

УДК 57.085.23

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ *IN VITRO* КОНТАКТЕ С КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫМ ПОКРЫТИЕМ В ПРИСУТСТВИИ Т-КЛЕТОЧНОГО АКТИВАТОРА

© 2020 г. Л. С. Литвинова<sup>1</sup>\*, Е. С. Мелашенко<sup>1</sup>, О. Г. Хазиахматова<sup>1</sup>, К. А. Юрова<sup>1</sup>, Ю. П. Шаркеев<sup>2,3</sup>, Е. Г. Комарова<sup>3</sup>, М. Б. Седельникова<sup>3</sup>, Н. М. Тодосенко<sup>1</sup>, И. А. Хлусов<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>Центр иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. И. Канта, Калининград, 236041 Россия

<sup>2</sup>Исследовательская школа физики высокоэнергетических процессов Томского политехнического университета, Томск, 634050 Россия

<sup>3</sup>Лаборатория физики наноструктурных биоконструкций Института физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, 634055 Россия

<sup>4</sup>Кафедра морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета, Томск, 634050 Россия

<sup>5</sup>Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий Томского политехнического университета, Томск, 634050 Россия

\*E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.04.2020 г.

После доработки 24.04.2020 г.

Принята к публикации 28.04.2020 г.

Изучена морфофункциональная активность Т-лимфоцитов при *in vitro* контакте с КФ-покрытием в присутствии частиц с антителами к антигенам CD2, CD3 и CD28. Пластины из титана VT1-0 ( $10 \times 10 \times 1 \text{ мм}^3$ ) с двусторонним микродуговым шероховатым (индекс  $R_a = 2\text{--}5 \text{ мкм}$ ) КФ-покрытием использовали в качестве модельных образцов минерального матрикса костной ткани. Магнитные частицы (MACSiBead™ T-Cell Activation/Expansion Kit human) с антителами к антигенам CD2, CD3 и CD28 применяли как Т-клеточный активатор (ТКА), симулирующий сигналы антигенпрезентирующих клеток (АПК). Мононуклеарные клетки (МНК), выделенные из крови человека (98.8% клеток CD45CD3<sup>+</sup>), культивировали в присутствии образцов с КФ-покрытием и (или) ТКА ( $2 \times 10^6$  частиц в 1.5 мл питательной среды в пропорции с клетками 2 : 1) в течение 2-х и 14 сут. КФ-покрытие и ТКА синергично запускали адаптацию культуры МНК через механизмы гиперактивации и последующей гибели Т-лимфоцитов. Иммуносеlection была обусловлена накоплением наивных Т-лимфоцитов CD45RA<sup>+</sup>/RO<sup>+</sup> и Т-клеток памяти с одновременным истощением пула Т-клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>. Изменение субпопуляций Т-лимфоцитов сопровождалось усилением (через 48 ч культивирования) секреторной активности клеток с последующим ее снижением к 14 суткам наблюдения. КФ-покрытие поддерживало (в сравнении с культурой клеток на пластике) секреторную способность лимфоцитов Th1 (IL-12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) и Th2 (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13). В то же время, длительный сигнал ТКА после 48-часовой активации приводил к истощению секреции Т-клетками. Обсуждается предположение, что обнаруженные *in vitro* эффекты могут иметь значение в переключении сигналинга между Т-лимфоцитами, АПК и КФ-материалами на границе раздела клетка–инородное тело, исходом которого может быть смена фаз воспаления (регенерация), развитие иммунной толерантности, успешная остеоинтеграция имплантата или нарушение ремоделирования костной ткани.

**Ключевые слова:** мононуклеарные лейкоциты крови человека, краткосрочная и длительная культура, жизнеспособность, иммунофенотип, цитокины, анти-CD2CD3CD28 частицы, микродуговое кальцийфосфатное покрытие

**DOI:** 10.31857/S0041377120080039

Иммунокомпетентные клетки крови принимают непосредственное участие в процессах воспаления, ангио- и остеогенеза (Loi et al., 2016; Schell et al., 2017). Эти процессы, в конечном итоге, приводят к регенерации (ремоделированию) костной ткани, приживлению имплантата или, при неблагоприят-

ном сценарии, к его отторжению вследствие остеолизиса. В отличие от продуктивного воспаления, протекающего в различных внутренних органах и завершающегося во взрослом организме, как правило, формированием рубца, гранулематозное воспаление в условиях физиологической или репаративной (по-

сле имплантации) регенерации в кости приводит к образованию новой костной ткани (Hoff et al., 2016). В связи с этим в последние годы сформировалась новая концепция, получившая название “остеоиммунология” (Arron, Choi, 2000; Greenblatt, Shim, 2013).

Однако публикационная активность в области исследования клеточно-молекулярных механизмов воспаления (регенерации) в костной ткани, индуцированных иммунокомпетентными клетками (Humbert et al., 2019), относится преимущественно к исследованиям *in vitro* с использованием стационарной двумерной (2D) культуры клеток.

2D-культивирование клеток применяется уже более 100 лет. Тем не менее, клеточные культуры, растущие на пластиковых поверхностях, не воспроизводят поведение клеток *in vivo*. Благодаря трехмерной (3D) пространственной симуляции реакция клеток в условиях *in vitro* значительно приближается к физиологическим параметрам жизнедеятельности (Коршунов, Кондакова, 2016).

Проблемой 3D-культивирования является создание трехмерных конструкций, максимально приближающихся по своим свойствам к природному экстрацеллюлярному матриксу (ЭЦМ) различных органов и тканей. В этом плане наиболее успешным технологическим решением в области имитации минерального вещества костной ткани являются кальцийфосфатные (КФ) материалы, успешно применяющиеся в эксперименте и клинике (Шаркеев и др., 2014).

Костная ткань находится в постоянном процессе ремоделирования (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil et al., 2006; Crockett et al., 2011) на основе механизмов физиологической или репаративной регенерации (Crockett et al., 2011). В последние годы преимущество значение уделяется регуляторной роли различных субпопуляций макрофагов в кости и костном мозге: резидентным, так называемым остеомacroфагам (osteomacs), про- (M1) и противовоспалительным (M2) их подтипам (Loi et al., 2016; Vatoon et al., 2017; Иванюк и др., 2018). В то же время, хоминг Т-лимфоцитов в зону повреждения происходит раньше моноцитов, приводит к их активации антигенпрезентирующими клетками (АПК) (Mitchell, 2004), что способствует привлечению инфильтрирующих макрофагов, необходимых для усиления воспаления и последующей регенерации (Yuan et al., 2019). Модулирование взаимодействия АПК и Т-клеток с помощью анти-CD2CD3CD28-частиц уже проводится *in vivo* в трансплантологии (Chavin et al., 1993). Тем не менее, не ясен длительный клеточно-молекулярный сигналинг между Т-лимфоцитами, АПК и КФ-материалами на границе раздела клетка–ино-

родное тело, исходом которого является смена фаз воспаления и, соответственно, приживление или отторжение имплантата (Nepola, 1994).

