

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ Т-ЛИМФОБЛАСТОВ ЛИНИИ JURKAT ПРИ КРАТКОСРОЧНОМ КОНТАКТЕ С РЕЛЬЕФНОЙ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ

© И. А. Хлусов,<sup>1,2,\*</sup> Л. С. Литвинова,<sup>3</sup> В. В. Шуплецова,<sup>3</sup> Н. А. Дунец,<sup>3</sup>  
О. Г. Хазиахматова,<sup>3</sup> К. А. Юрова,<sup>3</sup> М. Ю. Хлусова,<sup>4</sup> Ю. П. Шаркеев<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Кафедра морфологии и общей патологии Сибирского государственного  
медицинского университета, Томск, 634050,

<sup>2</sup>Кафедра экспериментальной физики Томского политехнического университета, Томск, 634050,

<sup>3</sup>Лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий

Балтийского федерального университета им. И. Канта, Калининград, 236041,

<sup>4</sup>Кафедра патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета, Томск, 634050, и

<sup>5</sup>Лаборатория физики наноструктурных биосовместимых композитов

Института физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, 634055;

\* электронный адрес: khlusov63@mail.ru

Лейкозные Т-лимфобластоподобные клетки человека (Т-клеточная линия Jurkat) использованы для моделирования морфофункциональной реакции Т-лимфоцитов на 24-часовой контакт *in vitro* с рельефными подложками ( $12 \times 12 \times 1$  мм<sup>3</sup>) из коммерчески чистого титана, несущими микродуговое двухстороннее кальций-фосфатное (КФ) покрытие. Индекс шероховатости подложки Ra составлял 2.2—2.7 мкм. Контролями сравнения служили клетки Jurkat на пластиковой поверхности культуральных планшетов (2D-контроль), а также клетки после 24-часового контакта с оксидной (TiO<sub>2</sub>) микродуговой поверхностью на титановой подложке (3D-контроль). Клетки 2D-контрольной культуры (27—98 %) имели иммунофенотип CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> и спонтанно секретировали IL-2, IL-4, IL-8, IL-10 и TNF $\alpha$ , но не секретировали IL-1b и IL-6; другие маркеры клеточной активации, дифференцировки, созревания и смерти (CD8, CD16, CD56, CD25 и CD95) обнаружены у 0—2.5 % клеточной популяции. Микрорельефная КФ-поверхность образцов повышала концентрацию IL-8 до 183 и 160 % от соответствующих значений в 2D- и 3D-культурах Jurkat Т-клеток. Соотношение CD4/CD8 падало до 9:1 (при 13 : 1 и 82 : 1 в 2D- и 3D-контроле соответственно) за счет как снижения доли CD4<sup>+</sup>, так и увеличения доли CD8<sup>+</sup>-клеток. Общее количество клеток (ОКК) в культуре после 24-часового контакта с КФ-покрытием оказалось сниженным до 88 % от 2D-контроля ( $P < 0.04$ ), что может свидетельствовать в пользу торможения процессов клеточного деления. Снижение ОКК в культуре Jurkat сопровождалось усилением спонтанной секреции IL-8 ( $r = -0.97$ ;  $P < 0.00009$ ). При этом IL-8 в низких концентрациях (пг/мл) индуцировал апоптоз ( $r = 0.94$ ;  $P < 0.0001$ ). Полученные результаты позволяют предположить, что КФ-покрытие, но не оксидные покрытия на титане могут иметь значение в случае выбора материала при эндопротезировании и остеосинтезе переломов у больных, страдающих опухолями кровеносной и костной тканей.

Ключевые слова: Т-клетки Jurkat, мембранные маркеры, цитокины, апоптоз, некроз, титановые подложки, микродуговое кальций-фосфатное покрытие, микрорельеф.

Принятые сокращения: КФ — кальций-фосфатный, ОКК — общее количество клеток, CD — кластерные детерминанты, IL — интерлейкины, TNF $\alpha$  — фактор некроза опухоли альфа.

Быстро пролиферирующая линия лейкозных Т-лимфобластоподобных клеток Jurkat человека обладает характеристиками, сходными с Т-лимфоцитами человека (Au et al., 2006), активно используется для моделирования *in vitro* реакций Т-лимфоцитов при остром Т-лимфобластном лейкозе и лимфомах (Chen et al., 2008). С другой стороны, Т-клетки Jurkat используют для изучения иммунных и цитотоксических реакций на противоопухолевые препараты (Liao et al., 2011), токсиканты (Luongo et al., 2014) и биоматериалы (Stevens et al., 2009).

Однако в большинстве случаев используют клеточную культуру, стимулированную митогенами (см., на

пример: Kenny et al., 2013), химическими активаторами и модификаторами (Liao et al., 2011), которые в значительной степени искажают естественную клеточную реакцию на тестируемые лекарственные вещества и материалы, затрудняют интерпретацию полученных результатов.

В свою очередь биологическое и медицинское материаловедение быстро развивается в направлении искусственного воспроизведения (симуляции) условий естественного микроокружения для моделирования и изучения сигналов, регулирующих как поведение клеток (Lutolf et al., 2009), так и судьбу имплантатов в организме-хозяине (Ratner et al., 2004). Так, показана возможность имита-

пии физиологической границы раздела кость—костный мозг с помощью кальций-фосфатных (КФ) покрытий, нанесенных на металлические подложки (Хлусов и др., 2011).

