Khlusov I.A., Karlov A.V., Sharkeev Yu.P., Pichugin V.F., Kolobov Yu.R., Shashkina G.A., Ivanov M.B., Legostaeva E.V., Sukhikh G.T. Osteogenic potential of mesenchymal stem cells from bone marrow in situ: role of physicochemical properties of artificial surfaces // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005; 140 (1): 144–152.
15. Tverdokhlebov S.I., Stankevich K.S., Bolbasov E.N., Khlusov I.A., Kulagina I.V., Zaytsev K.V. Nonwoven polylactide scaffolds obtained by solution blow spinning and the in vitro degradation dynamics // *Advanced Materials Research*. 2014; 872: 257–263.
16. Khlusov I.A., Khlusova M.Y., Pichugin V.F., Sharkeev Y.P., Legostaeva E.V. Artificial Niches for Stromal Stem Cells as a Potential Instrument for the Design of the Surface of Biomimetic Osteogenic Materials // *Russian Physics Journal*. 2014; 56 (10): 1206–1211.
17. Hallab N.J., Bundy K.J., O'Connor K., Moses R.L., Jacobs J.J. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion // *Tissue Eng.* 2001; 7: 55–71.
18. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 2nd edition / Eds. B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, & J.E. Lemons. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004; 851 p.
19. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Хлусов И.А. Роль вегетативной нервной системы в регуляции гемопоэза. Томск, 1997; 218 с.
20. Stevens M.J., Donato L.J., Lower S.K., Sahai N. Oxide-dependent adhesion of the Jurkat line of T lymphocytes // *Langmuir*. 2009; 25 (11): 6270–6278. doi: 10.1021/la8040192.
21. Terui Y., Ikeda M., Tomizuka H., Kasahara T., Ohtsuki T., Uwai M., Mori M., Itoh T., Tanaka M., Yamada M., Shimamura S., Ishizaka Y., Ikeda K., Ozawa K., Miura Y., Hatake K. Activated endothelial cells induce apoptosis in leukemic cells by endothelial interleukin-8 // *Blood*. 1998; 92 (8): 2672–2680.
22. Хлусов И.А., Сурменова М.А., Сурменев Р.А., Рязанцева Н.В., Савельева О.Е., Иванова А.А., Прохоренко Т.С., Таширева Л.А., Дворниченко М.В., Пичугин В.Ф. Клеточно-молекулярные аспекты иммунологической совместимости имплантатов с наноструктурным кальцийфосфатным покрытием // *Бюл. сиб. медицины*. 2012; 4: 78–85.
23. Хлусов И.А., Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., Дунец Н.А., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Хлусова М.Ю., Шаркеев Ю.П. Морфофункциональные изменения Т-лимфоцитов линии Jurkat при краткосрочной контакте с рельефной кальцийфосфатной поверхностью // *Цитология*. 2017; 11 (1) (в печати).
24. Oreffo R.O.C., Driessens F.C.M., Planell J.A., Triffitt J.T. Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements // *Biomaterials*. 1998; 19: 1845–1854.
25. Kolf C.M., Cho E., Tuan R.S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation // *Arthritis Res. Ther.* 2007; 9: 204–219.
26. Риггз Б.Л., Мелтон Л.Дж. Остеопороз: пер. с англ. СПб.: БИНОМ, Невский диалект, 2000. 560 с.
27. Kim H.M., Miyaji F., Kokubo T., Nakamura T. Bonding strength of bonelike apatite layer to Ti metal substrate // *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 38: 121–127.
28. Khlusov I.A., Shevtsova N.M., Khlusova M.Y. Detection *in vitro* and quantitative estimation of artificial microterritories which promote osteogenic differentiation and maturation of stromal stem cells // *Methods Mol. Biol.* 2013; 1035: 103–119. doi: 10.1007/978-1-62703-508-8_9.
29. Damien C.J., Ricci J.L., Christel P., Alexander H., Patat J.L. Formation of a calcium phosphate-rich layer on absorbable calcium carbonate bone graft substitutes // *Calcif Tissue Int.* 1994; 55: 151–158.
30. Fisher D.E. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold // *Cell*. 1994; 78: 539–542.

Поступила в редакцию 01.09.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

Дружинина Татьяна Валентиновна, канд. мед. наук, ФГУП «Экспериментально-производственные мастерские» ФМБА России, г. Москва.

Талалаев Сергей Яковлевич, зам. директора по науке, ФГУП «Экспериментально-производственные мастерские» ФМБА России, г. Москва.

Закиров Назар Пулатович, первый заместитель директора, ФГУП «Экспериментально-производственные мастерские» ФМБА России, г. Москва.

