

РЕАКЦИЯ АКТИВИРОВАННЫХ МОНОНУКЛЕАНЫХ КЛЕТОК НА СОКУЛЬТИВИРОВАНИЕ С ТИТАНОВЫМИ МАТРИКСАМИ, НЕСУЩИМИ КАЛЬЦИЙФОСФАТНОЕ ПОКРЫТИЕ

© 2019 г. Л. С. Литвинова¹, К. А. Юрова¹, В. В. Шуплецова¹,
О. Г. Хазиахматова¹, Е. С. Мелашенко^{1*}, В. В. Мелашенко¹, Е. О. Шунькин¹,
Ю. П. Шаркеев³, Е. Г. Комарова³, М. Б. Седельникова³, И. К. Норкин¹,
К. И. Прокин¹, П. А. Иванов¹, И. А. Хлусов^{2,3}

*E-mail: lena.melashchenko17@mail.ru

¹ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,
Калининград, Россия;

²Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия;

³Томский политехнический университет, Томск, Россия

Поступила: 27.07.2019. Принята: 30.08.2019

Проведена оценка реакций мононуклеарных клеток крови (МНК) при сокультивировании с титановыми подложками, несущими двустороннее кальцийфосфатное покрытие (КФ), в условиях дополнительной активации Т-клеточного рецептора. Установлено, что в активационной 3D модели при контакте с КФ-покрытием, усиливается секреция про- и противовоспалительных цитокинов (IL-2, TNF- α , IL-10, IL-4), на фоне снижения жизнеспособности культуры МНК и изменения их иммунофенотипа, в сторону увеличения числа клеток, экспрессирующих CD95⁺ и CD45R0⁺, (число CD25⁺ клеток не изменялось), что может свидетельствовать о гиперактивации МНК в 3D модели при ее стимуляции активатором Т-клеток.

Ключевые слова: МНК, Т-лимфоциты, титановые имплантаты, про- и противовоспалительные цитокины, иммунофенотип

DOI: 10.31857/S102872210007070-2

Адрес: 236029 Калининград, ул. Гайдара, 6, «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, Мелашенко Елена Сергеевна. Тел.: 595–595 доб. 6634;

E-mail: lena.melashchenko17@mail.ru

Авторы:

Литвинова Л. С., д.м.н., заведующая базовой лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

Юрова К. А., к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

Шуплецова В. В., к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

Хазиахматова О. Г., к.б.н., научный сотрудник базовой лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

Мелашенко Е. С., биолог центра медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

Мелашенко В. В., инженер-исследователь центра медицинских биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

Шунькин Е. О., инженер-исследователь базовой лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

Шаркеев Ю. П., д.ф.-м.н., профессор, зав. лаб. физики наноструктурных биоконструктов ИФПМ СО РАН, Томск, Россия;

Комарова Е. Г., к.т.н., младший научный сотрудник лаборатории физики наноструктурных биоконструктов ИФПМ СО РАН, Томск, Россия;

Седельникова М. Б., д.т.н. старший научный сотрудник лаборатории физики наноструктурных биоконструктов ИФПМ СО РАН, Томск, Россия;

Норкин И. К., аспирант БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

Прокин К. И., студент БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

Иванов П. А., научный сотрудник базовой лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия;

Хлусов И. А., д.м.н. профессор кафедры морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, профессор Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий Национального НИ ТПУ, Томск, Россия.

Воспалительная реакция, сопровождающая травматическое повреждение кости, является многофакторным процессом, влияющим на

костную регенерацию и приживление имплантатов, где важную роль играют мононуклеарные лейкоциты крови (МНК) [1].

Целью работы явилось изучение реакций МНК на трехмерный матрикс, имитирующий регенерирующую костную ткань, в условиях сокультивирования *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение МНК производилось из лейкоцезы здоровых доноров центрифугированием на градиенте плотности фиколл-урографин («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077$ г/см³). Состояние трехмерной (3D) культуры клеток имитировали при помощи добавления в клеточную культуру подложек (10x10x1 мм³) из коммерчески чистого титана, несущих рельефное (индекс шероховатости Ra = 2–5 мкм) микродуговое двустороннее кальцийфосфатное (КФ) покрытие, симулирующее состояние минерального матрикса регенерирующей костной ткани. В эксперименте использовались две модели культивирования: 2D-клетки на плоской поверхности культурального планшета (контроль); 3D-сокультивирование с кальцийфосфатным матриксом.

Культивирование МНК проводили в 24-х луночных планшетах («OrangeScientific», Бельгия) в полной питательной среде (ППС): RPMI-1640 («Sigma-Aldrich», США), 10% инактивированной (56°C в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров («Sigma-Aldrich», США), 200 мМ/л L-глутамин («Sigma-Aldrich», США), 30 мкг/мл гентамицин («GibcoLifeTechnologies», США), 1×10^6 активатора Т-лимфоцитов – использовали реагент T-CellActivation/ExpansionKithuman (Ac/Exp) («MiltenyiBiotec», Германия), который представляет собой антибиотинные MACSiBead™ частицы с биотинилированными антителами против человеческих CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺. После инкубации с антителами к CD95, CD25, CDR0/RA клетки анализировали на проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия) согласно протоколу фирмы-производителя. Жизнеспособность клеток выявляли с использованием 0,4% раствора трипанового синего (Invitrogen, США) при помощи автоматического счётчика клеток Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen, США). Супернатанты из клеточных культур со-

бирали после 48 часов и определяли количество про- и противовоспалительных цитокинов (IL-2, TNF- α , IL-10, IL-4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных 2D-культурах при добавлении активирующего комплекса (CD2-/CD3-/CD28-) процент живых клеток составлял 80,65 [80,17; 82,25]%. В экспериментальных 3D моделях в присутствии активатора) была выявлена интенсификация процессов клеточного некроза и снижение жизнеспособности культуры МНК ($p<0,05$). Число клеток в апоптозе в активированных 3D культурах было сопоставимо с таковым в 2D культурах.