Ответ клеточных систем на искусственный материал основан на каскаде событий, развитие которых неизбежно сопровождается активацией и хомингом иммунокомпетентных клеток в зоне имплантации, продукцией про- и противовоспалительных медиаторов. При этом Т-лимфоциты выступают в роли «дирижера» воспалительных и регенеративных процессов. Клетки Jurkat, стимулированные *in vitro* митогенами или химическими агентами, способны экспрессировать широкий спектр матричной РНК поверхностных молекул и цитокинов (Saito et al., 2011).

Ранее мы установили повышенные уровни экспрессии CD8 и секреции IL-8 в культуре клеток Jurkat, контактирующих с наноструктурным гладким КФ-покрытием, сформированным методом высокочастотного магнетронного распыления (Хлусов и др., 2012). Известно, что *in vitro* реакция клеток во многом зависит от состава (Vlaine et al., 1996) и технологии изготовления искусственных материалов.

В связи с этим в настоящей работе исследовали иммунофенотипические и секреторные реакции культуры Т-клеток линии Jurkat на краткосрочный контакт с рельефным КФ- или оксидным ( $\text{TiO}_2$ ) покрытием, сформированным методом микродугового оксидирования, в сравнении с культурой клеток на пластике.

## Материал и методика

Изготовление и физико-химические свойства покрытий на титане. Использовали подложки коммерчески чистого титана (имеющего состав (в массовых %): 99.58 Ti, 0.12 O, 0.18 Fe, 0.07 C, 0.04 N и 0.01 H) размером  $12 \times 12 \times 1$  мм, несущие двухстороннее покрытие из фосфатов кальция. Покрытие формировали методом микродугового оксидирования (Legostaeva et al., 2013) на полупромышленной установке Microarc-3.0 (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск) в анодном режиме. Электролит состоял (в весовых %) из водного раствора ортофосфорной кислоты (20 %), карбоната кальция (9 %) и синтетического гидроксиапатита (6 %). Порошок синтетического гидроксиапатита (ГАП) с диаметром частиц 40—100 нм получен механохимическим способом (Чайкина и др., 2008).

Морфологию и элементный состав поверхности образцов определяли на сканирующем электронном микроскопе Quanta 200 ESEM FEG со встроенным EDX-анализатором (EDS analysis system Genesis 4000, S-UTW-Si(Li)detector, FEI, Нидерланды). Элементный состав КФ-покрытия на титане варьировал в следующих пределах (в атомных %): 6.6—11.4 Ca, 17.4—21.1 P, 52.0—62.2 O и 12.3—17.8 Ti. Рентгенофазовый анализ (рентгеновский дифрактометр Shimadzu XRD-7000, Япония) показал преимущественную рентгеноаморфность сформированного КФ-покрытия. Небольшие пики на дифрактограммах соответствовали фазам бета-кальций-пирофосфата ( $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) и монетита ( $\text{CaHPO}_4$ ).

Обнаружены существенные различия в экспрессии генов и морфофункциональном поведении клеток в 2D- (стандартное двухмерное культивирование на пластике) и 3D-культурах (Birgersdotter et al., 2005). В связи с этим для определения вклада КФ-покрытия в реакцию клеток

на трехмерные (3D) образцы использовали титановые подложки аналогичного размера и шероховатости с микродуговым покрытием диоксида титана  $\text{TiO}_2$  (при соотношении атомных % 44 Ti и 56 O), сформированным с помощью установки Microarc-3.0 в водном растворе 20%-ной ортофосфорной кислоты, как описано ранее (Хлусов и др., 2015). Биоинертный слой  $\text{TiO}_2$  является переходным между титановой подложкой и собственно КФ-покрытием (Legostaeva et al., 2013) и может служить 3D-контролем для сравнения с клеточным ответом на КФ-покрытие.

Шероховатость  $\text{TiO}_2$ - и КФ-покрытий определяли с помощью профилометра Talysurf 5-120 (Taylor Hobson Ltd., Великобритания) согласно ГОСТ 2789—73 по индексу Ra, который рассчитывается как среднее арифметическое 10 измерений отклонений профиля поверхности в пределах базовой длины измерения 1.5 мм. Применяли образцы с индексом шероховатости Ra в диапазоне 2.2—2.7 мкм, что соответствует биологически активному диапазону рельефа КФ-покрытий для морфофункциональной реакции клеток периферической крови (Хлусов и др., 2010). Толщина КФ-покрытий, измеренная согласно ГОСТ 9.302-88 ЕСЗКС с помощью микрометра МК-25 (Россия), составила в среднем 28—32 мкм.

Клетки и тестирование их морфофункциональной реакции. Использовали иммортализованную линию Jurkat 5332 лейкозных Т-лимфоцитов-подобных клеток человека (из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) в конечной концентрации  $1 \cdot 10^6$  жизнеспособных клеток в 1 мл питательной среды. Концентрацию и жизнеспособность клеток до культивирования определяли с помощью автоматического счетчика клеток Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen, США), используя 0.4%-ный раствор трипанового синего (Invitrogen, США). Доля жизнеспособных клеток составляла 98 %. Клетки ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из 90 % RPMI-1640 (Sigma, США), 10 % инактивированной (при 56 °C в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров (Sigma, США) и 0.3 мг/мл L-глутамин (Sigma, США). В каждую из трех лунок 24-луночного планшета (Orange Scientific, Бельгия; площадь лунки 1.86 см<sup>2</sup>) помещали по 1 аттестованному образцу с КФ-покрытием, культивировали в течение 24 ч при 37 °C и 5 %  $\text{CO}_2$ . Контролем служила клеточная взвесь без образцов (2D-контроль, 6 лунок) или с подложками, несущими  $\text{TiO}_2$ -покрытие (3D-контроль, 3 лунки с образцами).