Щаденко Сергей Владимирович, ассистент кафедры промышленной и медицинской электроники НИ ТПУ; зав. лабораторией медицинской электроники СибГМУ, г. Томск.

Хабибулин Шамиль Александрович, канд. техн. наук, инженер центра управления научно-исследовательским оборудованием НИ ТПУ, г. Томск.

Хлусов Игорь Альбертович, д-р мед. наук, профессор кафедры морфологии и общей патологии, СибГМУ; профессор кафедры экспериментальной физики, НИ ТПУ; директор ООО «Биоконструктор-С», г. Томск.

Литвинова Лариса Сергеевна, д-р мед. наук, зав. лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий Инновационного парка Балтийского федерального университета им. И. Канта, г. Калининград.

✉ Хлусов Игорь Альбертович, e-mail: khlusov63@mail.ru

УДК 591.477.35:612.014.44:599.323.4
DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-16–29

For citation: Druzhinina T.V., Talalaev S.Ya., Zakirov N.P., Shchadenko S.V., Khabibulin Sh.A., Khlusov I.A., Litvinova L.S. Cellular reactions on three-dimensional matrices of polylactide acid and hydroxyapatite prepared by 3D-printing. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 16–29

Cellular reactions to three-dimensional matrices of polylactic acid and hydroxyapatite generated by 3D-printing

T.V. Druzhinina¹, S.Ya. Talalaev¹, N.P. Zakirov¹, S.V. Shchadenko^{2,3}, Sh.A. Khabibulin³, I.A. Khlusov^{2,4}, L.S. Litvinova⁵

¹ Federal State Unitary Enterprise “Experimental production workshops”, Federal Medical and Biological Agency 5/2, Schukinskaya Str., Moscow, 123182, Russian Federation

² Siberian State Medical University 2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

³ National Research Tomsk Polytechnic University 30, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

⁴ Bioconstructor-S Ltd. 31, Sibirskaya Str., Tomsk, 634061, Russian Federation

⁵ Immanuel Kant Baltic Federal University 14A, Nevskiy Str., Kaliningrad, 236041, Russian Federation

ABSTRACT

The purpose of this study is to estimate Ex vivo physicochemical and biological features of three-dimensional (3D) biodegradable matrices “polylactic acid/calcium phosphates” (hereafter 3D composites) designed with the help of additive technologies (3D printing) as potential materials for bone tissue regeneration.

Materials and methods. Experimental samples (disks 1,2–1,6 mm thick, and 11 mm or 8 mm in diameter) of composite biodegradable 3D matrices (hereafter 3D composites) have been produced from initial mixture of 95 mas% polylactic acid (PLA) and 5 mas% hydroxyapatite (HAP). Computer-aided design method, Blender software and fused filament fabrication (FFF; fiber diameter 1,75 mm) with 3D printing were used in sample production. 100 mas% PLA disks served as control. One of the sample surfaces was textured with 0,3–0,5 mm wide grooves. Physicochemical properties of 11 mm disks (geometry, mass, morphology, roughness, electrostatic voltage, surface wettability, and element composition) were studied. Biological trials included the evaluation of 24-hour cytotoxicity of 8 mm samples in culture of mononuclear leukocytes of a healthy volunteer or human Jurkat T cell leukemia-derived cell line (hereafter Jurkat T cells). Moreover, osteogenic potential of 11 mm disks was determined in 21-day culture of human adipose-derived multipotent mesenchymal stem cells (AMMSCs) by means of osteocalcin secretion and intercellular matrix mineralization visualized by alizarin red S staining.

Results. The features of PLA-HAP 3D composites generated by 3D printing correspond to physicochemical parameters which are crucial for bone tissue recovery. In case of small amount of calcium and phosphorus they facilitated ex vivo mineralization of extracellular matrix formed in AMMSCs culture. The number of died (by necrosis, mainly) leukemic Jurkat T cells but not mononuclear leukocytes of a health volunteer increased to 9–10% in 24-hour in vitro contact with PLA-HAP 3D composites unlike PLA samples alone.

Conclusion. Polar reaction of tumor and normal cells to PLA-HAP samples in case of increasing amount of calcium phosphates in 3D-composite may be valuable for the development of new materials used for osteosynthesis of fractures and endoprosthesis in patients with hematological malignancies.

Key words: 3D-simulation, prototyping, biodegradable disks, *in vitro*, cytotoxicity, stromal stem cells, osteocalcin secretion, alizarin red staining.

