

Мелащенко Елена Сергеевна

**КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ РЕАКЦИИ
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК
В ТРЕХМЕРНОЙ КУЛЬТУРЕ**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования "Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта"

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Литвинова Лариса Сергеевна

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор Хлусов Игорь Альбертович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
лаборатории экологической
иммунологии ФГБОУ Институт
экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН

Заморина Светлана Анатольевна

доктор медицинских наук,
профессор кафедры органической
химии ФГАОУ ВО НИ ТГУ
Минобрнауки России

Чурина Елена Георгиевна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)

Защита состоится __ _____ в ___ ч на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и на сайте <http://www.ssmu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2020г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Система крови и костная ткань функционируют взаимосвязано и имеют общие сигнальные пути и регуляторные механизмы. Иммунокомпетентные клетки крови, в частности, и иммунная система, в целом, принимают непосредственное участие в процессах как физиологического, так и репаративного остеогенеза. В связи с этим, в последние годы сформировалась новая концепция, получившая название "остеоиммунология" (Arton J.R., Choi Y., 2000). В отличие от репаративных процессов, протекающих в различных внутренних органах, которые завершаются во взрослом организме, как правило, формированием рубца, воспаление и регенерация в кости приводят к образованию новой костной ткани (Hoff P. et al., 2016).

Однако, изучение клеточно-молекулярных механизмов воспаления/регенерации в костной ткани, индуцированных иммунокомпетентными клетками (Humbert P. et al., 2019), основано, главным образом, на использовании *in vitro* стационарных двумерных (2D) культур клеток, которые не воспроизводят реальное существование клеточных систем *in vivo* в условиях локального микроокружения.

Степень разработанности темы. Лейкоциты крови, включая лимфоциты и моноциты, являются одними из первых клеток, мигрирующих в участок физиологической и, в большей степени, репаративной регенерации костной ткани, которые регулируют интенсивность воспалительных/регенераторных процессов (Loi F. et al., 2016). Одна из ключевых задач современных исследований состоит в расшифровке физиологических механизмов, определяющих *in vivo* и *in situ* реакции клеток на структурные и гуморальные сигналы микроокружения (Wang S. et al., 2019). Клетки существуют в сложных отношениях с экстрацеллюлярным матриксом (ЭЦМ) в качестве структурного компонента клеточного микроокружения. Проблемой является создание трехмерных (3D) конструкций, приближающихся по своим свойствам к природному ЭЦМ различных органов и тканей. В этом плане наиболее успешным техническим решением являются кальцийфосфатные (КФ) материалы, успешно применяющиеся в эксперименте и клинике, имитирующие состояние минерального вещества регенерирующей костной ткани (Шаркеев Ю.П. и др., 2014).

Для исследования закономерностей функционирования иммунокомпетентных клеток в физиологических условиях, характеризующихся низкой скоростью обновления костной ткани (Риггз Б.Л., Мелтон III Л.Дж., 2000), была разработана *in vitro* 3D-модель сокультивирования клеток крови с образцами, несущими рельефное КФ покрытие (3D-матрикса), имитирующее минеральное вещество регенерирующей костной ткани.

При репаративной регенерации включаются механизмы адаптации к экстремальному раздражителю, вызвавшему повреждение, что активирует локальное микроокружение костного мозга (Гольдберг Е.Д. и др., 1996), включая антиген-презентирующие клетки (АПК), которые, посредством гуморальных факторов, способствуют усиленной лейкоцитарной инфильтрации тканей. Такую физиологическую ситуацию мы экспериментально моделировали с помощью антиген-независимой активации Т-лимфоцитов. В *in vitro* культуру клеток крови добавлялся Т-клеточный активатор, содержащий частицы с лигандами к CD2CD3CD28 антигенам, которые симулируют процесс АПК-стимуляции Т-клеток. Для *in vitro* моделирования контакта с костной тканью применялась

комбинация гуморального сигнала АПК с 3D-матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани.

Целью работы являлось экспериментальное *in vitro* моделирование и изучение закономерностей функционирования и кооперации иммунокомпетентных клеток крови, в условиях *in vitro* культивирования с 3D-матриксом, имитирующим состояние минерального вещества регенерирующей костной ткани.

В соответствии с указанной целью решались следующие задачи:

1) Дать сравнительную оценку морфофункционального состояния (секреции, пролиферации, дифференцировки, созревания и гибели) иммунокомпетентных мононуклеарных клеток (МНК) в условиях 2D- или 3D-культивирования.

2) Оценить в сравнительном аспекте морфофункциональное состояние (секрецию, пролиферацию, дифференцировку, созревание и гибель) иммунокомпетентных клеток в условиях 2D- или 3D-культуры МНК, индуцированных Т-клеточным активатором, симулирующим сигналы АПК.

3) Определить молекулярные механизмы клеточной кооперации, их корреляционную связь с рельефом кальцийфосфатной поверхности 3D-матрикса.

Научная новизна

Впервые показано, что образцы с рельефным КФ покрытием, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани, формируют 3D- культуру МНК, индуцирующую молекулярную кооперацию иммунокомпетентных клеток посредством сети цитокинов и хемокинов с преимущественным провоспалительным потенциалом. Согласно корреляционному анализу, КФ поверхность выступает как неспецифический физиологический раздражитель иммунокомпетентных клеток. Впервые установлено, что антиген-независимая стимуляция МНК Т-клеточным активатором, имитирующим АПК-сигналинг, повышает клеточно-молекулярную кооперацию и двигательную (инвазия через микропористую мембрану) способность клеток. Приоритетными являются данные о синергичной клеточной стимуляции, обусловленной *in vitro* комбинацией сигналов АПК на трехмерной границе раздела клетка/поверхность регенерирующей кости (посредством добавления в культуру МНК 3D-матрикса с КФ покрытием и Т-клеточного активатора) и приводящей к повышенной экспрессии генов пролиферации (hTERT, ki-67), усиленной презентации CD антигенов дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов, поляризацией клеток на секрецию противовоспалительных/регенераторных цитокинов/хемокинов. При этом минеральное вещество регенерирующей костной ткани является триггером формирования локального клеточно-молекулярного 3D-микроокружения, способствующего взаимодействию иммунокомпетентных и антиген-презентирующих клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты фундаментального характера раскрывают новые молекулярно-генетические и морфофункциональные аспекты реакций иммунокомпетентных клеток, их *in vitro* взаимодействия друг с другом и с 3D-матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани. Представленные данные значительно отличаются от текущих представлений о механизмах функционирования клеток, полученных в обычной (двумерной стационарной) культуре *in vitro*. Полученные знания представляют фундаментально-прикладную ценность при анализе ключевых (интегральных) условий физиологии ремоделирования костной ткани, прогнозирования эффектов Т-лимфоцитов, сигналов АПК на границе раздела кровь/поверхность регенерирующей кости.

Практическая значимость исследования имеет значение при выборе имплантатов с оптимальной поверхностью для индивидуальных решений в области технологий биоинженерии костной ткани и персонифицированной биомедицины.

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе в Институте Живых Систем БФУ им. И. Канта г. Калининграда.