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. Процентное соотношение живых и погибших (апоптотических и некротических) форм клеток, общее количество клеток (ОКК) в пробе определяли методом проточной цитофлуориметрии на аппарате Guava EasyCytePlus (Millipore, США) с использованием реагента и программы Guava Via Count (Millipore, США).

Регистрацию антигенного профиля клеток проводили методом, основанным на взаимодействии специфических моноклональных антител с кластерными детерминантами на клеточных мембранах в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. После культивирования клетки отмывали фосфатным буфером (pH 7.2) и в

объеме 10 мкл связывали стандартными моноклональными антителами, меченными флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), аллофикоцианином (APC), фикоэритрином (PE) или перидининовым белком хлорофилла (Per-CP) (Abscam, Великобритания; e-Bioscience, США), к маркерам клеточной пролиферации, дифференцировки и созревания (CD3-FITC, CD4-PE, CD8-Per-CP, CD16-FITC, CD25-APC, CD45RO-FITC, CD45RA-PE, CD56-PE, CD71-APC и CD95-FITC).

После 30 мин 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).

Для оценки спонтанной секреции интерлейкинов и фактора некроза опухоли применяли твердофазный иммуноферментный «сандвичевый» метод. Процедуру осуществляли согласно инструкциям, предлагаемому производителем тест-систем цитокинов (Вектор Бест, Россия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе Laurusit (Dyplex Technologies, США). Концентрацию цитокинов (IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и TNF $\alpha$ ) выражали в пг/мл.

Результаты обрабатывали с применением программы STATISTICA for Windows 6.0. Рассчитывали параметры распределений: медиану (Me), квартили 25 % (Q<sub>1</sub>) и 75 % (Q<sub>3</sub>). Для оценки статистической значимости различий использовали непараметрический критерий Манна—Уитни (U-тест, P<sub>ij</sub>). Различия считали статистически значимыми при P < 0.05. Связь между исследуемыми показателями устанавливали с помощью регрессионного (r) и корреляционного (r<sub>s</sub> по Спирмену) анализов.

## Результаты и обсуждение

Согласно полученным результатам в стандартной 2D-контрольной культуре на пластиковой поверхности культурального сосуда, клетки Jurkat человека экспрессируют широкий спектр мембранных маркеров (табл. 1). Большая часть клеток (95 %) является CD45RA<sup>+</sup>-наивными (не активированными антигеном) Т-клетками. Основная доля клеток (27—98 %) в 24-часовой культуре несла антигены CD3, CD4, CD71 и CD45RA. Другие маркеры клеточной дифференцировки, созревания и смерти (CD8, CD16, CD56, CD25 и CD95) обнаружены менее чем у 2.5 % опухолевых клеток (табл. 1). По морфофункциональным параметрам выявленный иммунофенотип соответствует наивным (покоящимся) Т-хелперам (индукторам) (Gallagher et al., 1989; Law et al., 2008) с экспрессией рецептора к трансферрину (CD71), митогену Т-лимфоцитов (Vi et al., 1997). Только у 0.55 % Т-клеток в 24-часовой культуре присутствует CD45RO-изоформа трансмембранного антигена, экспрессирующаяся *in vitro* на активированных Т-лимфоцитах и (или) Т-клетках памяти (Akbar et al., 1988; Law et al., 2008).

Клетки Jurkat спонтанно секретировали в межклеточную среду (табл. 2) широкий спектр иммуномодулирующих цитокинов и хемокинов с провоспалительной (IL-2, IL-8 и TNF $\alpha$ ) и противовоспалительной (IL-4 и IL-10) активностью (Khalaf et al., 2010). При этом IL-2, IL-4

(Де Вита и др., 2002) и IL-8 (Waugh, Wilson, 2008) повышают пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток посредством аутокринных (паракринных) сигнальных путей.

Тем не менее средний уровень секреции IL-2 в 5.67 пг/мл, определяемый в супернатантах (табл. 2), не сопровождался экспрессией рецептора (CD25-антигена) к данному цитокину (табл. 1). По-видимому, IL-2-зависимый путь (сам цитокин и рецептор к нему на клетках), считающийся основным механизмом аутокринной пролиферации Т-клеток Jurkat, в нашем исследовании не являлся определяющим для выживаемости опухолевого клона *in vitro*.

В свою очередь IL-1 рассматривается как аутокринный стимулятор роста лейкозных лимфоцитов (Jasmin et al., 1990), в том числе линии Jurkat (Arana-Argaez et al., 2010), и эндогенный ингибитор их CD95-опосредованного апоптоза (Tatsuta et al., 1996). IL-6 также действует антиапоптотически в отношении Т-клеток (Law et al., 2008).