REFERENCES

- Volova T.G. Polyhydroxyalkanoates – Plastic materials of the 21st century: production, properties, application. NY: Nova Science Pub., 2004. 282 p.
- Eling B., Gogolewski S., Pennings A.J. Biodegradable materials of poly(l-lactic acid): 1. Meltspun and solution spun fibers // *Polymer*. 1982; 23: 1587–1593.
- Jukkala-Partio K., Laitinen O., Vasenius J., Partio E.K., Toivonen T., Tervahartiala P., Kinnunen J., Rokkanen P. Healing of subcapital femoral osteotomies fixed with self-reinforced poly-L-lactide screws. An experimental long-term study in sheep // *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 2022; 122: 360–364.
- Zagorodnii N.V., Korolev A.V., Ahpashev A.A., Gnelitsa N.N., Ilyin D.O., Khasanshin M.M., Liagin A.S. Povedenie implantatov v kostnoi tkani v hzlichnye sroki soglasno MRT-issledovaniyu [Implants behavior in bone tissue at different periods according to MRT investigation]. Available at: <http://www.lechenie-sustavov.ru/patient/articles/povedenie-implantatov-v-kostnoj-tkani-v-razlichnye-sroki-soglasno-mrt-issledovaniyu/> (in Russian).
- Shishatskaya E.I., Khlusov I.A., Volova T.G. A hybrid PHB-hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation // *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 2006; 17 (5): 481–498.
- Tverdokhlebov S.I., Bolbasov E.N., Shesterikov E.V., Antonova L.V., Golovkin A.S., Matveeva V.G., Petlin D.G., Anissimov Y.G. Modification of polylactic acid surface using RF plasma discharge with sputter deposition of a hydroxyapatite target for increased biocompatibility // *Appl. Surf. Sci.* 2015; 329: 32–39.
- Chaikina M.V., Uvarov N.F., Ulihin A.S., Khlusov I.A. Mechanochemical synthesis of nanosized functional materials with the apatite-type structure // *Problems of Materials Science*. 2008; 54 (2): 219–232.
- Khkusov I.A., Karlov A.V., Soukhodolo I.V. Genez kostnoi tkani na poverhnosti implantatov dlya osteosinteza [Bone tissue genesis on the surface of the implants for osteosynthesis] // *Genii ortopedii, Genius of Orthopedics*, 2003; 3: 16–26 (in Russian).
- Khkusov I.A., Sharkeev Yu. P., Pichugin V.F., Legostaeva E.V., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Sokhnevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Khlusova M.Yu., Gutor S.S., Tolkacheva T.V. Influence of the Structure of the Titanium Oxide Coating Surface on Immunocompetent Tumor Cells // *Russian Physics Journal*. 2016; 58 (11): 1527–1533.
- Bykova Iu., Weinhardt V., Kashkarova A., Lebedev S., Baumbach T., Pichugin V., Zaitsev K., Khkusov I. Physical properties and biocompatibility of UHMWPE-derived materials modified by synchrotron radiation // *J. Mater. Sci. Mater Med.* 2014; 25 (8): 1843–1852. doi: 10.1007/s10856-014-5222-4.
- Owens D.K., Wendt R.C. Estimation of the surface free energy of polymers // *J. Appl. Polym. Sci.* 1969; 13: 1741–1747.
- Kfoury Y., David T., Scadden D.T. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche // *Cell Stem Cell*. 2015; 16: 239–253.
- Steward A.J., Liu Y., Wagner D.R. Engineering cell attachments to scaffolds in cartilage tissue engineering // *Biomater. Regen. Med. Eng.* 2011; 63: 74–82.
- Khkusov I.A., Karlov A.V., Sharkeev Yu.P., Pichugin V.F., Kolobov Yu.R., Shashkina G.A., Ivanov M.B., Legostaeva E.V., Sukhikh G.T. Osteogenic potential of mesenchymal stem cells from bone marrow in situ: role of physicochemical properties of artificial surfaces // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005; 140 (1): 144–152.
- Tverdokhlebov S.I., Stankevich K. S., Bolbasov E. N., Khkusov I. A., Kulagina I. V., Zaytsev K. V. Nonwoven polylactide scaffolds obtained by solution blow spinning and the in vitro degradation dynamics // *Advanced Materials Research*. 2014; 872: 257–263.
- Khkusov I.A., Khlusova M.Y., Pichugin V.F., Sharkeev Y.P., Legostaeva E.V. Artificial Niches for Stromal Stem Cells as a Potential Instrument for the Design of the Surface of Biomimetic Osteogenic Materials // *Russian Physics Journal*. 2014; 56 (10): 1206–1211.
- Hallab N.J., Bundy K.J., O'Connor K., Moses R.L., Jacobs J.J. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion // *Tissue Eng.* 2001; 7: 55–71.
- Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 2nd edition / Eds. B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, & J.E. Lemons. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004; 851 p.
- Goldberg E.D., Digai A.M., Khkusov I.A. Rol vegetativnoi nervnoi sistemi v regulyatsii gemopoeza [The role of autonomous nervous system in hemopoiesis regulation]. Tomsk, 1997. 218 p. (in Russian).
- Stevens M.J., Donato L.J., Lower S.K., Sahai N. Oxide-dependent adhesion of the Jurkat line of T lymphocytes // *Langmuir*. 2009; 25 (11): 6270–6278. doi: 10.1021/la8040192.
- Terui Y., Ikeda M., Tomizuka H., Kasahara T., Ohtsuki T., Uwai M., Mori M., Itoh T., Tanaka M., Yamada M., Shimamura S., Ishizaka Y., Ikeda K., Ozawa K., Miura Y., Hatake K. Activated endothelial cells induce apoptosis in leukemic cells by endothelial interleukin-8 // *Blood*. 1998; 92 (8): 2672–2680.
- Khkusov I.A., Surmeneva M.A., Surmenev R.A., Ryazantseva N.V., Savelieva O.E., Ivanova A.A., Prokhorenko T.S., Tashireva L.A., Dvornichenko M.V., Pichugin V.F. Kletочно-molekulyarnye aspekty immunologicheskoi sovmestimosti implantatov s nanostrukturnym kalcii-fosfatnym pokrytiem [Cellular and molecular aspects of immunologic compatibility of implants with nanostructured calcium phosphate coating] // *Biulleten sibirskoi meditsiny – Bulletin of Siberian Medicine*, 2012; 4: 78–85 (in Russian).
- Khkusov I.A., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Dunets N.A., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Khkusov