В связи с вышесказанным, цель настоящей работы заключалась в изучении морфофункциональной активности Т-лимфоцитов при *in vitro* контакте с КФ-материалом в присутствии частиц с антителами к антигенам CD2, CD3 и CD28.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Образцы модельных матриксов.** 3D-культуры клеток *in vitro* получали на пластинах из коммерчески чистого титана ВТ1-0 ( $10 \times 10 \times 1 \text{ мм}^3$ ), несущего рельефное двустороннее КФ-покрытие (с индексом шероховатости поверхности  $R_a$  в пределах 2–5 мкм). КФ-покрытие формировали методом микродугового оксидирования с использованием установки Мi-стоагс-3.0 (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск) в анодном режиме. Электролит состоял из водного раствора ортофосфорной кислоты (20 мас. %), карбоната кальция (9 мас. %) и синтетического гидроксиапатита (ГАП, 6 мас. %). Порошок ГАП с диаметром частиц 40–100 нм получен механохимическим способом. Получение и свойства микродугового КФ-покрытия описаны ранее (Khlusov et al., 2018).

Перед тестированием биологической активности изготовленные образцы стерилизовали в сухожаровом шкафу (Sanyo, Япония) при 160°C в течение 1 ч.

**Выделение клеток.** Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из лейкоцези здорового донора (Заклучение № 2 от 06.03.2017 г. Локального этического комитета; Инновационный парк Балтийского федерального университета им. И. Канта) стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности ( $\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$ ) фиколл-урографин (Pharmacia, Швеция) с последующей двукратной отмывкой в фосфатном буфере. Жизнеспособность клеток после выделения составляла 96%.

Для получения культур МНК в концентрации  $1 \times 10^6$  кл./лунку культивировали в 12-луночных планшетах (Orange Scientific, Бельгия) в 1.5 мл полной питательной среды (все компоненты от фирмы Sigma-Aldrich, США), состоявшей из 90% среды  $\alpha$ -MEM, 10% инактивированной (при 56°C в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров, 0.3 г/л L-глутамина, 100 Ед/мл смеси пенициллина и стрептомицина. Культивирование проводили в течение 2-х и 14 сут при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Контролем служила клеточная взвесь на пластике без добавления в лунку образца с КФ-покрытием (2D-культивирование). Для активационной модели в клеточную взвесь 1 раз добавляли 10 мкл ( $2 \times 10^6$ ) анти-биотиновых MACSiBead™ магнитных частиц T-CellActivation/ExpansionKithuman с антителами к антигенам CD2, CD3 и CD28 (Miltenyi Biotec, Германия). Анти-биотиновые частицы MACSiBead™, нагруженные антителами, ис-

**Принятые сокращения:** АПК – антигенпрезентирующие клетки; ГАП – гидроксиапатит; КФ – кальцийфосфатный; МНК – мононуклеарные клетки; ТКА – Т-клеточный активатор; ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс; CD – кластерные детерминанты; NFAT – ядерный фактор транскрипции; TCR – Т-клеточный рецептор; Th1 и Th2 – Т-хелперы 1-го и 2-го типа соответственно.

пользуются в качестве активатора для покоящихся Т-клеток, так как имитируют стимулирующий сигнал АПК. Соотношение МНК и активирующих частиц составляло 1 : 2. В длительной 14-суточной культуре осуществляли замену питательной среды каждые 3–4 сут.

После культивирования клеточную взвесь центрифугировали при 500 g в течение 15 мин. Клеточный осадок использовали для оценки апоптоза, некроза, презентации мембранных антигенов, надосадочную жидкость (супернатант) – для определения концентрации цитокинов.

**Тестирование жизнеспособности клеток.** Процентное соотношение живых и погибших (апоптотических и некротических) МНК и общее количество клеток в пробе определяли с помощью набора реагентов FITC ANNEXIN V (Abcam, США) методом проточной цитофлуориметрии на аппарате MACS Quant (MiltenyiBiotec, Германия).

**Оценка иммунофенотипа (мембранных антигенов).** Использовали метод проточной цитофлуориметрии (проточный цитофлуориметр MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия)), основанный на взаимодействии специфических моноклональных антител с кластерными детерминантами на клеточных мембранах, в соответствии с инструкцией производителя. Неприлипающие клетки отмывали фосфатным буфером (pH 7.2) и в объеме 50 мкл связывали их со стандартными моноклональными антителами, меченными флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), фикоэритрином (PE) или перидининовым белком хлорофилла (Per-CP) (Abcam, Великобритания; e-Bioscience, США), к маркерам CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD45RA. После 15-минутной инкубации в фосфатном буфере с антителами клетки анализировали на проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия). Оценивали параметры оранжевой, зеленой и красной флуоресценции в гейте изучаемых клеток, определяли долю клеток, презентующих определенные антигенные детерминанты. Результаты цитометрического анализа анализировали с помощью программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США).

**Количественное определение цитокинов.** Содержание интерлейкинов IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, интерферона IFN- $\gamma$  и фактора некроза опухоли TNF- $\alpha$  в клеточных супернатантах, полученных центрифугированием при 1000 g в течение 15 мин на холоду (4°C), оценивали методом проточной флуориметрии, используя двухлучевой лазерный автоматизированный анализатор (Bio-Plex Protein Assay System, Luminex 200, Bio-Rad, США). Все процедуры очищения, отмывки супернатантов из клеточных культур, а также связывания и обнаружения целевых цитокинов проводили с использованием коммерческой тест-системы Bio-Plex Pro Human cytokine Group II 21-Plex Panel (Bio-Rad, США), согласно коммерческому протоколу. Считывание результатов проводили на автоматическом анализаторе для микро-

планшетов Bio-Plex (Bio-Plex® Luminex 200 Systems, Bio-Rad, США) с использованием программы Bio-Plex Manager (Bio-Rad, США). Для каждого набора концентрацию исследуемого цитокина определяли по калибровочной кривой (определяемый динамический диапазон составлял 2–32000 пг/мл) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

**Статистическая обработка результатов.** Использовали программу IBM SPSS Statistics 20. При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова–Смирнова). Для каждой выборки достоверность оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни ( $P$ ), а также Т-критерия Вилкоксона ( $P_T$ ) для зависимых выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Лейкоциты, мигрирующие из крови в ткани, секретируют различные про- и противовоспалительные цитокины, хемокины и факторы роста, чтобы привлечь другие клетки воспаления, стимулировать неоваскуляризацию, хемотаксис и дифференцировку стромальных стволовых клеток и, таким образом, регулировать в течение 2 нед. интенсивность острого и хронического воспаления (Loi et al., 2016), приводящего, в конечном итоге, к ремоделированию очага повреждения (Yuan et al., 2006; Barradas et al., 2011). При этом основная часть исследователей ограничивается изучением функциональной активности лейкоцитов в ранние сроки их культивирования *in vitro*.

В случае растянутой во времени (3–10 лет; Риггз и др., 2000) физиологической мозаичной регенерации кости в оптимальных условиях жизнедеятельности организма иммунокомпетентные клетки (прежде всего, Т-лимфоциты) малоактивны в тканях (Гольдберг и др., 1996). Для исследования закономерностей функционирования МНК в подобных условиях была разработана *in vitro* 3D-гомеостатическая модель сокультивирования иммунных клеток с искусственным ЭЦМ, имитирующим в трехмерном масштабе минеральное вещество костной ткани.