В условиях отсутствия секреции костимулирующих аутокринных факторов (IL-1 и IL-6; табл. 2) обнаруженный дисбаланс секреции IL-2 (табл. 2) при полном отсутствии экспрессии его рецептора (CD25 антигена) (табл. 1) мог лежать в основе медленного роста клеток Jurkat *in vitro*. Кроме того, IL-10 способен индуцировать анергию Т-клеток (Groux et al., 1996), подавлять их пролиферацию и активацию, ингибировать экспрессию IL-2 (Khalaf et al., 2010). В определенной степени данные, полученные в стандартной культуре Jurkat, подтверждают гипотезу (Raff et al., 1993) о необходимости нескольких «сигналов выживания» для подавления генетической программы клеточной смерти.

Мы не применяли митогены, цитокины или химические активаторы, увеличивающие концентрацию цитокинов в супернатантах клеточных культур в 100—1000 раз (Terui et al., 1998), что способствует адаптации (выживанию) клеточной культуры, трудно достижимой в естественных условиях. В связи с этим, согласно данным табл. 1, часть клеток Jurkat в 24-часовой культуре погибала в результате апоптоза (медиана 5.2 %) и некроза (медиана 8.2 %).

Добавление в клеточную культуру образцов титана с TiO<sub>2</sub>-покрытием (3D-контроль для КФ-покрытий) изменяло морфофункциональное состояние лейкозных Т-лимфобластоидных клеток человека (табл. 1, 2). Контакт с чужеродной поверхностью не вызывал увеличения экспрессии низкомолекулярной изоформы CD45-молекулы (CD45RO), характерной для стимулированных Т-клеток. Однако проточная цитофлуориметрия показала меньшие (табл. 1) доли клеток, экспрессирующих антигены дифференцировки и созревания Т-клеток: CD3 — на 0.5, CD4 — на 2.1 %, а CD8 — в 6 раз в сравнении с контролем.

Краткосрочный контакт Т-клеток с TiO<sub>2</sub>-покрытием не сопровождался изменением секреции IL-2, основного лимфокина, продуцируемого этой клеточной линией. В то же время выход IL-4, способного тоже усиливать рост Т-клеток и генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов (Де Вита и др., 2002), снижался до нулевого значения (табл. 2).

Таким образом, биоинертная TiO<sub>2</sub>-поверхность (Ogawa, 2014) вызывала морфофункциональную инактивацию Т-клеток Jurkat. Она не сопровождалась усилением процессов апоптоза или некроза в выбранной нами клеточ-



Таблица 1

Молекулярные маркеры мембран и показатели клеточной смерти Т-клеток Jurkat после 24 ч культивирования с образцами, несущими разную видности микродугового покрытия на титановой подложке

Доля погибших клеток, % (n = 6—9)		Доля клеток, экспрессирующих мембранные маркеры, % (n = 12—15)									
апоптоз	некроз	CD3	CD4	CD8	CD71	CD45RO	CD45RA	CD16	CD56	CD25	CD95
Клеточная культура на пластиковой поверхности культурального планшета (2D-контроль)											
5.2 (5.2—8.9)	8.2 (8.1—14.2)	98.0 (97.9—98.85)	27.5 (26.54—28.43)	2.16 (1.9—3.0)	94.0 (93.5—95.0)	0.55 (0.49—0.60)	94.9 (94.0—95.22)	2.46 (2.34—2.83)	2.5 (2.3—2.97)	0 (0—0.16)	1.0 (0.9—1.2)
Клеточная культура в присутствии образцов с TiO <sub>2</sub> -покрытием (3D-контроль)											
5.9 (5.6—6.9)	15.3 (8.2—19.3)	97.5 (97—98) P1 < 0.03	25.4 (24.76—26.70) P1 < 0.002	0.31 (0.2—0.43) P1 < 0.000003	94.0 (93.49—95.00)	0.50 (0.41—0.50)	94.0 (93.15—94.3)	2.33 (2.17—2.34)	2.36 (2.22—2.80)	0 (0—0.12)	0.56 (0.3—0.6) P1 < 0.002
Клеточная культура в присутствии образцов с кальций-фосфатным покрытием (эксперимент)											
5.5 (5.0—6.7)	12.0 (7.6—20.4)	98.0 (97—98)	25.10 (23.86—25.96) P1 < 0.0002	2.67 (2.41—2.9) P1 < 0.05 P2 < 0.000003	93.0 (92.0—93.0) P1 < 0.013 P2 < 0.014	0.50 (0.50—0.50)	94.25 (93.0—95.5)	3.20 (2.11—4.85)	3.24 (2.7—3.41) P2 < 0.04	0 (0—0)	0.93 (0.9—1.06) P2 < 0.002

Примечание. Здесь и в табл. 2: n — число наблюдений в каждой группе; P1 — достоверность различий по сравнению с клеточной культурой на пластиковой поверхности культурального планшета (2D-контроль); P2 — достоверность различий по сравнению с клеточной культурой в присутствии образцов с TiO<sub>2</sub>-покрытием (3D-контроль). Результаты получены с помощью точечной диаграммы с использованием соответствующих моноклональных антител. Для каждой выборки вычисляли средневзвешенные характеристики: медиану (M), первый и третий квартили (Q<sub>1</sub> и Q<sub>3</sub>).

ной системе (табл. 1) вследствие уменьшения активности компонентов суперсемьи TNF (CD95(Fas/APO-1) и TNFα). Секреция клетками TNFα и экспрессия ими CD95 снижались соответственно до 90 (P<sub>U</sub> < 0.01) и 56 (P<sub>U</sub> < 0.002) % по сравнению с соответствующими показателями в 2D-контроле (табл. 1, 2).