Методология и методы диссертационного исследования

В соответствии с поставленными задачами выбраны высокоинформативные методы исследования, которые выполнялись на базе современного Центра иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта (г. Калининград). В качестве материала исследования использовали периферическую венозную кровь здоровых добровольцев. Основные методы исследования:

1. Выделение МНК из периферической крови условно здоровых доноров стандартным методом градиентного центрифугирования.
2. Культуральные методы исследования *in vitro*.
3. Оценка уровня экспрессии генов, характеризующих дифференцировку (U2af114, Gfi1, hnRNPLL) иммунокомпетентных клеток, их пролиферативный потенциал (hTERT, ki-67) с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).
4. Определение маркеров активации (CD25, CD28), пролиферации (CD71) и поздней активации/апоптотической гибели (CD95), дифференцировки на хелперные (CD4) и цитотоксические (CD8) линии Т-лимфоцитов, выявление пула наивных (CD45RA) и примированных (CD45RO) иммунокомпетентных клеток, а также оценка жизнеспособности клеточных культур методом проточной цитометрии.
5. Количественное определение иммуномодулирующих факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов методом проточной флуориметрии (IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, TNF- α , VEGF).
6. Анализ клеточной инвазии через микропористую мембрану при помощи автоматизированной xCELLigence RTCA DP системы.
7. Статистический анализ данных.

Положения, выносимые на защиту

1. В стандартной краткосрочной 2D-культуре *in vitro* на пластиковой поверхности неприлипающие мононуклеарные клетки крови человека являются, в основном, Т-лимфоцитами и характеризуются низкой секреторной активностью.

2. Образцы с кальцийфосфатным покрытием, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани, формируют 3D-культуру, в которой выступают как неспецифические физиологические раздражители мононуклеарных клеток, вызывающие повышение секреции цитокинов и хемокинов с провоспалительным потенциалом.

3. Антиген-независимая стимуляция мононуклеарных клеток частицами с лигандами к CD2, CD3 и CD28, имитирующими сигналы АПК, повышает в культуре долю наивных Т-хелперов, значительно усиливает клеточно-молекулярную кооперацию, экспрессию детерминант активации Т-лимфоцитов, а также секреторную и двигательную способности клеток.

4. Экспериментальное *in vitro* моделирование антиген-независимой активации Т-лимфоцитов на 3D-границе раздела клетка/поверхность регенерирующей кости способствует синергичной клеточной стимуляции, включая повышение экспрессии генов пролиферации, презентации антигенов дифференцировки и созревания Т-

лимфоцитов, поляризацию культуры МНК с секрецией цитокинов/хемокинов, главным образом, с противовоспалительным/регенераторным эффектом.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов основывается достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных высокотехнологичных методов исследования (проточная цитофлуориметрия, культуральные методы, ПЦР, RTCA анализ клеточной инвазии, электронная и оптическая микроскопия) и современного оборудования, а также адекватного выбора критериев для статистической обработки результатов.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на III Всероссийском научном форуме "Наука будущего наука молодых" (г. Нижний Новгород, 2017), International Conference on Biotechnology and Bioengineering (г. Будапешт, 2018), Всероссийской конференции "Современные проблемы гистологии и патологии скелетных тканей" (г. Рязань, 2018).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 6 полнотекстовых статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, 7 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

Работа осуществлена при финансовой поддержке Российского научного фонда (16-15-10031), Совета по грантам Президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ (НШ-2690.2018.7) и Государственного задания (Соглашение от 27.12.2019, №075-03-2020-080 с Министерством науки и высшего образования Российской Федерации).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 11 таблицами. Библиографический указатель включает 329 источников (22 отечественных и 307 иностранных).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В основу работы положены результаты исследования *in vitro* культуры лейкоцитов крови 20 условно здоровых доноров (возраст 22-35 лет).

Критериями исключения из исследования являлись: возраст моложе 18 и старше 35 лет; период обострения хронических воспалительных заболеваний; инфекционные, онкологические, аутоиммунные, наследственные и психические болезни; алкогольная и наркотическая зависимости. Материал исследования - мононуклеарные клетки (МНК) из венозной крови (20 мл) здоровых доноров, полученной из локтевой вены с помощью стандартных вакуумных систем "BD VACUTAINER ТМ" (Greiner-bio-one, Австрия) с K₃ЭДТА. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Инновационного парка Балтийского федерального университета (БФУ) имени И.Канта (Разрешение №5 от 16.05.2016 г.). Экспериментальные исследования проведены в Центре иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И.Канта (директор Центра – д-р мед. наук Л.С. Литвинова). Дизайн исследования схематично представлен на рис. 1.

Моноклеарные клетки крови условно здоровых доноров



Рисунок 1 - Дизайн исследования. Ra - индекс шероховатости КФ поверхности.

Состояние трехмерной (3D) культуры клеток имитировали добавлением в клеточную культуру подложек ($10 \times 10 \times 1 \text{ мм}^3$) из коммерчески чистого титана (содержание составных элементов в весовых процентах: 99.58 Ti, 0.12 O, 0.18 Fe, 0.07 C, 0.04 N, 0.01 H), несущих рельефное (средний индекс шероховатости (по ГОСТ 2789-73) Ra = 2-5 мкм) микродуговое двустороннее кальцийфосфатное (КФ) покрытие, симулирующее состояние минерального матрикса регенерирующей костной ткани. При таком индексе Ra размер впадин в поверхности покрытия соответствует блюдцеобразным углублениям (до 40 мкм) (Риггз Б.Л., Мелтон III Л. Дж., 2000), образуемым остеокластами в кости при ее регенерации. Экспериментальные образцы 3D-матрикса изготовлены в Институте физики прочности и материаловедения СО РАН (г. Томск).

Выделение МНК из периферической крови осуществляли стандартным методом центрифугирования образцов в градиенте плотности фиколл-урографина (Pharmacia, Швеция) ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$). Культивирование МНК (3×10^6 кл/лунку) проводилось в течение 48 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Базовая полная питательная среда (ППС) состояла из RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), 10% инактивированной (56°C в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров (Sigma-Aldrich, США), 200 мМ/л L-глутамина (Sigma-Aldrich, США), 30 мкг/мл гентамицина (Gibco Life Technologies, США). В ППС для активационной модели культивирования, в отличие от гомеостатической, добавляли 10 мкл (1×10^6) анти-биотиновых MACSiBead™ частиц T-Cell Activation/Expansion Kit human с антителами к CD2, CD3 и CD28 антигенам (Miltenyi Biotec, Германия), имитирующими контакт с АПК (соотношение МНК и частиц составило 1:2).

Общее количество клеток (ОКК) и их жизнеспособность оценивали с использованием программы Guava ViaCount (Millipore, США), методом проточной лазерной цитометрии на приборе Guava Easy Cite Plus (Millipore, США). Иммунофенотипирование МНК проводилось с использованием коктейля моноклональных антител, исследуемые поверхностные молекулы CD4 (F) и CD8 (pE) (Евролаб, Россия), CD3 (ViO), CD25 (PerCy7), CD28 (PerCy7), CD71 (APC), CD95 (APC), CD45RA (PerCy7)/RO (APC) (Miltenyi Biotec, Germany) распределяли по трем группам. Результаты проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США).

Методом проточной флуориметрии количественно определяли концентрации факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов (IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, TNF- α , VEGF) в супернатантах культур (тест-система Bio-Plex Pro Human cytokine Group II 23-Plex Panel, Bio-Rad, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Результаты считывали на автоматическом фотометре для микропланшетов 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.