При репаративной регенерации включаются механизмы адаптации к экстремальному раздражителю, вызвавшему повреждение, и активируется локальное микроокружение, которое посредством гуморальных факторов способствует усиленной инфильтрации клетками крови (Гольдберг и др., 1996). Такую ситуацию мы экспериментально моделировали с помощью молекулярно-биологического подхода, названного активационной моделью и основанного на антиген-независимой активации Т-лимфоцитов, достигаемой добавлением в *in vitro* культуру МНК Т-клеточного активатора (ТКА: T-cell activation/expansion kit human), содержащего частицы с антителами к антигенам CD2, CD3, CD28, которые симулируют процесс стимуляции Т-клеток со стороны АПК. Для костной ткани применяли комбина-

**Таблица 1.** Жизнеспособность (ЖС) неприлипающих МНК крови человека в различные сроки культивирования *in vitro*

Показатель ЖС, %	Гомеостатическая модель культивирования клеток		Активационная модель культивирования	
	1 (2D-культура)	2 (3D-культура)	3 (2D-культура)	4 (3D-культура)
2 сут культивирования, <i>n</i> = 6				
Живые клетки	87.45 (84.62; 88.55)	70.20 (67.90; 71.00)	80.65 (80.17; 82.25)	64.95 (57.50; 69.90)
Апоптоз	1.80 (1.25; 2.05)	2.50 (2.40; 3.90)	2.70 (2.37; 3.35)	4.10 (3.10; 5.00)
Некроз	11.05 (9.40; 13.82)	26.90 (25.40; 28.20)	15.75 (15.00; 17.25)	31.25 (26.40; 36.00)
14 сут культивирования, <i>n</i> = 6				
Живые клетки	69.14 (55.00; 82.14)	16.67 (15.38; 37.50)	90.35 (89.45; 90.40)	82.99 (81.57; 83.36)
Апоптоз	13.58 (8.93; 13.75)	12.50 (8.33; 15.38)	5.80 (5.69; 6.18)	9.55 (9.11; 10.07)
Некроз	17.28 (8.93; 31.25)	69.23 (50.00; 75.00)	3.80 (3.46; 4.86)	7.53 (6.94; 8.88)
		<sup>1</sup> <i>P</i> < 0.05	<sup>1</sup> <i>P</i> < 0.05	<sup>3</sup> <i>P</i> < 0.05

Примечание к табл. 1–3. Данные проточной (цито)флуорометрии с использованием соответствующих моноклональных антител; *n* – число исследованных проб (лунок планшета); для каждой группы вычисляли средневыворочные характеристики: медиану (М), первый и третий квартили (Q1 и Q3). <sup>1</sup>*P*, <sup>2</sup>*P*, <sup>3</sup>*P* – статистические различия с клеточной культурой 1, 2, 3 соответственно (U-критерий Манна–Уитни).

цию гуморального сигнала АПК с 3D-матриksom, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани.

Согласно полученным данным, при добавлении в культуру МНК частиц с антителами к антигенам CD2, CD3 и CD28 для активации и экспансии покоящихся Т-лимфоцитов (имитация сигналов АПК) через 2 сут культивирования значительно снижалась (на 7%) доля жизнеспособных клеток, что было обусловлено усилением их гибели путем апоптоза (на 0.9%) и некроза (на 4.5%) в сравнении с гомеостатической 2D-культурой (табл. 1).

Тем не менее, общая клеточность культуры возрастала с  $2.97 \times 10^5$  кл./мл до  $5.41 \times 10^5$  кл./мл (в 1.8 раза; *P* < 0.05). Как следствие, повышенная гибель неприлипающих МНК в ранние сроки культивирования на фоне прироста клеточной популяции была расценена как известный феномен “смерть клетки через гиперактивацию” (Massanella et al., 2010). Она может быть связана с клеточной адаптацией к неоптимальным условиям жизнедеятельности (Браун, Моженко, 1987).

Действительно, через 14 сут наблюдения в 2D-активационной культуре доля живых МНК, напротив, уже на 21% (*P* < 0.05) превышала значение в обычной культуре клеток на пластике (2D-гомеостатическая модель) при сниженном в 2–4 раза числе погибших

лейкоцитов (табл. 1). Таким образом, гуморальная имитация сигнала АПК способствует длительному выживанию МНК.

Присутствие 3D-матрикса с КФ покрытием в 2-суточной гомеостатической культуре МНК способствовало значительному уменьшению (на 17%) клеточной жизнеспособности, обусловленной усилением апоптоза (на 0.7%) и, в большей степени, некроза (на 16%) в сравнении 2D-культурой. Сходные изменения отмечены в активационной 3D-культуре на фоне стимулирующего эффекта ТКА (табл. 1). Через 14 сут выживаемость неприлипающих лейкоцитов в 3D-гомеостатической культуре достигала критических значений (17% при 69% в 2D-контроле, табл. 1). Была выдвинута гипотеза, что эффект 3D-матрикса не связан с проявлением их цитотоксичности. КФ-материалы, имитирующие минеральное вещество костной ткани, являются структурным раздражителем, запускающим *ex vivo* физиологические механизмы адаптации культуры МНК через механизмы гиперактивации и последующей гибели неприлипающей части популяции (преимущественно, наивных Т-лимфоцитов). Подобные процессы характерны для Т-клеток, например, при реакции на стресс и введении глюкокортикоидов. Косвенно гипотеза подтверждалась наблюдением того, что к 14-м сут (табл. 1) выживаемость МНК, стимулированных ТКА в 3D-культуре, значительно увеличивалась по

**Таблица 2.** Иммунофенотип лимфоцитов CD3<sup>+</sup> в популяции неприлипающих МНК крови человека в различные сроки культивирования *in vitro*

Гомеостатическая модель культивирования				Активационная модель культивирования			
1 (CD4)	2 (CD8)	3 (CD45RA)	4 (CD45RO)	5 (CD4)	6 (CD8)	7 (CD45RA)	8 (CD45RO)
2 суток культивирования							
<sup>a</sup> МНК на пластиковой поверхности планшетов (2D-контроль), <i>n</i> = 6							
67.18 (65.46; 68.28)	21.82 (20.54; 23.38)	55.35 (54.57; 55.69)	34.83 (33.56; 36.13)	64.47 (58.38; 64.99)	21.28 (20.90; 23.60)	59.78 (59.40; 60.13)	32.89 (32.58; 33.46)
						<sup>3</sup> <i>P</i> < 0.05	
<sup>b</sup> МНК на пластиковой поверхности планшетов в контакте с КФ-покрытием (3D-культура), <i>n</i> = 6							
67.77 (67.29; 68.37)	21.11 (20.60; 21.53)	56.33 (55.62; 59.03)	36.72 (35.21; 38.43)	64.21 (62.74; 66.11)	18.84 (18.14; 19.53)	55.75 (55.50; 56.75)	34.22 (34.22; 36.61)
					<sup>2</sup> <i>P</i> < 0.05		<sup>a</sup> <i>P</i> < 0.05
14 суток культивирования							
<sup>b</sup> культура МНК на пластиковой поверхности планшетов (2D-контроль), <i>n</i> = 6							
36.12 (35.74; 47.01)	22.69 (17.21; 27.18)	93.18 (81.51; 99.97)	80.52 (63.16; 86.36)	55.64 (43.37; 64.24)	15.38 (11.08; 32.69)	97.48 (97.34; 97.60)	91.36 (90.57; 91.72)
<sup>a</sup> <i>P</i> < 0.05		<sup>a</sup> <i>P</i> < 0.05		<sup>1</sup> <i>P</i> < 0.05		<sup>a</sup> <i>P</i> < 0.05	
<sup>г</sup> культура МНК на пластиковой поверхности планшетов в контакте с КФ покрытием (3D-культура), <i>n</i> = 6							
34.39 (30.35; 36.72)	15.30 (14.47; 22.34)	87.27 (86.42; 97.8)	78.18 (78.07; 92.20)	46.05 (45.99; 48.39)	5.39 (4.31; 5.42)	96.94 (96.43; 97.59)	88.70 (86.85; 89.90)
<sup>b</sup> <i>P</i> < 0.05		<sup>b</sup> <i>P</i> < 0.05		<sup>1</sup> <i>P</i> < 0.05		<sup>2</sup> <i>P</i> < 0.05	
				<sup>6</sup> <i>P</i> < 0.05		<sup>6</sup> <i>P</i> < 0.05	
				<sup>в</sup> <i>P</i> < 0.05		<sup>в</sup> <i>P</i> < 0.05	