Рельефная КФ-поверхность (индекс шероховатости Ra = 2.5—2.6 мкм), как и рельефное TiO<sub>2</sub>-покрытие (Ra = 2.2—2.7 мкм) подавляли секрецию IL-4 (табл. 2). Кроме того, уменьшался выход IL-2 и IL-10 (в 1.5—2 раза) в межклеточную среду. Напротив, концентрация IL-8 в супернатантах клеток, контактировавших с КФ-покрытием, возрастала до 183 и 160 % в 2D- и 3D-контроле соответственно (табл. 2). При этом на 1 % (P<sub>U</sub> < 0.013) уменьшалась экспрессия рецептора трансферрина (CD71), падало соотношение CD4/CD8 (9 : 1 при 13 : 1 в 2D-контроле и 82:1 в 3D-контроле) за счет как снижения (по сравнению с 2D-контролем) доли CD4<sup>+</sup>-клеток, так и увеличения доли CD8<sup>+</sup>-клеток по отношению к обоим контролям (табл. 1). Доля CD8<sup>+</sup>-Т-клеток росла линейно с увеличением шероховатости КФ-покрытия (r = 0.69, P < 0.005, n = 15).

Интересно, что статистически значимое (но менее выраженное в сравнении с микродуговыми КФ-покрытиями) повышение уровня экспрессии CD8 и секреции IL-8 в культуре клеток Jurkat, контактирующих с наноструктурным тонким (толщиной менее 1 мкм), гладким (Ra 1 мкм) КФ-покрытием, но сформированным методом высокочастотного магнетронного распыления, было показано нами ранее (Хлусов и др., 2012). Возможно, существуют общие закономерности морфофункциональной реакции этих клеток на КФ-поверхности независимо от технологии их формирования и физико-химических особенностей.

Экспрессия IL-8, провоспалительного хемокина подсемейства CXC, регулируется широким спектром сигналов. К ним относятся TNFα, IL-1b, цитостатические препараты, гипоксия, ишемия (Brat et al., 2005) и другие расстройства тканевого гомеостаза, сопровождающиеся ростом концентраций TNFα и IL-1b (Baggiolini, Clark-Lewis, 1992), что свидетельствует об изменении состояния клеточного микроокружения. В наших экспериментах с КФ-покрытием высокая секреция IL-8 не была связана с изменением уровней белков острой фазы воспаления (табл. 2) и могла быть обусловлена прямым и опосредованным (через продукты биодеградации) влиянием структурированных фосфатов кальция. В плане обсуждения возможных механизмов выявленного феномена важными представляются результаты о влиянии внеклеточного кальция на активацию и пролиферацию Т-клеток (Dadsetan et al., 2008).

Наши данные показали, что общее количество клеток (ОКК) в культуре Jurkat после 24-часового контакта с КФ-покрытием оказалось сниженным до 88 % от показателя 2D-контроля (P<sub>U</sub> < 0.04), что может свидетельствовать в пользу торможения процессов их деления. Не было выявлено статистических различий между формами гибели клеток в сравниваемых группах (табл. 1). Однако корреля-

Концентрация цитокинов в супернатантах Jurkat Т-клеток после 24 ч культивирования с модельными имплантатами, несущими разновидности микродугового покрытия на титановой подложке

Концентрация цитокинов, пг/мл (n = 12)						
IL-1b	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	TNF $\alpha$
Клеточная культура на пластиковой поверхности культурального планшета (2D-контроль)						
0 (0—0.23)	5.67 (5.46—5.98)	1.10 (0.74—1.24)	0	11.12 (9.18—12.59)	6.10 (5.40—6.96)	14.95 (13.97—15.51)
Клеточная культура в присутствии образцов с TiO <sub>2</sub> -покрытием (3D-контроль)						
0 (0—0.10)	6.10 (3.30—8.10)	0 (0—0.79) <i>P</i> 1 < 0.007	0	12.78 (11.71—13.22)	7.80 (4.87—9.86)	13.48 (8.0—14.15) <i>P</i> 1 < 0.01
Клеточная культура в присутствии образцов с кальций-фосфатным покрытием (эксперимент)						
0 (0—0)	3.79 (1.14—5.35) <i>P</i> 1 < 0.05	0 (0—0) <i>P</i> 1 < 0.001 <i>P</i> 2 < 0.05	0	20.46 (19.15—24.42) <i>P</i> 1 < 0.001 <i>P</i> 2 < 0.001	3.0 (2.05—3.95) <i>P</i> 1 < 0.001 <i>P</i> 2 < 0.001	15.13 (13.05—16.08) <i>P</i> 2 < 0.01

ция доли жизнеспособных Т-клеток с долей некротических клеток в популяции была обратной ( $r_s = -0.95$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 9$ ), регрессионный анализ показал линейную зависимость этих показателей ( $r = -0.99$ ,  $P < 0.0000004$ ,  $n = 9$ ). Корреляционный анализ выявил обратную зависимость ОКК от концентрации IL-8 ( $r_s = -0.81$ ,  $P < 0.016$ ,  $n = 8$ ) в условиях 24-часового сокультивирования клеток Jurkat с КФ-покрытием. Регрессионный анализ подтвердил сильную линейную связь показателей (см. рисунок).