Выделение тотальной РНК (тРНК) из полученных образцов проводили с использованием реагента Extract RNA kit (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. В 1,5% агарозном геле, погруженном в однократный трис-ацетатный-ЭДТА буфер, методом электрофореза оценивали качество тРНК, выделенной из экспериментальных образцов по большой (28S) и малой (18S) рибосомным субъединицам рРНК. Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoVue Plus (GE Healthcare, США). Выделенная РНК была использована в реакции обратной транскрипции с применением реагентов MMLV Kit (Евроген, Россия). Для затравки использовали oligo(dT)23-primer в концентрации 20 мкМ. Для определения уровня относительной экспрессии гена была проведена мультиплексная ПЦР в реальном времени (амплификатор Real-time CFX96, Bio-Rad, США) с применением реагентов qPCRmixHS (Евроген, Россия), специфических зондов TaqMan и праймеров в концентрации 10 пМ (Beagle, Россия). В качестве матрицы использовались 2 мкл кДНК, в качестве референсного гена – *RPLPO*. Последовательности праймеров были подобраны и предварительно проверены с помощью PrimerQuest, Blast (табл.1).

Таблица 1 - Последовательность использованных олигонуклеотидных праймеров

Название гена	Последовательность
<i>Gfi1</i>	for 5'-TGGAGCAGCACAAAGCC-3' rev 5'-GACAGTGTGGATGACCTCTTG-3' probe FAM-5'-CGCAGGAACGGAGCTTTGACTGTA-3'~BHQ-1
<i>hnRPLL</i>	for 5'-CTCTCAATTCAGAATCCGCTTTATC-3' rev 5'-CCATTGCTTGTATCCCATTCTC-3' probe FAM-5'-TATGCAACCCTGTTGGCAAAGTGC-3'~BHQ-1
<i>hTERT</i>	for 5'-TGACACCTCACCTCACCCAC-3' rev 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3' probe FAM-5'-ACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG-3'-BHQ-1
<i>Ki-67</i>	for 5' GCCCTCCAGCTCCTAGTC-3' rev 5' TCCGAAGCACCACTTCTTCT-3'
<i>U2af114</i>	For 5'-CTTCACAACAAGCCGACATTC-3' rev 5'-CAAGGTTGTGCGCACACATTC-3' probe FAM-5'-CCAGGAGGTGTTACAGAAGTCA-3'~BHQ-1
<i>RPLPO</i> (референсный ген)	for 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAAC-3' rev 5'-CCATCAGCACACAGCCTTC-3' probe HEX-5'-ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA-3'-BHQ-1

Для каждой пары праймеров была подобрана оптимальная температура отжига с использованием градиентной ПЦР (Bio-Rad T-100, Bio-Rad C-1000, США). ПЦР-реакцию проводили в трех повторах. Для проведения ПЦР использовали амплификатор LightCycler 480 Real-Time PCR («Roche», Швейцария). Протокол амплификации: 3 мин при 95 °С; амплификационный цикл (×45): 20 с при 95 °С; 30 с при 60 °С (58 °С для гена *hnRPLL*); 50 при 72 °С. Результаты ПЦР анализировали с помощью метода максимума второй производной (Second Derivative Maximum method). Расчет уровня относительной экспрессии исследуемого гена производился с помощью модифицированной формулы Пфаффа с учетом эффективности амплификации по программе REST.

Изучение миграции (инвазии) МНК (4×10^4 клеток в 180 мкл RPMI-1640+10% ЭТС, 280 мг/л L-глутамина, 10 мкг/мл гентамицина) через микроотверстия (диаметр 8 мкм) в полимерной мембране, имитирующие поры кровеносных сосудов, осуществляли с помощью специализированных 16-луночных CIM-планшетов xCELLigence real-time cell analyzer (RTCA) системы (Roche Applied Science, Квебек, Канада). Эксперименты по инвазии-миграции клеток проводили согласно (Moniri M.R. et al., 2015) в нашей модификации. Для определения индекса миграции (МИ) регистрировали импеданс с помощью RTCA Software каждые 15 мин в течение 72 ч при температуре культивирования клеток 37° С.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью алгоритмов программы IBM SPSS Statistics 20; визуализация статистически обработанного пакета данных проводилась при помощи программы RStudio (<https://rstudio.com/>). Анализ полученных результатов проводился методом описания и проверки статистических гипотез (Кремер Н.Ш., 2004). Для каждой выборки вычисляли характеристики: медиану (Me), первый и третий квартили (Q1, Q3). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий Манна-Уитни (*U*) для независимых выборок и критерий Вилкоксона (*T*) для зависимых выборок. Сила корреляционной связи оценивалась как сильная ($r > 0,75$), умеренная ($0,25 < r < 0,75$) и слабая ($r < 0,25$) с использованием корреляционного анализа по Спирмену. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточные культуры, растущие *in vitro* на пластиковых поверхностях, не воспроизводят поведение клеток *in vivo*. Благодаря трехмерной (3D) пространственной симуляции, *in vitro* реакция клеток значительно приближается к физиологическим параметрам жизнедеятельности (Коршунов Д.А., Кондакова И.В., 2016). В связи с этим, изучение клеточно-молекулярных реакций иммунокомпетентных клеток крови человека, интактных или стимулированных АПК-сигналингом, на сокультивирование с 3D-образцами с рельефным КФ покрытием, имитирующим состояние минерального вещества регенерирующей костной ткани, является своевременным и актуальным.

Одна из ключевых задач современных исследований состоит в расшифровке физиологических механизмов, определяющих реакции клеток на структурные и гуморальные сигналы микроокружения (Wang S. et al., 2019). В обычных условиях 48-ч стационарного *in vitro* культивирования на пластиковой поверхности культуральной посуды (контроль) 2D-гомеостатическая клеточная культура сохраняла исходную клеточность ($2,97 \times 10^5$ кл/мл) и хорошую (87 %) жизнеспособность (рис.2).

При введении в культуру МНК частиц Т-активирующего комплекса (гуморальный раздражитель; 2ДАкт модель) общее количество клеток (ОКК) статистически значимо возросло до 182 % при снижении доли жизнеспособных МНК вследствие усиления их гибели путем апоптоза и некроза в сравнении с гомеостатической 2D-культурой (рис.2). Однако, прирост ОКК (т.е. экспансия клеточной культуры) позволил считать повышенную гибель части неприлипающих МНК как известный феномен "смерть клетки через гиперактивацию" (Massanella M. et al., 2010).

Модельные 3D-образцы с КФ покрытием в гомеостатической культуре МНК (3DГом) способствовали статистически значимому уменьшению (на 17 %) клеточной жизнеспособности, обусловленному усилением апоптоза и, в большей степени, некроза в сравнении 2D-культурой (рис.2) при сохранении значений ОКК ($2,55 \times 10^5$ кл/мл). Была выдвинута гипотеза, что 3D-матрицы являются структурным раздражителем, запускающим физиологические механизмы адаптации культуры МНК через механизмы гиперактивации и последующей гибели неприлипающей части популяции (преимущественно, Т-лимфоцитов). В этом плане, как косвенное подтверждение гипотезы, установлена синергичность описанных эффектов в условиях 48-ч *in vitro* культивирования МНК, стимулированных как гуморальным, так и структурным раздражителями (рис.2; культура 3ДАкт).