<sup>a</sup>*P*, <sup>b</sup>*P*, <sup>в</sup>*P* – статистические различия с этим же показателем в клеточной культуре <sup>a</sup>, <sup>б</sup>, <sup>в</sup> соответственно. <sup>1</sup>*P*, <sup>2</sup>*P*, <sup>3</sup>*P*, <sup>4</sup>*P* – статистические различия с показателем 1, 2, 3, 4 в гомеостатической модели соответственно (U-критерий Манна–Уитни).

сравнению с 2D- и 3D-гомеостатической культурой (на 13 и 66% соответственно, *P* < 0.05).

Влияние КФ-материалов на функциональную активность клеток активно изучается (Tite et al., 2018). Костные имплантаты способны индуцировать сенсбилизацию CD4<sup>+</sup>-Т-хелперов 1-го типа (Th1), развитие продуктивного воспаления в тканях-мишенях с исходом в склероз (Mitchell, 2004).

В нашем исследовании после 2-суточного культивирования *in vitro* (2D-контроль) доля Т-лимфоцитов в неприлипающей фракции МНК крови человека, несущих кластеры дифференцировки CD45CD3, составила 98.8% (98.6; 99.0). ТКА и 3D-матрикс не влияли на показатель, цифры для CD3<sup>+</sup>-клеток варьировали в пределах 98–99%. Как следует из табл. 2, CD45CD3<sup>+</sup>-клетки экспрессировали, в основном, антигены CD4 (64–67%) и CD8 (18–22%).

В 48-часовой 2D-гомеостатической культуре 55% клеток являются CD45RA<sup>+</sup> наивными Т-лимфоцитами (не активированными антигеном) (табл. 2). Иммуномодулирующее действие ТКА, имитирующее сигнал от АПК, увеличивало на 4% (*P* < 0.05) долю CD45RA<sup>+</sup> наивных Т-клеток, но в 3D-активационной культуре этот эффект нивелировался (табл. 2).

Интересными оказались данные по экспрессии изучаемых антигенов в условиях длительного культивирования МНК человека, в том числе, в присут-

ствии гуморального и (или) структурного раздражителей (табл. 2). В 2D- и 3D-моделях гомеостатической культивирования в 2 раза (*P* < 0.05) снижалась доля Т-хелперов CD4<sup>+</sup>, но более чем на 30–40% (*P* < 0.05) возрастала доля CD45RA<sup>+</sup>-наивных и CD45RO<sup>+</sup>-Т-клеток памяти. В 14-суточной активационной культуре почти в 2–3 раза возрастала доля CD45RA<sup>+</sup>- и, особенно, CD45RO<sup>+</sup>-клеток, при этом число CD45RO-клеток памяти достигало максимального значения (91.36%; табл. 2). Это соответствует данным об экспрессии наивными Т-клетками маркеров клеток памяти после стимуляции Т-клеточного рецептора (TCR) в культуре *in vitro* (Gattinoni et al., 2011). В свою очередь, число CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов уменьшалось в меньшей степени (в сравнении с гомеостатической моделью), однако имело место прогрессивное снижение (*P* < 0.05) доли CD8<sup>+</sup>-Т-клеток вплоть до 5.39% (в 3 раза ниже значения в 3D-гомеомодели) в 3D-активационной культуре (табл. 2).

Т-лимфоциты способны длительно выживать и сохранять структурно-функциональные свойства в неблагоприятных условиях (Hoff et al., 2013), что позволяет им совместно с макрофагами регулировать переключение механизмов острого на хроническое продуктивное воспаление и регенерацию (Loi et al., 2016). По-видимому, в нашем случае это относится к популяции, экспрессирующей CD45RA<sup>+</sup>/RO<sup>+</sup> маркеры наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти (табл. 2).

Известно ограничение иммунного ответа в период формирования костной мозоли (Meert et al., 1998). Местная иммунная толерантность опосредуется через секреторные молекулы регуляторных Т-лимфоцитов (Al-Sebaei et al., 2014) и мезенхимных стволовых клеток (Einhorn, Gerstenfeld, 2015). Наш *in vitro* эксперимент показал, что 14-суточный костимулирующий сигнал АПК, в большей степени, в присутствии модельного минерального матрикса кости, также способен оказывать иммуномоделирующий эффект: преимущественное гипоиimmunогенное действие в отношении CD8<sup>+</sup>Т-клеток при высокой выживаемости Т-клеток памяти CD45RO<sup>+</sup> (табл. 2). Возможно, речь идет о селекции (переключении) клонов иммунокомпетентных клеток с провоспалительного фенотипа, связанного с санацией очага воспаления, на противовоспалительный эффект, обуславливающий запуск процессов ангиогенеза и регенерации (Einhorn, Gerstenfeld, 2015).

В плане переключения регуляторного эффекта значительную роль может играть функциональная поляризация лимфоцитов на Т-хелперы Th1 и Th2, которая определяется, в частности, профилем секретуемых цитокинов. Лимфоциты Th1 регулируются IL-2, в свою очередь, продуцируют IFN $\gamma$ , фактор некроза опухоли  $\beta$  (TNF  $\beta$ ) и IL-12. Субпопуляция лимфоцитов Th2 секретирует молекулы IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13 (Naldini et al., 2003), которые обладают воспалительным, ангио- и (или) остеогенным потенциалом. Кроме того, IL-4, IL-6 и IL-10 считаются одними из ключевых участников тканевой реакции на инородные тела (Wang et al., 2008).

Результаты мультиплексного анализа секреторной активности представлены в табл. 3. Неактивированные антигеном МНК крови человека, согласно известной классификации (van den Broek et al., 2014), в 2-суточной 2D-гомеостатической культуре продуцируют TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  в средних концентрациях (0.1–1 нг/мл), а гуморальные медиаторы (IL-2, IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) – в низких концентрациях (1–100 пг/мл). В то же время, неопределяемые (0 пг/мл), минимальные (<1 пг/мл) и высокие (>1 нг/мл) уровни цитокинов в краткосрочной 2D-гомеокультуре МНК не выявлены. Другими словами, секреторную способность неактивированных МНК можно считать низкой и сбалансированной в отношении про- и противовоспалительных медиаторов (IL-4, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$ ) с преобладанием в межклеточной жидкости секреторных молекул Th1-лимфоцитов (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ; табл. 3). Исходя из данных литературы о двойной роли IFN $\gamma$  в процессе воспаления, этот цитокин отнесен к группе противовоспалительных факторов (Lee et al., 2017).