Часть авторов считают IL-8 аутокринным (паракринным) фактором, позволяющим опухолевым клеткам адаптироваться к разнообразным стрессам, усиливая выживание и пролиферацию (Waugh, Wilson, 2008). Другие рассматривают этот цитокин как фактор, индуцирующий апоптоз Jurkat и других лейкоцитарных линий (K562, HL-60, KG-1, U937 и THP-1) (Terui et al., 1998).

Полученные нами результаты однозначно говорят о том, что при 24-часовом контакте с рельефным КФ-покрытием усиление спонтанной секреции IL-8 сопровож-

дается снижением ОКК в культуре клеток Jurkat (см. рисунок). При этом даже в низких концентрациях (пг/мл) IL-8 индуцирует их апоптоз ( $r_s = 0.78$ ,  $P < 0.014$ ,  $n = 9$ ;  $r = 0.94$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 9$ ). В случае TiO<sub>2</sub>-покрытия подобных закономерностей не обнаружено. Основная стратегия (иммуно)биотерапии лейкемии связана с индукцией апоптоза лейкозных клеток (Fisher, 1994). Полученные результаты могут иметь значение в случае выбора материала при эндопротезировании и остеосинтезе переломов у больных, страдающих опухолями кроветворной и костной тканей.

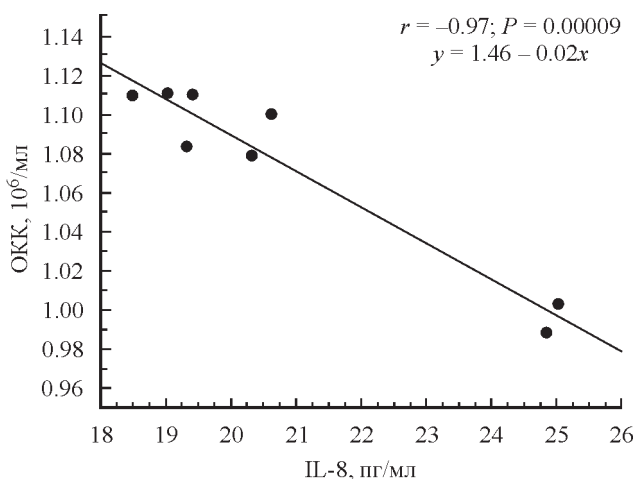
Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10031; сравнительный анализ результатов культивирования клеток в 2D- и 3D-культурах) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-03-07659; изготовление трехмерных матриц и тестирование их физико-химических свойств для культивирования клеток).

### Список литературы

De Vita V. T., Hellman S., Rosenberg S. A. (Eds.). 2002. Биологические методы лечения онкологических заболеваний. М.: Медицина. 936 с. (De Vita V. T., Hellman S., Rosenberg S. A. (Eds.). 2002. Biological methods of cancer treatment. Moscow: Meditsina. 936 p.)

Хлусов И. А., Нечаев К. А., Шевцова Н. М., Хлусова М. Ю., Дворниченко М. В., Зайцев К. В., Колокольцова Т. Д., Бобасов Е. Н., Шаркеев Ю. П., Легостаева Е. В., Сабурин И. Н. 2010. К вопросу о фибробластоподобных клетках в периферической крови человека. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 5 (4): 72—78. (Khlusov I. A., Nechaev K. A., Shevtsova N. M., Khlusova M. Yu., Dvornichenko M. B., Zaitsev K. V., Kolokoltsova T. D., Bobasov E. N., Sharkeev Yu. P., Legostaeva E. V., Sabourin I. N. 2010. On the question of fibroblast-like cells in human peripheral blood. Cell. Transplant. Tissue Eng. 5 (4): 72—78.)

Хлусов И. А., Сурменева 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. 2012. Клеточно-молекулярные аспекты иммунологической совместимости имплантатов с наноструктурным кальцийфосфатным покрытием.



Регрессионная зависимость общего количества клеток (ОКК) от концентрации IL-8 в культуре клеток Jurkat после 24-часового контакта с рельефным кальций-фосфатным покрытием на титановой подложке.