Было зафиксировано достоверное увеличение ($p<0,05$; 3D относительно 2D): процентного содержания клеток с рецептором индукции апоптоза CD95⁺ (Fas/Apo-1) с 20,17 [17,50–22,99]% в 2D- до 25,80 [22,80–27,27]% в 3D-культурах; Т-клеток памяти CD45R0⁺ с 32,89 [32,30–33,81]% в 2D- до 36,03 [34,20–36,79]% в 3D-культурах. Также регистрировалось снижение процента наивных Т-клеток CD45RA⁺ ($p<0,05$) однако число CD25⁺ клеток не изменялось. Кроме того в 3D культурах относительно 2D, регистрировалось повышение ($p<0,05$) уровня провоспалительных (IL-2 и TNF- α) и протиаинтивовоспалительных медиаторов (IL-10 и IL-4).

Таким образом, сокультивирование активированных МНК с имплантатами способствовало снижению относительного содержания живых клеток в культуре за счет интенсификации процесса ядерной формы гибели клеток; возрастанию числа клеток, презентующих маркеры клеток памяти (CD45R0) и апоптоза (CD95), при отсутствии влияния на экспрессию молекулы активации CD25 и увеличению уровня секреции МНК про- и противовоспалительных цитокинов. Вышесказанное может свидетельствовать о гиперактивации МНК в 3D модели с добавлением Т-активатора. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10031).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Baht G. S., Vi L., Alman B. A. The Role of the Immune Cells in Fracture Healing. Curr Osteoporos Rep. 2018;16(2):138–145.

REACTION OF ACTIVATED MONONUCLEATED CELLS TO CO-CULTIVATION WITH CALCIUM PHOSPHATE COATING OF TITANIUM MATRIX

© 2019 L. S. Litvinova¹, K. A. Yurova¹, V. V. Shupletsova¹,
O. G. Khaziakhmatova¹, E. S. Melashchenko^{1*}, V. V. Malashchenko¹, E. O. Shunkin¹,
Yu. P. Sharkeev³, E. G. Komarova³, M. B. Sedelnikova³, I. K. Norkin¹,
K. I. Prokin¹, P. A. Ivanov¹, I. A. Khlusov^{2,3}

*E-mail: lena.melashchenko17@mail.ru

¹Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

²Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

³Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

Received: 27.07.2019. Accepted: 30.08.2019

The reactions of mononuclear blood cells (MNC) were evaluated under cocultivation with titanium substrates carrying a bilateral calcium phosphate coating (CP) under conditions of additional activation of the T-cell receptor. It has been established that in the activation 3D model, in contact with CP-coating, the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-2, TNF- α , IL-10, IL-4) increases, against the background of a decrease in the viability of the MNC culture and changes in their immunophenotype, in the direction of increasing the number of cells expressing CD95⁺ and CD45R0⁺ (the number of CD25⁺ cells has not changed), which may indicate that the MNC is hyperactive in the 3D model when it is stimulated by an activator of T cells.

Key words: MNC, T-lymphocytes, titanium implants, pro- and anti-inflammatory cytokines, immunophenotype

Authors:

Litvinova L. S., MD, Head of the Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies I. Kant, Kaliningrad, Russia;

Yurova K. A., Ph.D., Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology I. Kant, Kaliningrad, Russia;

Shupletsova V. V., Ph.D. Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology I. Kant, Kaliningrad, Russia;

Haziakhmatova O. G., Ph.D., Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology I. Kant, Kaliningrad, Russia;

Melashchenko E. S., ✉ Biologist of the Center for Medical Biotechnology BFU them. I. Kant, Kaliningrad, Russia.

E-mail: lena.melashchenko17@mail.ru;

Malashchenko V. V., Researcher, Center for Medical Biotechnologies BFU them. I. Kant, Kaliningrad, Russia;

Shunkin E. O., Engineer Researcher Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology BFU them. I. Kant, Kaliningrad, Russia;

Sharkeyev Yu. P., Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Head. lab Physics of nanostructured biocomposites, Tomsk, Russia;

Komarova E. G., Ph.D., Junior Researcher, Laboratory of Physics of Nanostructured Biocomposites, IPPM SB RAS, Tomsk, Russia;

Sedelnikova M. B., Doctor of Technical Sciences Senior Researcher, Laboratory of Physics of Nanostructured Biocomposites, IPPM SB RAS, Tomsk, Russia;

Norkin I. K., PhD student BFU them. I. Kant, Kaliningrad, Russia;

Prokin K. I., student BFU them. I. Kant, Kaliningrad, Russia;

Ivanov P. A., Researcher at the Base Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

Khlusov I. A., Ph.D. Professor of the Department of Morphology and General Pathology of the SBEI HPE Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Professor of the Research School of Chemical and Biomedical Technologies of the National Research Institute of TPU, Tomsk, Russia.