Моделирование 2-суточного контакта неактивированных МНК с поверхностью регенерирующей кости (3D-гомеостатическая культура) привело к значимому (по отношению к 2D-культуре) всплеску секреции провоспалительных цитокинов IL-6 (в 58 раз) и IL-2 (в 4 раза) (табл. 3). Таким образом, не-

антигенный 3D-раздражитель, имитирующий минеральный компонент ЭЦМ кости, индуцирует секреторную активность лимфоцитов Th1 и Th2 в отношении провоспалительных медиаторов.

Введение ТКА, симулирующего сигналинг АПК, также существенно ( $P < 0.05$ ) стимулировало через 48 ч секрецию практически всех тестируемых медиаторов (за исключением IL-2) в активационной 2D-культуре МНК по сравнению с гомеостатической 2D-моделью (табл. 3). Провоспалительные цитокины по повышенному содержанию в супернатантах образовывали следующий ряд (по убыванию концентрации; табл. 3): IL-6 (33 раза) > IL-5 (16 раз) > TNF- $\alpha$  (8 раз) > IL-12 (3.5 раза). Ранжирование повышенных концентраций противовоспалительных биомолекул привело к следующим результатам: IL-13 (72 раза) > IL-10 (48 раз) > IFN-g (4 раза) > IL-4 (1.5 раза). ТКА оказывал в определенной степени более выраженное и сбалансированное стимулирующее действие на спектр изучаемых цитокинов по отношению к подобному эффекту, описанному для структурного 3D-раздражителя.

В 2-суточной активационной 3D-культуре (МНК совместно с частицами Т-активатора и 3D-матриksom) уровни тестируемых цитокинов достигали максимального уровня как в сравнении с 3D-гомеокультурой ( $P_T < 0.05$ ,  $n = 9$ ), так и с 2D-активационной моделью ( $P_T < 0.05$ ,  $n = 9$ ). В данных табл. 3 можно отметить концентрации высокие (более 1 нг/мл) для цитокинов TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  и IL-13, средние (0.1–1 нг/мл) для IL-2 и IL-5 и низкие (1–100 пг/мл) для IL-12 и IL-4.

Другими словами, гуморальный ТКА, симулирующий сигналинг АПК, и структурный неиммуногенный 3D-раздражитель, имитирующий минеральное вещество регенерирующей костной ткани, оказывают выраженное синергичное стимулирующее влияние на секрецию изучаемых цитокинов. Подобные эффекты могут лежать в основе повышенной *in vitro* гибели МНК через гиперактивацию (табл. 1) при 2-суточном контакте с использованными модельными раздражителями.

Напротив, гомеостатическая и активационная 2D-культуры МНК через 14 суток *in vitro* культивирования резко ( $P_T < 0.05$ ,  $n = 18$ ), иногда до нуля (IL-2, IL-5, IL-10), снижали свою секреторную активность по отношению к 48-ч моделям и, более того, слабо отвечали (прежде всего, в 3D-активационной культуре) на структурный раздражитель в виде матриц с КФ покрытием (табл. 3). Магнитные частицы, конъюгированные с антителами CD3/CD28, способствуют преимущественно экспансии Т-клеток CD4<sup>+</sup>. Для эффективной активации Т-лимфоцитов CD8<sup>+</sup> необходимы костимуляторные сигналы, например, IL-2 (Kagoya et al., 2017). В связи с этим, нулевые уровни IL-2 в 14-суточных культурах могут объяснять отмеченное в табл. 2 падение доли цитотоксических Т-лимфоцитов.

**Таблица 3.** Секреторная активность (пг/мл) МНК крови человека в различные сроки культивирования *in vitro*

Гомеостатическая модель культивирования												Активационная модель культивирования											
Th1 лимфоциты						Th2 лимфоциты						Th1 лимфоциты						Th2 лимфоциты					
IL-2 (1)	IL-12 (2)	TNFα (3)	IFNγ (4)	IL-4 (5)	IL-5 (6)	IL-6 (7)	IL-10 (8)	IL-13 (9)	IL-2 (10)	IL-12 (11)	TNFα (12)	IFNγ (13)	IL-4 (14)	IL-5 (15)	IL-6 (16)	IL-10 (17)	IL-13 (18)						
2 сут культивирования																							
<sup>а</sup> Культура МНК на пластиковой поверхности планшетов (2D-контроль), n = 6																							
18 (12; 43)	13 (12; 15)	109 (76; 103)	291 (230; 310)	6 (5; 8)	13 (10; 15)	93 (60; 153)	16 (14; 20)	17 (15; 21)	45 (43; 56)	48 (37; 56)	856 (753; 919)	1281 (1140; 1763)	9 (8; 9)	204 (187; 218)	3055 (2279; 3056)	774 (681; 849)	1230 (1006; 1240)						
										<sup>2</sup> P < 0.05	<sup>3</sup> P < 0.05	<sup>4</sup> P < 0.05	<sup>5</sup> P < 0.05	<sup>6</sup> P < 0.05	<sup>7</sup> P < 0.05	<sup>8</sup> P < 0.05	<sup>9</sup> P < 0.05						
<sup>б</sup> Культура МНК на пластиковой поверхности планшетов в контакте с КФ покрытием (3D-культура), n = 6; <sup>1</sup> P- <sup>9</sup> P <sub>T</sub> < 0.05; <sup>a</sup> P <sub>T</sub> < 0.05																							
79 (77; 127)	14 (8; 29)	163 (96; 199)	376 (307; 433)	8 (7.0; 9.8)	17 (15; 19)	5352 (567; 10141)	23 (19; 30)	21 (19; 23)	160 (141; 604)	52 (43; 60)	7391 (6143; 10174)	6964 (6629; 7746)	15 (14; 18)	272 (248; 293)	12787 (10403; 19674)	1048 (1004; 1160)	1793 (1698; 2291)						
						<sup>a</sup> P < 0.05			<sup>1</sup> P < 0.05 <sup>a</sup> P < 0.05	<sup>2</sup> P < 0.05	<sup>3</sup> P < 0.05 <sup>a</sup> P < 0.05	<sup>4</sup> P < 0.05 <sup>a</sup> P < 0.05	<sup>5</sup> P < 0.05 <sup>a</sup> P < 0.05	<sup>6</sup> P < 0.05 <sup>a</sup> P < 0.05	<sup>7</sup> P < 0.05 <sup>a</sup> P < 0.05	<sup>8</sup> P < 0.05 <sup>a</sup> P < 0.05	<sup>9</sup> P < 0.05 <sup>a</sup> P < 0.05						
14 сут культивирования																							
<sup>в</sup> Культура МНК на пластиковой поверхности планшетов (2D-контроль), n = 6																							
0 (0; 1)	0.5 (0.2; 0.7)	16 (15; 16)	4 (0; 10)	0.3 (0.2; 0.5)	0 (0-0.4)	26 (15; 71)	0 (0-2)	1.6 (1.5-8)	0 (0; 0)	0.9 (0.4; 1)	16 (14; 21)	22 (8; 37)	0.4 (0.2; 0.4)	0 (0; 0)	66 (66; 67)	0.5 (0; 0.8)	1.5 (1; 1.6)						
						<sup>a</sup> P < 0.05	<sup>a</sup> P < 0.05	<sup>a</sup> P < 0.05	<sup>a</sup> P < 0.05	<sup>a</sup> P < 0.05	<sup>a</sup> P < 0.05	<sup>a</sup> P < 0.05	<sup>a</sup> P < 0.05	<sup>a</sup> P < 0.05	<sup>a</sup> P < 0.05	<sup>a</sup> P < 0.05	<sup>a</sup> P < 0.05						
<sup>г</sup> Культура МНК на пластиковой поверхности планшетов в контакте с КФ покрытием (3D-культура), n = 6																							
1.4 (1.1; 1.6)	1.5 (0.9; 1.7)	33 (29; 39)	32 (14; 50)	1.2 (0.8; 1.6)	0 (0-0.4)	189 (128-225)	11 (9; 15)	3 (2; 3)	0 (0; 0)	0.8 (0.3; 0.9)	16 (14; 21)	39 (26; 66)	0.5 (0.3; 0.6)	4 (3; 16)	34 (24; 61)	0.6 (0.3; 1)	4.5 (4; 17)						
						<sup>б</sup> P < 0.05 <sup>в</sup> P < 0.05	<sup>б</sup> P < 0.05 <sup>в</sup> P < 0.05	<sup>б</sup> P < 0.05 <sup>в</sup> P < 0.05	<sup>б</sup> P < 0.05 <sup>в</sup> P < 0.05	<sup>б</sup> P < 0.05 <sup>в</sup> P < 0.05	<sup>б</sup> P < 0.05 <sup>в</sup> P < 0.05	<sup>б</sup> P < 0.05 <sup>в</sup> P < 0.05	<sup>б</sup> P < 0.05 <sup>в</sup> P < 0.05	<sup>б</sup> P < 0.05 <sup>в</sup> P < 0.05	<sup>б</sup> P < 0.05 <sup>в</sup> P < 0.05	<sup>б</sup> P < 0.05 <sup>в</sup> P < 0.05	<sup>б</sup> P < 0.05 <sup>в</sup> P < 0.05						