2D-гомеостатическая культура более чем на 98 % состояла из CD45⁺CD3⁺ Т-лимфоцитов, 55 % из них были CD45⁺ наивными CD4⁺ (67 %) и CD8⁺ (22 %) Т-клетками, которые экспрессировали CD28 молекулу дифференцировки, способствующую их длительному выживанию (рис.3-4). Гомеостатическая 3D-культура клеток, индуцированная введением матриц с шероховатым КФ покрытием, не имела статистически значимых различий с гомеостатической 2D-моделью ($p > 0,05$) по уровню мембранной экспрессии всех исследуемых маркеров активации, созревания и дифференцировки. Как следствие, применяемые 3D-матрицы можно считать неиммуногенными физиологическими раздражителями.

Об активации и усилении реактивности МНК в 2D-активационной культуре *in vitro* свидетельствовали существенные изменения CD профиля Т-клеток (рис. 3-4) по сравнению с 2D-гомеостатической культурой.

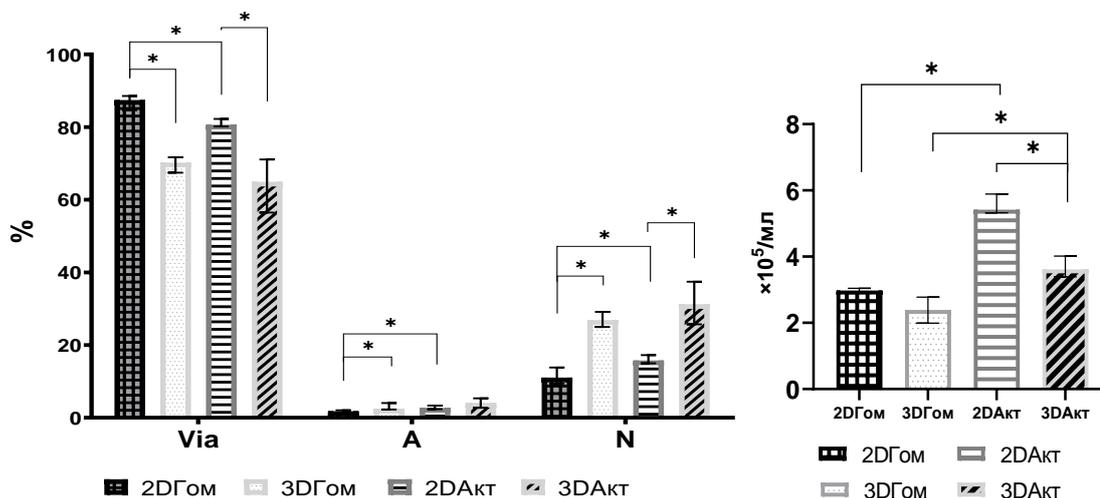


Рисунок 2 - Относительное (%) содержание жизнеспособных (Via), апоптотических (A) и некротических (N) форм неприлипающих МНК и ОКК ($\times 10^5/\text{мл}$) культуры в различных условиях 48-ч культивирования *in vitro*, Me [Q₁ ; Q₃], n=6. Здесь и на рис.1-4, 6-7: Гом - гомеостатическая модель; Акт - активационная.

Иммуномодулирующий эффект Т-активатора, имитирующего сигнал от АПК, способствовал увеличению на 4 % ($p < 0,05$) доли CD45RA⁺ наивных (не активированных антигеном) Т-клеток, что представляется весьма оригинальным результатом.

В активационной 3D-культуре (комбинация двух раздражителей) были зафиксированы следующие основные результаты (рис.3-4): 1) выявлен синергичный стимулирующий эффект на повышение процента как CD4, так и CD8 Т-клеток, экспрессирующих CD25 и, в большей степени, CD71 маркеры. Презентация CD95, как и в случае 2D-активационной модели, статистически значимо (в сравнении с 3D-гомеомоделью) усиливалась только на Т-киллерах/супрессорах; 2) 3D-матрикс достоверно снижал (до уровня 3D-гомеомодели) повышенное количество CD45RA⁺ Т-клеток, индуцированное (CD2-/CD3-/CD28-)-активатором; 3) 3D-матрикс статистически значимо уменьшал долю CD4 Т-хелперов, также CD8 Т-киллеров/супрессоров по отношению как к 3D-гомеостатической, так и 2D-активационной моделям. Уменьшение доли CD4⁺ и, особенно, CD8⁺ Т-клеток является в нашем понимании, следствием усиления активационно-индуцированного апоптоза. Для нормального функционирования иммунной системы необходимо сохранение равновесия между пролиферацией иммунокомпетентных клеток и их гибелью. Сдвиг этого равновесия считается одним из факторов, приводящих к развитию патологических процессов (Elmore S., 2007).

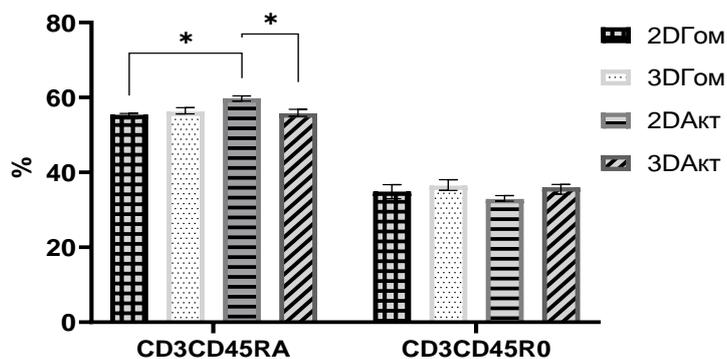


Рисунок 3 - Относительное (%) содержание жизнеспособных CD45⁺ МНК, экспрессирующих RA или R0 антигены в различных условиях 48-ч культивирования *in vitro*, Me [Q₁ ; Q₃], n=6