- ем. Бюл. сиб. мед. 4 : 78—85. (Khlusov I. A., Surmeneva M. A., Surmenev R. A., Ryazantseva N. V., Saveliyeva O. Ye., Ivanova A. A., Prokhorenko T. S., Tashireva L. A., Dvornichenko M. V., Pichugin V. F. 2012. Cellular and molecular aspects of immunologic compatibility of implants with nanostructured calcium phosphate coating. Bull. Sib. Med. 4 : 78—85.)
- Хлусов И. А., Шаркеев Ю. П., Пичугин В. Ф., Легостаева Е. В., Литвинова Л. С., Щуплецова В. В., Сохоневич Н. А., Хазиахматова О. Г., Хлусова М. Ю., Гутор С. С., Толкачева Т. В. 2015. Влияние структуры поверхности оксидных покрытий титана на иммунокомпетентные опухолевые клетки. Изв. высших учебных заведений. Физика. 58 (11) : 40—46. (Khlusov 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. 2016. Influence of the structure of the titanium oxide coating surface on immunocompetent tumor cells. Russian Physics J. 58 (11) : 1527—1533.)
- Хлусов И. А., Шевцова Н. М., Хлусова М. Ю., Зайцев К. В., Шаркеев Ю. П., Пичугин В. Ф., Легостаева Е. В. 2011. Концепция «ниша—рельеф» для стволовых клеток как основа биомиметического подхода к инженерии костной и кровеносной тканей. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 6 (2) : 55—64. (Khlusov I. A., Shevtsova N. M., Khlusova M. Yu., Zaitsev K. V., Sharkeev Yu. P., Pichugin V. F., Legostaeva E. V. 2011. Niche-relief conception for stem cells as a basis of biomimetic approach to bone and hemopoietic tissues engineering. Cell. Transplant. Tissue Eng. 6 (2) : 55—64.)
- Чайкина М. В., Уваров Н. Ф., Улихин А. С., Хлусов И. А. 2008. Механохимический синтез наноразмерных функциональных материалов со структурой апатита. Вopr. материаловед. 54 (2) : 219—232. (Chaikina M. V., Uvarov N. F., Ulihin A. S., Khlusov I. A. 2008. Mechanochemical synthesis of nano-sized functional materials with the apatite-type structure. Problems Materials Sci. 54 (2) : 219—232.)
- Akbar A. N., Terry L., Timms A., Beverley P. C., Janossy G. 1988. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. J. Immun. 140 : 2171—2178.
- Arana-Argaez V. E., Delgado-Rizo V., Pizano-Martinez O. E., Martinez-Garcia E. A., Martin-Marquez B. T., Munoz-Gomez A., Petri M. H., Armendariz-Borunda J., Espinosa-Ramirez G., Zuniga-Tamayo D. A., Herrera-Esparza R., Vazquez-Del Mercado M. 2010. Inhibitors of MAPK pathway ERK1/2 or p38 prevent the IL-1-induced up-regulation of SRP72 autoantigen in Jurkat cells. J. Biol. Chem. 285 : 32 824—32 833.
- Au A., Ha J., Hernandez M., Polotsky A., Hungerford D. S., Frondoza C. G. 2006. Nickel and vanadium metal ions induce apoptosis of T-lymphocyte Jurkat cells. J. Biomed. Mater. Res. A. 79 (3) : 512—521.
- Baggiolini M., Clark-Lewis I. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine: minireview. FEBS. 307 : 97—101.
- Bi B. Y., Lefebvre A. M., Dus D., Spik G., Mazurier J. 1997. Effect of lactoferrin on proliferation and differentiation of the Jurkat human lymphoblastic T cell line. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.). 45 : 315—320.
- Birgersdotter A., Sandberg R., Ernberg I. 2005. Gene expression perturbation *in vitro* — a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. Semin. Cancer Biol. 15 : 405—412.
- Blaine T. A., Rosier R. N., Puzas J. E., Looney R. J., Reynolds P. R., Reynolds S. D., O'Keefe R. J. 1996. Increased levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  and Interleukin-6 protein and messenger RNA in human peripheral blood monocytes due to titanium particles. J. Bone Joint Surgery (American). 78 : 1181—1192.
- Brat D. J., Bellail A. C., Van Meir E. G. 2005. The role of Interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. Neuro-oncology. 7 : 122—133.
- Chen X., Su J., Chang J., Kanekura T., Li J., Kuang Y. H., Peng S., Yang F., Lu H., Zhang J. L. 2008. Inhibition of CD147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell proliferation, activation, adhesion, and migration activity in the human Jurkat T-lymphoma cell line. Cancer Invest. 26 : 689—697.
- Dadsetan S., Zakharova L., Molinski T. F., Fomina A. F. 2008. Store-operated Ca<sup>2+</sup> influx causes Ca<sup>2+</sup> release from the intracellular Ca<sup>2+</sup> channels that is required for T cell activation. J. Biol. Chem. 283 : 12 512—12 519.
- Fisher D. E. 1994. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. Cell. 78 : 539—542.
- Gallagher P. F., de St. Groth B. F., Miller J. F. 1989. CD4 and CD8 molecules can physically associate with the same T-cell receptor. PNAS USA. 86 : 10 044—10 048.
- Groux H., Bigler M., de Vries J. E., Roncarolo M. G. 1996. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. J. Exp. Med. 184 : 19—29.
- Jasmin C., Georgoulis V., Smadja-Joffe F., Boycheix C., Le Bousse-Kerdiles C., Allouche M., Cibert Ch., Azzarone B. 1990. Autocrine growth of leukemic cells. Leukemia Res. 14 : 689—693.
- Kenny O. M., McCarthy C. M., Brunton N. P., Hossain M. B., Rai D. K., Collins S. G., Jones P. W., Maguire A. R., O'Brien N. M. 2013. Anti-inflammatory properties of potato glycoalkaloids in stimulated Jurkat and Raw 264.7 mouse macrophages. Life Sci. 92 : 775—782.
- Khalaf H., Jass J., Olsson P. E. 2010. Differential cytokine regulation by NF-kappaB and AP-1 in Jurkat T-cells. BMC Immunol. 11 : 26. Doi: 10.1186/1471-2172-11-26.
- Law H. K. W., Tu W., Liu E., Lau Y. L. 2008. Insulin-like growth factor I promotes cord blood T cell maturation through monocytes and inhibits their apoptosis in part through interleukin-6. BMC Immunol. 9 : 74—86.
- Legostaeva E. V., Kulyashova K. S., Komarova E. G., Eple M., Sharkeev Y. P., Khlusov I. A. 2013. Physical, chemical and biological properties of micro-arc deposited calcium phosphate coatings on titanium and zirconium-niobium alloy. Materialwiss werkst. 44 : 188—197.
- Liao H. F., Chen Y. J., Chou C. H., Wang F. W., Kuo C. D. 2011. Norcantharidin induces cell cycle arrest and inhibits progression of human leukemic Jurkat T cells through mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of Interleukin-2 production. Toxicol. In Vitro. 25 : 206—212.
- Luongo D., Russo R., Balestrieri A., Marzocco S., Bergamo P., Severino L. 2014. *In vitro* study of AFB1 and AFM1 effects on human lymphoblastoid Jurkat T-cell model. J. Immunotoxicol. 11 : 353—358.
- Lutolf M. P., Gilbert P. M., Blau H. M. 2009. Designing materials to direct stem-cell fate. 462 : 433—441.
- Ogawa T. 2014. Ultraviolet photofunctionalization of titanium implants. Int. J. Oral Maxillofac. Implants. 29 : 95—102.
- Raff M. C., Barres B., Burne J. F., Coles H. S., Ishizaki Y., Jacobson M. D. 1993. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. Science. 262 : 695—700.
- Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J. E. 2004. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 2<sup>nd</sup> Ed. San Diego: Elsevier AP. 851 p.
- Saito R., Hirakawa S., Ohara H., Yasuda M., Yamazaki T., Nishii S., Aiba S. 2011. Nickel differentially regulates NFAT and NF- $\kappa$ B activation in T cell signaling. Toxicol. Appl. Pharmacol. 254 : 245—255.
- Stevens M. J., Donato L. J., Lower S. K., Sahai N. 2009. Oxide-dependent adhesion of the Jurkat line of T lymphocytes. Langmuir. 25 : 6270—6278.
- Tatsuta T., Cheng J., Mountz J. D. 1996. Intracellular IL-1beta is an inhibitor of Fas-mediated apoptosis. J. Immunol. 157 : 3949—3957.
- 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. 1998. Activated endothelial cells induce apoptosis in leukemic cells by endothelial Interleukin-8. Blood. 92 : 2672—2680.
- Waugh D. J. J., Wilson C. 2008. The Interleukin-8 pathway in cancer. Clin. Cancer Res. 14 : 6735—6741.