<sup>а</sup>P, <sup>б</sup>P, <sup>в</sup>P – статистические различия с показателем клеточной культуры <sup>а</sup>, <sup>б</sup>, <sup>в</sup> соответственно; <sup>1</sup>P, <sup>2</sup>P, ... <sup>9</sup>P – статистические различия с показателем 1, 2, ... 9 соответственно (U-критерий Манна-Уитни); P<sub>T</sub> – то же, что и P, но согласно T-критерию Вилкоксона.

Тем не менее, искусственный ЭЦМ, имитирующий в 3D-масштабе минеральное вещество костной ткани, статистически значимо ( $P < 0.05$  в сравнении с 2D-гомеокультурой) поддерживал секрецию лимфоцитов Th1 (IL-12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) и Th2 (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13) в 14-суточной гомеостатической 3D-модели (табл. 3). Концентрация плеiotропного IL-6 поддерживалась на среднем уровне секреции (189 пг/мл; в 7 раз выше, чем в 2D-гомеокультуре), что может иметь значение для длительной стимуляции процессов ангиогенеза (Naldini et al., 2003) и остеогенеза (Hallab et al., 2004), обусловленной данным цитокином.

В свою очередь, для гуморального ТКА (анти-CD2CD3CD28-частицы) в 2–14-суточных культурах подтверждаются данные о том, что короткие периоды стимуляции Т-лимфоцитов в большей степени усиливают их функциональную активность, а хроническая активация, напротив, ослабляет секреторную способность клеток (Kagoya et al., 2017). Так, комбинация моноклональных антител анти-CD2 и анти-CD3 приводит к изменению экспрессии генов в Т-клетках, что сопровождается снижением продукции IL-2 и IL-4 уже через 6 ч контакта с антителами и развитием состояния иммунной толерантности (Chavin et al., 1993). Этот механизм лежит в основе длительного выживания аллогенных трансплантатов при снижении риска побочных эффектов, обусловленных IL-2 и IL-4 (Chavin et al., 1993).

По-видимому, активирующий сигнал анти-CD2CD3CD28-частицами приводит через 14 сут к развитию толерантности Т-клеток памяти и источению эффекторных клеток, что установлено для хронических вирусных инфекций (Angelosanto et al., 2012). В присутствии КФ-покрытий, растворяющихся с выделением ионов кальция (Шаркеев и др., 2014), механизм толерантности может реализоваться через TCR-чувствительный кальциневрин-зависимый фактор транскрипции ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) (Martinez et al., 2015).

Интерпретируя сведения из литературы и полученные результаты *in vitro* моделирования, можно заключить, что Т-клеточный анти-CD2CD3CD28-активатор, длительно (14 сут) имитирующий сигнал АПК, способен, по-видимому, снизить риск отторжения имплантатов с КФ-покрытием посредством истощения цитотоксических Т-лимфоцитов, что должно способствовать медленно текущему хроническому продуктивному воспалению и репарации тканей. В то же время, неопределяемые (0 пг/мл) и минимальные (<1 пг/мл) концентрации IL-2 и IL-4 (табл. 3), обладающих ангиогенными и остеогенными свойствами (Yuan et al., 2016; Zheng et al., 2018; Yuan et al., 2019), несут риск фиброзной инкапсуляции имплантата и “неуспеха” репаративного ремоделирования костной ткани. В этом плане, *in vivo* тестирование частиц анти-CD2CD3CD28 в ортопедии и травматологии по аналогии с их испытаниями в онкологии (Kagoya et al., 2017) и трансплантологии (Chavin et al., 1993) может дать ответ о целесооб-

ности их использования при остеосинтезе в случае хронических заболеваний, длительно незаживающих переломов и ложных суставов опорно-двигательного аппарата.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10031; оценка иммунофенотипа МНК и их цитокинового профиля в разных условиях культивирования), а также государственной поддержке ведущих научных школ РФ (НШ-2495.2020.7; оценка процессов апоптоза и некроза мононуклеарных клеток).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные с участием людей, соответствуют этическими стандартами (Заключение № 2 от 06.03.2017 Локального этического комитета, Инновационный парк Балтийского федерального университета им. И. Канта).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Браун А.М., Моженок Т.П. 1987. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. Л.: Наука. 232 с. (Brown A.M., Mozhenok T.P. 1987. Nonspecific Adaptation Syndrome of the Cellular System. L.: Science. 232 s)
- Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Удут В.В., Наумов С.А., Хлусов И.А. 1996. Закономерности структурной организации систем жизнеобеспечения в норме и при развитии патологического процесса. Томск: Изд-во ТГУ. 283 с. (Goldberg E.D., Dygay A.M., Udut V.V., Naumov S.A., Khlusov I.A. 1996. Patterns of the structural organization of life support systems are normal and in the development of the pathological process. Tomsk: TSU Publishing House. 283 pp.)
- Иванюк Е.Э., Надеждин С.В., Покровская Л.А., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Малащенко В.В., Литвинова Л.С., Хлусов И.А. 2018. Субпопуляции макрофагов и мезенхимные стволовые клетки в регуляции ремоделирования костной ткани. Цитология. Т. 60. № 4. С. 252. (Ivanyuk E.E., Nadezhdin S.V., Pokrovskaya L.A., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Malashchenko V.V., Litvinova L.S., Khlusov I.A. 2018. Macrophage subsets and mesenchymal stem cells in regulation of bone tissue remodeling. Tsitologiya. V. 60. No 4. P. 252.) <https://doi.org/10.31116/tsitol.2018.04.03>
- Коршунов Д.А., Кондакова И.В. 2016. Современные достижения и проблемы в исследовании культур клеток. Успехи совр. биол. Т. 136. № 4. С. 347. (Korshunov D.A., Kondakova I.V. 2016. Modern achievements and problems in the study of cell cultures. Succ. Modern Biol. V. 136. No 4. P. 347.)
- Риггз Б.Л., Мелтон III Л. Дж. (Ред.) 2000. Остеопороз. М.-СПб.: Невский диалект. 560 с. (Riggs B.L., Melton III L.J. (Eds.) 1995. Osteoporosis: Etiology, diagnosis, and manage-