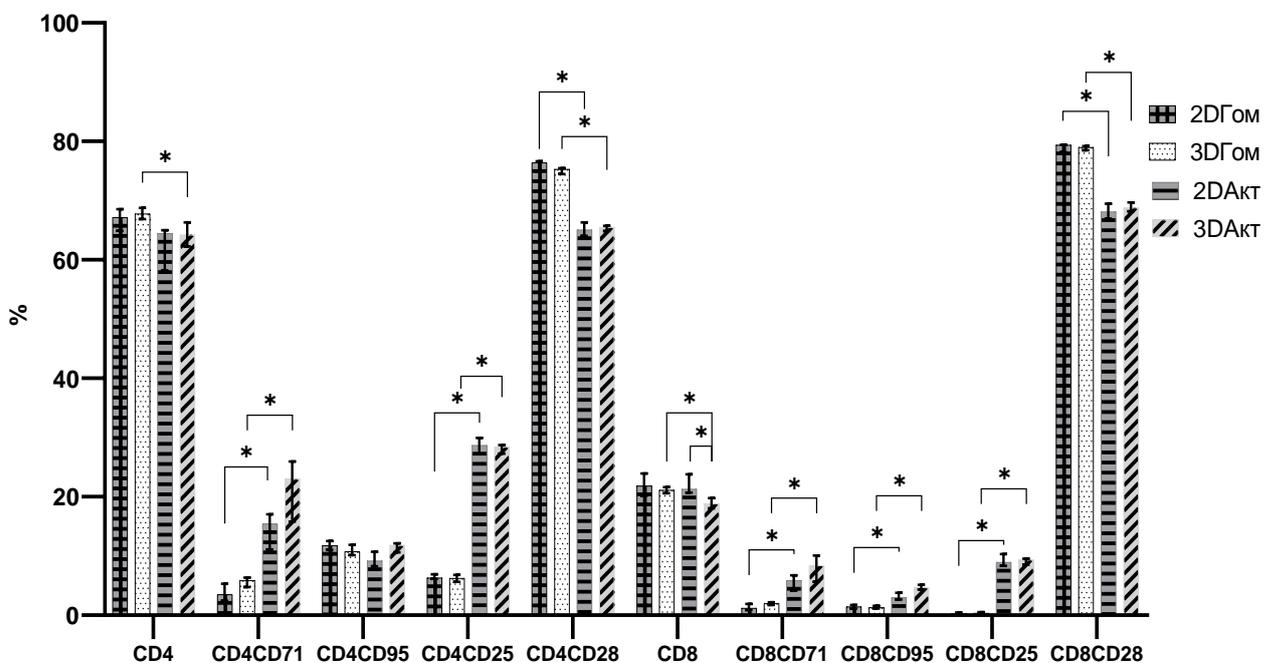


Рисунок 4 - Относительное (%) содержание жизнеспособных $CD45^+CD3^+$ МНК, несущих мембранные детерминанты клеточной дифференцировки, активации и созревания Т-лимфоцитов с хелперным ($CD4^+$) и цитолитическим ($CD8^+$) фенотипом в различных условиях 48-ч культивирования *in vitro*, Me[Q_1 ; Q_3], n=6

3D-матрикс, имитирующий состояние минерального вещества регенерирующей костной ткани потенцирует действие Т-клеточного активатора в отношении иммунокомпетентных клеток. Таким образом, поведение и взаимодействие Т-лимфоцитов и АПК на трехмерной границе раздела кровь/кость может значительно отличаться от наших представлений о механизмах функционирования клеток, полученных в обычной 2D-культуре *in vitro*.

Секреторная активность МНК в 2D-гомеостатической модели поддерживалась, в основном, на низком (van den Broek et al., 2014) уровне (1-100 пг/мл) для большинства (17 из 23) изученных регуляторных молекул (рис.5,6). Всплеск (более 1 нг/мл) выделения хемокинов IP-10 и IL-8 (рис.5,6) мог быть обусловлен необходимостью клеточной миграции (рис.12) для заселения площади лунок культуральной посуды.

В 3D-гомеостатической модели, несмотря на постоянство иммунофенотипа культуры Т-лимфоцитов, существенно возростала секреция 13 биомолекул (рис.5,6), преимущественно, провоспалительных и отдельных противовоспалительных (IL-1ra) медиаторов, гемопоэтинов (G-CSF, GM-CSF), но не ангиопоэтинов (VEGF, IL-7, Eotaxin). Концентрации 8 медиаторов (IP-10; MIP-1b; IL-6; IL-1ra; IFN-g; IL-13; MCP-1; IL-8) превысили 1 нг/мл. Подобный секреторный спектр может обуславливать гиперактивацию и последующую гибель неприлипающих МНК (преимущественно, $CD4^+$ Т-лимфоцитов).

Введение гуморального Т-клеточного активатора, симулирующего сигналинг АПК (2D-активационная модель) резко (в 1-10-100-ни раз) повышает секрецию практически всех тестируемых медиаторов (за исключением IL-2) по сравнению с гомеостатической 2D-моделью (рис.5,6). Индуцируемое гуморальное микроокружение, посредством медиаторов хемотаксиса, способствует, по-видимому, усиленной клеточной миграции (рис.13), которая приводит к инфильтрации тканей клетками крови. При этом клеточно-молекулярные кластеры

в активационной культуре МНК укрупняются (рис.8), сигналинг между различными субпопуляциями Т-лимфоцитов усиливается.

В активационной 3D-культуре (МНК+частицы Т-активатора+3D-матрикс) были зафиксированы следующие результаты (рис.5,6): 1. Индукция (в сравнении с 3D-матриксом) *in vitro* уже повышенной (по отношению к 2D-гомеокультуре клеток) секреторной активности МНК в отношении провоспалительных регуляторных молекул (рис.5). В 3D-активационной модели статистически значимо возросла (на фоне значений после применения Т-клеточного активатора) концентрация IL-1b (в 12 раз), TNF-а (в 8,6 раза), IL-6 (в 4,2 раза), MIP-1a (в 3,6 раза), IL-17 (в 2,5 раза), IL-15 (в 1,5 раза); 2. Дополнительно стимулировалась (до 87 раз) *in vitro* уже повышенная (по отношению к 2D-активационной культуре) концентрация противовоспалительных молекул (рис.6); 3. Менее значительный (максимум в 6 раз) стимулирующий эффект наблюдался в случае гемо- и ангиопоэтинов, в основном, по сравнению с 2D-активационной моделью (рис.6).

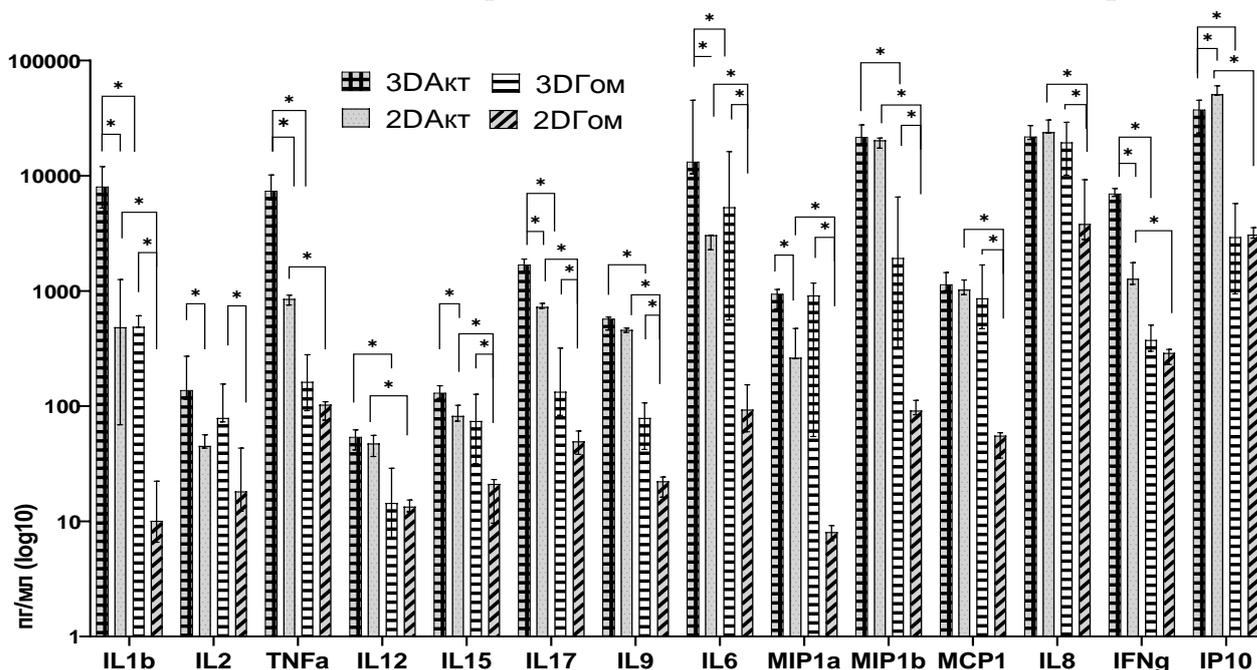


Рисунок 5 - Концентрация (пг/мл) провоспалительных цитокинов и хемокинов, секретируемых МНК в различных условиях 48-ч культивирования *in vitro*, Me[Q₁; Q₃], n=6