- va M.Yu., Sharkeev Yu.P. Morphofunctional changes of Jurkat line lymphoblasts at short-term contact with relief calcium phosphate surface // *Cell and Tissue Biology*. 2017; 11 (1) (in press) (in Russian).
24. Oreffo R.O.C., Driessens F.C.M., Planell J.A., Triffitt J.T. Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements // *Biomaterials*. 1998; 19: 1845–1854.
 25. Kolf C.M., Cho E., Tuan R.S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation // *Arthritis Res. Ther.* 2007; 9: 204–219.
 26. Riggs B.L., Melton III L.J. Osteoporosis. Etiology, diagnosis, and management, second edn. Lippincott-Raven Publ., Philadelphia, New York, 1996 (Russ. ed.: Riggs B.L., Melton L.D. Osteoporoz: per. s angl. SPb., ZAO Izdatelstvo BINOM Publ., Nevskii dialect Publ., 2000; 560 p.) (in Russian).
 27. Kim H.M., Miyaji F., Kokubo T., Nakamura T. Bonding strength of bonelike apatite layer to Ti metal substrate // *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 38: 121–127.
 28. Khlusov I.A., Shevtsova N.M., Khlusova M.Y. Detection in vitro and quantitative estimation of artificial microterritories which promote osteogenic differentiation and maturation of stromal stem cells // *Methods Mol. Biol.* 2013; 1035: 103–119. doi: 10.1007/978-1-62703-508-8_9.
 29. Damien C.J., Ricci J.L., Christel P., Alexander H., Pataat J.L. Formation of a calcium phosphate-rich layer on absorbable calcium carbonate bone graft substitutes // *Calcif Tissue Int.* 1994; 55: 151–158.
 30. Fisher D.E. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold // *Cell*. 1994; 78: 539–542.

Received September 01.2016

Accepted December 01.2016

Druzhinina Tatiana V., PhD, Researcher, Federal State Unitary Enterprise “Experimental production workshops” of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation.

Talalaev Sergey Ya., Deputy Director for Science, Federal State Unitary Enterprise «Experimental production workshops» of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation.

Zakirov Nazar P., First Deputy Director, Federal State Unitary Enterprise «Experimental production workshops» of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation.

Shchadenko Sergey V., Assistant, Department of Industrial and Medical Electronics, Tomsk Polytechnic University; Head of Laboratory Medical Electronics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Khabibulin Shamil A., PhD, Engineer Control Center Research Equipment, Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

Khlusov Igor A., MD, Professor, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Department of Experimental Physics, Tomsk Polytechnic University, Head of Bioconstructor-S Ltd., Tomsk, Russian Federation.

Litvinova Larisa S., MD, Head of Laboratory Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

(✉) **Khlusov Igor A.**, e-mail: khlusov63@mail.ru