- ment. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia-N. Y.: Lippincott-Raven Publ. 524 pp.
- Шаркеев Ю.П., Псахье С.Г., Легостаева Е.В., Князева А.Г., Смолин А.Ю., Ерошенко А.Ю., Коноваленко И.С., Назаренко Н.Н., Белявская О.А., Куляшова К.С., Комарова Е.Г., Толкачева Т.В., Хлусов И.А., Зайцев К.В., Хлусова М.Ю. и др. 2014. Биокompозиты на основе кальцийфосфатных покрытий, наноструктурных и ультрамелкозернистых биоинертных металлов, их биосовместимость и биодegradация. Томск: Изд. дом Томского гос. университета. 596 с. (Sharkeev Yu.P., Psakhye S.G., Legostaeva E.V., Knyazeva A.G., Smolin A.Yu., Eroshenko A.Yu., Konovalenko I.S., Nazarenko N.N., Belyavskaya O.A., Kulyashova K.S., Komarova E.G., Tolkacheva T.V., Khlusov I.A., Zaitsev K.V., Khlusova M.Yu., et al. 2014. Biocomposites based on calcium phosphate coatings, nanostructured and ultrafine-grained bioinert metals, their biocompatibility and biodegradation. Tomsk: Publishing House of Tomsk State University. 596 p.)
- Al-Sebaei M.O., Daukss D.M., Belkina A.C., Kakar S., Wigner N.A., Cusher D., Graves D., Einhorn T., Morgan E., Gerstenfeld L.C. 2014. Role of Fas and T<sub>REG</sub> cells in fracture healing as characterized in the Fas-deficient (lpr) mouse model of lupus. *J. Bone Miner. Res.* V. 29. P. 1478. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2169>
- Angelosanto J. M., Blackburn S.D., Crawford A., Wherry E.J. 2012. Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection. *J. Virol.* V. 86. P. 8161.
- Arron J.R., Choi Y. 2000. Bone versus immune system. *Nature.* V. 408. P. 535. <https://doi.org/10.1038/35046196>
- Barradas A.M.C., Yuan H., van Blitterswijk C.A., Habibovic P. 2011. Osteoinductive biomaterials: Current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur. Cells Materials.* V. 21. P. 407. <https://doi.org/10.22203/ecm.v021a31>
- Batoon L., Millard S.M., Raggatt L.J., Pettit A.R. 2017. Osteomacs and bone regeneration. *Curr. Osteoporos Rep.* V. 15. P. 385. <https://doi.org/10.1007/s11914-017-0384-x>
- Chavin K.D., Qin L., Lin J., Woodward J. E., Baliga P., Bromberg J.S. 1993. Combination Anti-CD2 and anti-CD3 monoclonal antibodies induce tolerance while altering Interleukin-2, Interleukin-4, tumor necrosis factor, and transforming growth factor- $\beta$  production. *Ann. Surg.* V. 218. P. 492. <https://doi.org/10.1097/0000658-199310000-00009>
- Crockett J.C., Rogers M.J., Coxon F.P., Hocking L.J., Helfrich M.H. 2011. Bone remodelling at a glance. *J. Cell. Sci.* V. 124. P. 991. <https://doi.org/10.1242/jcs.063032>
- Einhorn T.A., Gerstenfeld L.C. 2015. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* V. 11. P. 45. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.164>
- Gattinoni L., Lugli E., Ji Y., Pos Z., Paulos C.M., Quigley M.F., Almeida J.R., Gostick E., Yu Z., Carpenito C., Wang E., Douek D.C., Price D.A., June C.H., Marincola F.M., Roederer M., Restifo N.P. 2011. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.* V. 17. P. 1290. <https://doi.org/10.1038/nm.2446>
- Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I., Alobera-Gracia M.A., del-Canto-Pingarrón M., Blanco-Jerez L. 2006. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* V. 11. P. E151.
- Greenblatt M.B., Shim J.H. 2013. Osteoimmunology: a brief introduction. *Immune Netw.* V. 13. P. 111. <https://doi.org/10.4110/in.2013.13.4.111>
- Hallab N.J., Jacobs J.J., Katz J. L. 2004. Orthopedic applications. In: *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine.* 2nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press. P. 526.
- Hoff P., Gaber T., Strehl C., Schmidt-Bleek K., Lang A., Huscher D., Burmester G.R., Schmidmaier G., Perka C., Duda G., Buttgeriet F. 2016. Immunological characterization of the early human fracture hematoma. *Immunol. Res.* V. 64. P. 1195. <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8868-9>
- Hoff P., Maschmeyer P., Gaber T., Schütze T., Raue T., Schmidt-Bleek K., Dziurla R., Schellmann S., Lohanatha F.L., Rohner E., Ode A., Burmester G.R., Duda G.N., Perka C., Buttgeriet F. 2013. Human immune cells' behavior and survival under bioenergetically restricted conditions in an *in vitro* fracture hematoma model. *Cell Mol. Immunol.* V. 10. P. 151. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.56>
- Humbert P., Brennan M.Á., Davison N., Rosset P., Trichet V., Blanchard F., Layrolle P. 2019. Immune modulation by transplanted calcium phosphate biomaterials and human mesenchymal stromal cells in bone regeneration. *Front. Immunol.* V. 10. P. 663. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00663>
- Kagoya Y., Nakatsugawa M., Ochi T., Cen Y., Guo T., Anczurowski M., Saso K., Butler M.O., Hirano N. 2017. Transient stimulation expands superior antitumor T cells for adoptive therapy. *JCI Insight.* V. 2. e89580. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89580>
- Khlusov I. A., Dekhtyar Y., Sharkeev Y. P., Pichugin V. F., Khlusova M. Y., Polyaka N., Tjulkins F., Vendinya V., Legostaeva E.V., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Prosolov K.A. 2018. Nanoscale electrical potential and roughness of a calcium phosphate surface promotes the osteogenic phenotype of stromal cells. *Materials.* V. 11. P. 978. <https://doi.org/10.3390/ma11060978>
- Lee S.H., Kwon J.y., Kim S., Jung K., Cho M.-L. 2017. Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis. *Sci. Rep.* V. 7. 10133. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09767-0>
- Loi F., Córdova L.A., Pajarinen J., Lin T.H., Yao Z., Goodman S.B. 2016. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone.* V. 86. P. 119. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.02.020>
- Martinez G.J., Pereira R.M., Äijö T., Kim E.Y., Marangoni F., Pipkin M.E., Togher S., Heissmeyer V., Zhang Y.C., Crotty S., Lamperti E.D., Ansel K.M., Mempel T.R., Lähdesmäki H., Hogan P.G., Rao A. 2015. The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity.* V. 42. P. 265. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.006>
- Massanella M., Negro E., Pérez-Alvarez N. Puig J., Ruiz-Hernández R., Bofill M., Clotet B., Blanco J. 2010. CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART. *AIDS.* V. 24. P. 959. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328337b957>
- Meert K.L., Ofenstein J.P., Sarnaik A.P. 1998. Altered T cell cytokine production following mechanical trauma. *Ann. Clin. Lab. Sci.* V. 28. P. 283.
- Mitchell R.N. 2004. Innate and adaptive immunity: The immune response to foreign materials. In: *Biomaterials sci-*