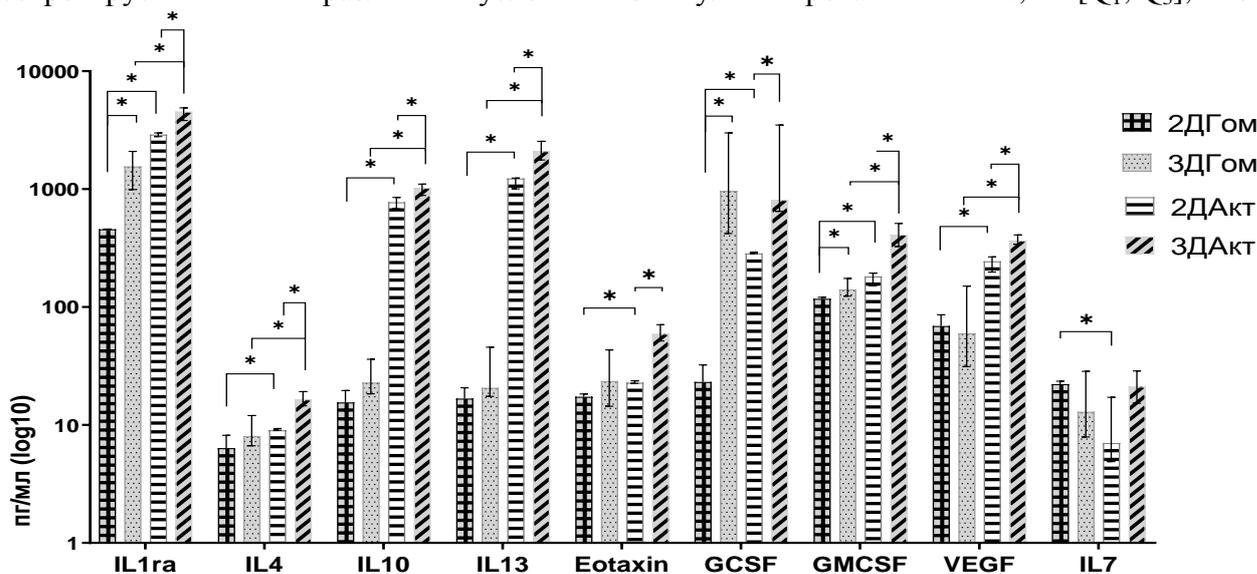


Рисунок 6 - Концентрация (пг/мл) противовоспалительных цитокинов, гемо- и ангиопоэтинов, секретируемых МНК в различных условиях 48-ч культивирования *in vitro*, Me[Q₁; Q₃], n=6

Таким образом, гуморальный Т-клеточный активатор, симулирующий сигналинг АПК, и структурный неиммуногенный 3D-раздражитель, имитирующий минеральное вещество регенерирующей костной ткани, оказывают выраженное синергичное стимулирующее влияние на секрецию изучаемых цитокинов/хемокинов, включая факторы с противовоспалительным действием.

Клеточные системы в состоянии покоя характеризуются минимальным количеством корреляционных связей показателей (Гольдберг Е.Д. и др., 1996), что характеризует относительную независимость функционирования клеточных субпопуляций в оптимальных условиях жизнедеятельности организма. Клеточные реакции МНК в контрольной 2D-гомеостатической культуре можно отобразить в виде слабо связанных друг с другом 5 корреляционных кластеров (рис.7), которые свидетельствуют об относительной разобщенности жизнедеятельности клеточной культуры.

Корреляционный кластер № 1 (рис.7) демонстрирует логичную сильную отрицательную взаимосвязь между количеством живых (Via) и мертвых, некротически измененных клеток (Nec). Достаточно неожиданной является негативная связь концентрации в культуре хемокина MIP-1a (CCL3), фактора хемотаксиса, инвазии, и доли погибших клеток. В качестве интерпретации полученного результата можно предположить, что молекулярные сигналы, необходимые для реализации потенциала клеточного цитоскелета, поддерживают жизнеспособность МНК в культуре *in vitro*. В свою очередь, прямая корреляция клеточной выживаемости с секрецией IL-7 соответствует известной физиологической роли данного лимфопоэтина и главного комплекса гистосовместимости для жизнедеятельности CD3⁺CD45 RA⁺ (рис.3) наивных Т-лимфоцитов (Unsinger J. et al., 2010; Ribeiro D. et al., 2018). Сигналы IL-7 не индуцируют пролиферацию, но позволяют клеткам длительно выживать в состоянии покоя (Surh C. D. et al., 2006).

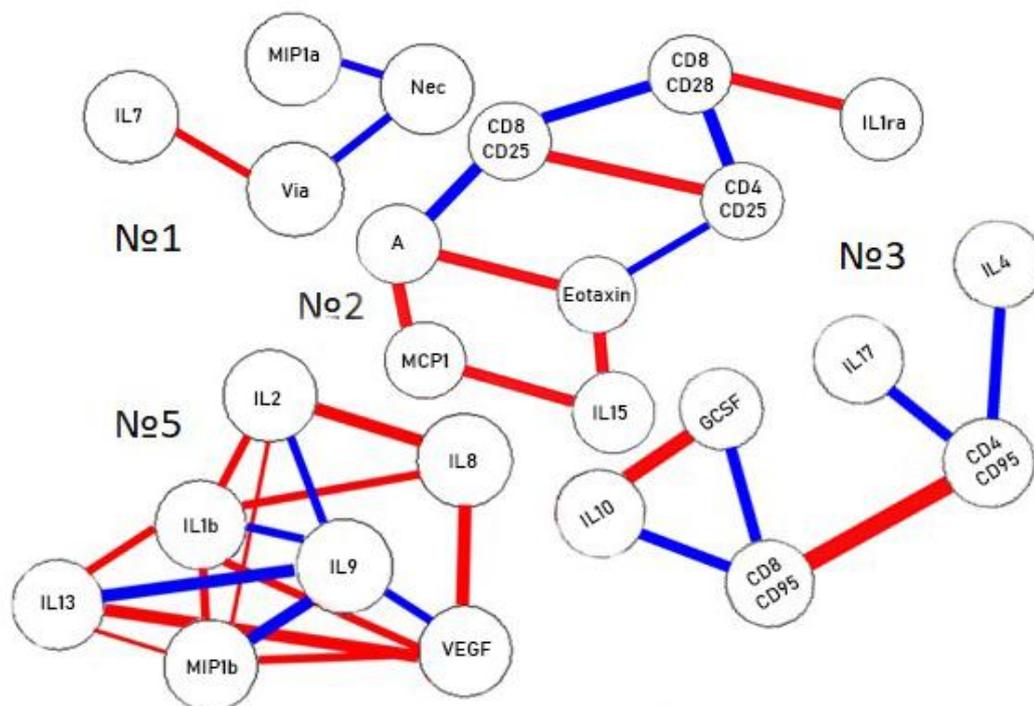


Рисунок 7 - Корреляционные взаимосвязи исследуемых клеточно-молекулярных показателей культуры МНК крови человека в гомеостатической 2D-модели. Красным цветом отмечены сильные положительные, синим – отрицательные корреляции с коэффициентом $r > 0,8$ ($p < 0,05$; $n=6$).

Сложность и многогранность клеточных эффектов цитокиновой и хемокиновой сети может отчасти объяснить парадокс, что, в отличие от MIP1a (рис.7), хемотаксические молекулы Eotaxin и MCP-1 способствуют в гомеостатической 2D-культуре клеточной смерти путем апоптоза МНК, но не CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, несущих CD25 рецептор к IL-2 (рис.7- кластер №2).