MORPHOFUNCTIONAL CHANGES OF JURKAT LINE T-LYMPHOBLASTS  
AT SHORT-TERM CONTACT WITH RELIEF CALCIUM PHOSPHATE SURFACE

I. A. Khlusov,<sup>1,2,\*</sup> L. S. Litvinova,<sup>3</sup> V. V. Shupletsova,<sup>3</sup> N. A. Dunets,<sup>3</sup> O. G. Khaziakhmatova,<sup>3</sup>  
K. A. Yurova,<sup>3</sup> M. Yu. Khlusova,<sup>4</sup> Yu. P. Sharkeev<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Morphology and General Pathology Department, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050,

<sup>2</sup> Experimental Physics Department, Tomsk Polytechnic University, Tomsk, 634050,

<sup>3</sup> Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041,

<sup>4</sup> Pathophysiology Department, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050, and

<sup>5</sup> Institute of Strength Physics and Materials Science RAS, Tomsk, 634055;

\* e-mail: khlusov63@mail.ru

Human leukemic T-lymphoblastoid cells (hereinafter Jurkat T-cells) were used to model T-lymphocytes morphofunctional reaction to 24-h *in vitro* contact with relief (roughness index Ra = 2.2—2.7 μm) pure titanium substrates (12×12×1 mm<sup>3</sup>) covered by calcium phosphate (CP) bilateral coating that was prepared by micro-arc method. Jurkat T-cell culture on plastic surface of well plate (2D control of culture growth), as well as the cells that contacted for 24 h with oxide (TiO<sub>2</sub>) micro-arc coating on pure titanium substrate (3D control) served as comparison tests. 27—98 % of immortalized cells in 2D control culture had CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> immunophenotype and secreted IL-2, IL-4, IL-8, IL-10 and TNFα, but not IL-1b and IL-6. Other markers of cell activation, differentiation, maturation and death (CD8, CD16, CD56, CD25, CD95) were found at 0—2.5% of the cell population. Microtextured CP surface elevated statistically IL-8 outcome to 183 and 160 % of corresponding control values in 2D- and 3D-cultures of Jurkat T-cells. CD4/CD8 ratio fell to 9 : 1 (at 13 : 1 and 82 : 1 in 2D- and 3D-controls, respectively) both by CD4<sup>+</sup> depletion and by CD8<sup>+</sup> cell percent raise. Total amount of cells (TAC) in Jurkat T-cell culture after 24-h contact with CP coating was decreased to 88 % 2D control level ( $P < 0.04$ ) that could favor to a suppression of cell division. TAC reduction in Jurkat T-cell culture was accompanied by accelerated IL-8 spontaneous secretion ( $r = -0.97$ ,  $P < 0.00009$ ). For all this, IL-8 induced apoptosis ( $r = 0.94$ ,  $P < 0.0001$ ) in low concentrations (pg/ml). The obtained result is the feature of Jurkat T-cells reaction on CP but not TiO<sub>2</sub> coatings, and it may be used in case of materials selection for endoprosthesis replacement and fracture osteosynthesis in patients suffering by hematological and bone malignancies.

**Key words:** Jurkat T-cell line, membrane markers, cytokines, apoptosis, necrosis, titanium substrates, micro-arc calcium phosphate coating, microtopography.