- ence: An introduction to materials in medicine. 2nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press. P. 304.
- Naldini A., Pucci A., Bernini C., Carraro F. 2003. Regulation of angiogenesis by Th1- and Th2-type cytokines. *Curr. Pharm. Des.* V. 9. P. 511.  
<https://doi.org/10.2174/1381612033391423>
- Nepola J.V. 1996. External fixation. In: Rockwood and green's fractures in adults. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. P. 229.
- Pucci N.A., Bernini C., Carraro F. 2003. Regulation of angiogenesis by Th1- and Th2-type cytokines. *Curr. Pharm. Des.* V. 9. P. 511.  
<https://doi.org/10.2174/1381612033391423>
- Schell H., Duda G.N., Peters A., Tsitsilonis S., Johnson K.A., Schmidt-Bleek K. 2017. The haematoma and its role in bone healing. *J. Exp. Orthop.* 4: 5.  
<https://doi.org/10.1186/s40634-017-0079-3>
- Tite T., Popa A.C., Balescu L.M., Bogdan I.M., Pasuk I., Ferreira J.M.F., Stan G.E. 2018. Cationic substitutions in hydroxyapatite: Current status of the derived biofunctional effects and their *in vitro* interrogation methods. *Materials.* V. 11. P. 2081.  
<https://doi.org/10.3390/ma11112081>
- Van den Broek L.J., Kroeze K.L., Waaijman T., Breetveld M., Sampat-Sardjoepersad S.C., Niessen F.B., Middelkoop E., Schepers R.J., Gibbs S. 2014. Differential response of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, dermal fibroblasts, and keratinocytes to burn wound exudates: potential role of skin-specific chemokine CCL27. *Tiss. Eng.* (A). V. 20. P. 197.  
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0123>
- Wang X., Lennartz M. R., Loegering D.J., Stenken J. A. 2008. Multiplexed cytokine detection of interstitial fluid collected from polymeric hollow tube implants – A feasibility study. *Cytokine.* V. 43. P. 15.  
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.04.009>
- Yuan H., van Blitterswijk C.A., de Groot K., de Bruijn J.D. 2006. Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. *Tiss. Eng.* V. 12. P. 1607.  
<https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1607>
- Yuan Y., Chen X., Zhang L., Wu J., Guo J., Zou D., Chen B., Sun Z., Shen C., Zou J. 2016. The roles of exercise in bone remodeling and in prevention and treatment of osteoporosis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* V. 122. P. 122.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.11.005>
- Yuan Y., Li H., Liao Y., Feng C. 2019. CD8<sup>+</sup> T cells are involved in early inflammation before macrophages in a rat adipose tissue engineering chamber model. *J. Tiss. Eng. Regen. Med.* V. 13. P. 1499.  
<https://doi.org/10.1002/term.2836>
- Zheng Z.W., Chen Y.H., Wu D.Y., Wang J.B., Lv M.M., Wang X.S., Sun J., Zhang Z.Y. 2018. Development of an accurate and proactive immunomodulatory strategy to improve bone substitute material-mediated osteogenesis and angiogenesis. *Theranostics.* V. 8. P. 5482.  
<https://doi.org/10.7150/thno.28315>

## Morphofunctional Reaction of T Lymphocytes on *in vitro* Contact with Calcium Phosphate Coating in the Presence of T-cell Activation Kit

L. S. Litvinova<sup>a,\*</sup>, E. S. Melashchenko<sup>a</sup>, O. G. Khaziakhmatova<sup>a</sup>, K. A. Yurova<sup>a</sup>, Yu. P. Sharkeev<sup>b,c</sup>,  
E. G. Komarova<sup>c</sup>, M. B. Sedelnikova<sup>c</sup>, N. M. Todosenko<sup>a</sup>, and I. A. Khlusov<sup>a,d,e</sup>

<sup>a</sup>Center for Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041 Russia

<sup>b</sup>Research School of High-Energy Physics, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk 634050 Russia

<sup>c</sup>Institute of Strength Physics and Materials Science of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634055 Russia

<sup>d</sup>Morphology and General Pathology Department, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

<sup>e</sup>Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk 634050 Russia

\*e-mail: larisalitinova@yandex.ru

Morphofunctional activity of T lymphocytes *in vitro* contacted with calcium phosphate (CP) coating in the presence of particles with antibodies to CD2, CD3 and CD28 antigens has been studied. VT1-0 titanium plates (10 × 10 × 1 mm<sup>3</sup>) with a bilateral micro-arc rough (index  $R_a = 2-5 \mu\text{m}$ ) CP coating were used as a model samples to imitate the bone mineral matrix. MACSiBead<sup>TM</sup> magnetic particles of T-Cell Activation/Expansion Kit human with monoclonal antibodies to CD2, CD3 and CD28 antigens (T-cell activator, TCA) employed to simulate antigen-presenting cell (APC) signaling. Human blood mononuclear cells (hBMNCs; 98.8% of CD45CD3<sup>+</sup> cells) were cultivated in the presence of the CP-coated samples and/or TCA ( $2 \times 10^6$  particles per 1.5 ml of nutrient medium with a mixture of cells in a ratio of 2 : 1) for 2 and 14 days. CP coating and TCA synergistically triggered *in vitro* adaptation of hBMNC culture *via* the mechanisms of hyperactivation and subsequent death of T lymphocytes. An immunoselection was conditioned by the accumulation of CD45RA<sup>+</sup>/RO<sup>+</sup> naive T lymphocytes and memory T cells and the simultaneous depletion of the pool of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Changing of T cell subsets was accompanied by enhanced cell secretion in 2 days versus its deprivation in 14 days of investigation. CP coating supported, as compared with cell culture on plastics the secretory capacity of lymphocytes Th1 (IL-12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) and Th2 (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13). At the same time, a prolonged TCA signal after 48 hours of activation led to depletion of morphofunctional activity of T cells. A hypothesis that the effects found *in vitro* could be important in switching of signaling between T lymphocytes, APC, and CP materials at the cell/foreign body interface is discussed. A change in the phases of inflammation/regeneration, the development of immune tolerance, successful osseointegration of implants or impaired bone tissue remodeling may be an outcomes of such cellular-molecular crosstalk.

**Keywords:** human blood mononuclear leukocytes, short-term and prolonged cultures, viability, immunophenotype, cytokines, anti-CD2CD3CD28 beads, micro-arc calcium phosphate coating