Корреляционный кластер №3 (рис.7) включал сильные корреляционные взаимосвязи между цитокинами и факторами роста, секретлируемыми МНК в гомеостатической 2D-культуре, и экспрессией CD95 (FAS/APO-1) антигена с про- и антиапоптотической активностью (Paulsen M., Janssen O., 2011).

Корреляционный кластер № 4 (не показан) включал в себя сильные положительные корреляции между Т-клетками с иммунофенотипом CD4⁺CD28⁺, содержанием TNF-а и IFN-g. CD28 является коstimулятором активации Т-лимфоцитов и может приводить к секреции провоспалительных цитокинов, в частности, TNF-а (Tuagi A.M. et al., 2011).

Корреляционный кластер №5 включает в себя связи между воспалительными интерлейкинами, хемокинами (IL-8, (С-Х-С мотив) лиганд 8, CXCL8; MIP-1b) и фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) (рис.7). Он отражает цитокиновую сеть, помогающую клеточной культуре реагировать на раздражители, воссоздавать свое микроокружение и выживать в условиях *ex vivo*.

Таким образом, в "гомеостатической" 2D-модели культивирования МНК крови человека, которую называют стандартной культурой клеток *in vitro* на пластиковой поверхности культуральных сосудов, разыгрываются клеточно-молекулярные реакции в ответ на неоптимальные условия существования вне организма. Центральное место в физиологических механизмах кооперации Т-клеток занимает цитокиновая сеть, способствующая гибкой реализации вариантов воспалительной реактивности и адаптации клеток иммунной системы (Черешнев В.А., Гусев Е.Ю., 2001). Высокие концентрации провоспалительных хемокинов (прежде всего, IL-8 и IP-10 > 3 нг/мл) в культуре МНК в 100-200 раз превышают их содержание в сыворотке крови здоровых добровольцев (23 пг/мл для IL-8 и 17 пг/мл для IP-10) (Каюкова Е.В., Белокриницкая Т.Е., 2020). Это отражает механизмы адаптации МНК к непривычным условиям их жизнедеятельности *in vitro*.

Низкие уровни секреции других сигнальных молекул (рис.5,6) сохраняют определенную разобщенность (кластеризацию) клеточных компартментов (рис.7), что характерно в оптимальных условиях существования клеток (Гольдберг Е.Д. и др.,1996). В связи с этим, гомеостатическую 2D-модель культивирования МНК можно рассматривать в качестве исторически сложившегося контроля для других исследуемых групп.

Активационная модель 2D-культивирования клеток в стандартной культуре на пластиковой поверхности культуральных планшетов достигалась, согласно (Юрова К.А. и др., 2015), путем добавления анти-биотиновых MACSiBead™ частиц T-Cell Activation/Expansion Kit human (частицы с лигандами к CD2, CD3 и CD28) к исследуемым клеткам. Гуморальный Т-клеточный активатор, в сравнении с гомеостатической 2D-моделью, вызывает в системе перераспределение качественных клеточно-молекулярных взаимоотношений в пользу прямых связей показателей. Интересен тот факт, что усиление процессов клеточной гибели путем апоптоза (рис.2), индуцированное коstimулирующим CD2CD3CD28 сигналом Т-клеточного регулятора, из всех цитокинов, хемокинов и ростовых факторов модулируется (прямая корреляция) только IL-10 (рис. 8; кластер №1), концентрация которого возрастала в 50 раз (рис.6).

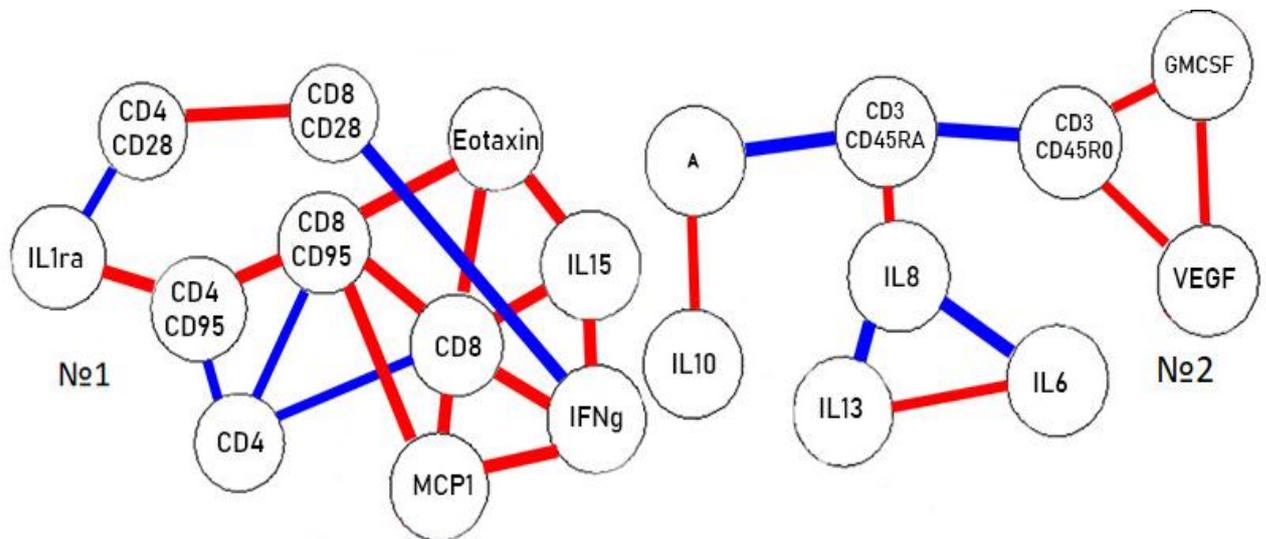


Рисунок 8 - Корреляционные взаимосвязи исследуемых клеточно-молекулярных показателей культуры МНК крови человека в активационной 2D-модели (корреляционный кластеры №1 и №2). Красным цветом отмечены сильные положительные, синим – отрицательные корреляции с коэффициентом $r > 0,8$ ($p < 0,05$; $n=6$).

IL-10 синтезируется, в том числе, Т-регуляторными лимфоцитами (Grazia Roncarolo M. et al., 2006), его физиологическая роль заключается в (само)ограничении чрезмерного развития реакций врожденного и приобретенного иммунитета, способных приводить к повреждению тканей (Симбирцев А.С., 2018). По-видимому, одним из механизмов его действия в культуре МНК является регуляция апоптоза активированных клонов. Действительно, в активированной культуре достоверно возрастало число $CD45CD3^+RA^+$ наивных (не активированных антигеном) Т-клеток (рис.3), которые, по-видимому, в отличие от $CD45CD3^+R0^+$ форм, избегали стимуляции процессов апоптоза (отрицательные корреляции показателей при $r > 0,8$; рис.8).

Наивные $CD45CD3^+RA^+$ Т-клетки экспрессируют высокие уровни хемокина IL-8 (Crespo J. et al., 2018), что в нашем исследовании отражается прямой корреляцией с высокой концентрацией провоспалительного хемокина (рис.5, рис.8). В свою очередь, выделение IL-8 ингибируется (рис.8) усилением (рис.6) секреции противовоспалительного IL-13 (Foti M., Locati M., 2017), который продуцируется активированными $CD8^+$ Т-клетками, а также $CD4^+$ Th1, Th2 и Th0-клетками в ответ на антигенные стимулы (Antoniou S. A., 2010; Lu Y. C. et al., 2017).

Эффекты провоспалительного (Cheknev S. B. et al., 2014) цитокина IL-6 являются плейотропными, включая стимуляцию процессов пролиферации и выживания Т-клеток (Yang X.O. et al., 2007). Поэтому корреляционные взаимосвязи с IL-8 и IL-13 (рис.8) отражают молекулярные процессы участия наивных $CD45CD3^+RA^+$ Т-клеток в регуляции воспалительных и иммунных реакций. $CD45CD3^+R0^+$ Т-клетки имели сильные прямые корреляции с ростовыми факторами гемпопоза и ангиопоэза (рис.8). По-видимому, $CD45CD3^+R0^+$ клетки являются источником данных ростовых факторов в активационной 2D-культуре МНК. Другими словами, наивные и зрелые Т-клетки уже в течение 48 часов после гуморального стимула, симулирующего сигналинг АПК, секретируют коктейль медиаторов с воспалительными, иммуно-регуляторными и регенеративными свойствами.

Это соответствует данным F. Loi et al. (2016) и находит свое отражение в корреляционной матрице №2 (рис.8). Клеточно-молекулярные кластеры в

активационной культуре МНК укрупняются, сигналинг между различными субпопуляциями Т-лимфоцитов усиливается. Гуморальное провоспалительное микроокружение *in vitro* с высокими концентрациями факторов миграции и хемотаксиса (MIP-1b; MIP-1a; MCP-1; IP-10; IL-8) (Thiel S. et al., 1992) определяет повышенную (в сравнении с гомеостатической 2D-культурой) инвазию активированных МНК через модельную стенку кровеносных сосудов, на протяжении всего периода наблюдений (72 часа; $T < 0,05$; рис.12). Это может способствовать усилению клеточной миграции посредством медиаторов хемотаксиса, которая приводит к инфильтрации тканей клетками крови.

В гомеостатической 3D-модели между показателями выявлены, в основном, положительные сильные ($r > 0,8$) корреляции, которых значительно больше (119 против 42), чем в 2D-культуре МНК (рис.7,8). Рост числа корреляционных связей в матрице повышает жесткость модельной биологической системы. Согласно (Гольдберг Е.Д. и др., 1996), это свидетельствует в пользу стрессорного (неспецифического) воздействия объемных искусственных материалов на клетки, приводящего к синхронизации их функциональной активности. В таком случае ответ МНК можно считать проявлением “неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем” (Браун А.Д., Моженко Т.П. 1987). Клеточные реакции МНК на 3D-матрицы можно отобразить в виде основного общего кластера (рис.9), свидетельствующего о синхронизации функционирования культуры МНК.

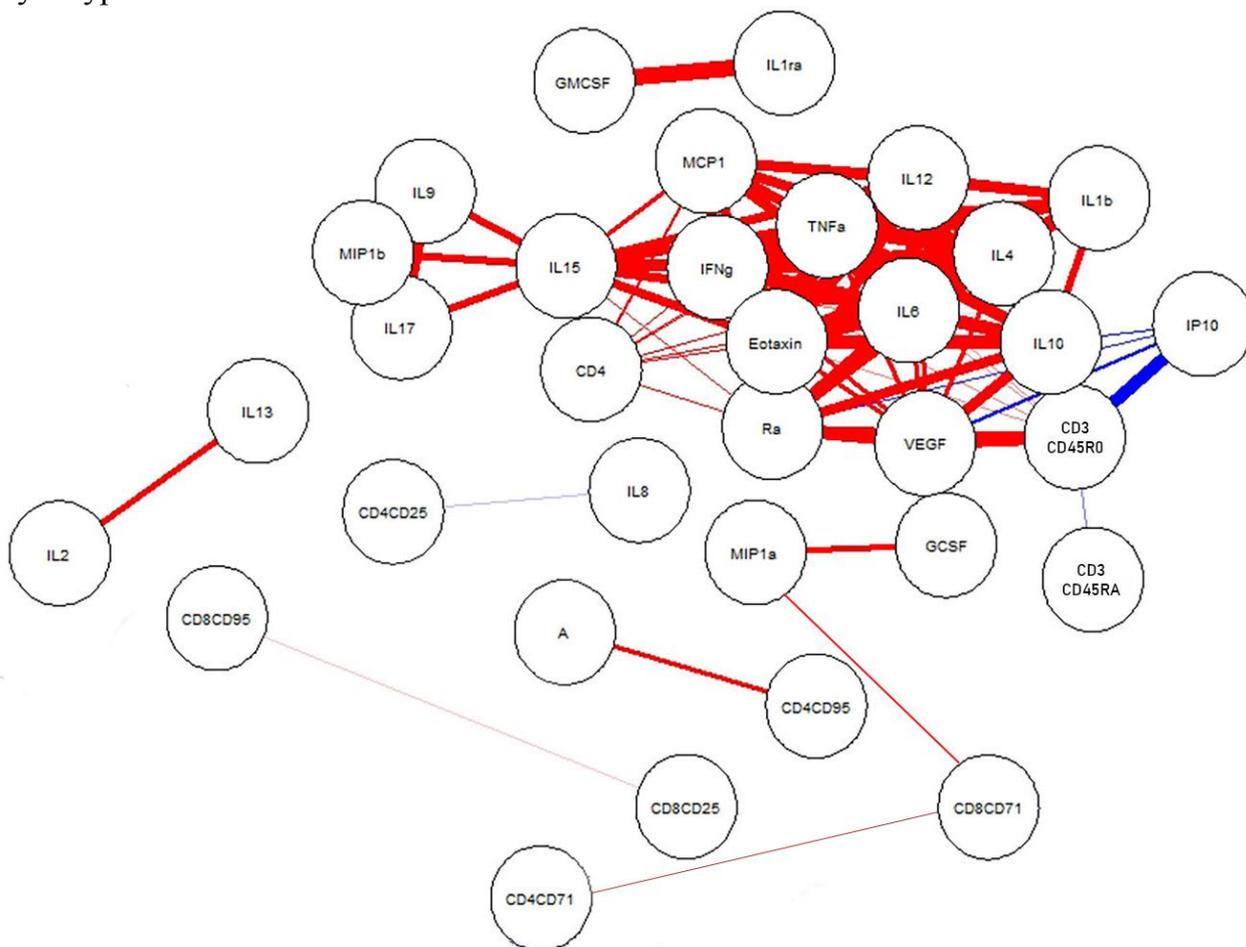


Рисунок 9 - Корреляционные взаимосвязи исследуемых клеточно-молекулярных показателей культуры МНК крови человека в гомеостатической 3D-модели. Красным цветом отмечены сильные положительные, синим – отрицательные корреляции с коэффициентом $r > 0,8$ ($p < 0,05$; $n=6$). Сила корреляционных взаимосвязей выделена шириной линии, соединяющей показатели.

Основными участниками межклеточной кооперации в ответ на 3D-раздражитель являются провоспалительные цитокины (с увеличением концентраций в 57 раз (IL-6) и 48 раз (IL-1b)) и хемокины MIP-1a (113 раз), MIP-1b (21 раз), MCP-1 (16 раз), IL-8 (5 раз) (рис.5, рис.9). С физиологической точки зрения полученные результаты закономерны, поскольку клетки на контакт с раздражителем отвечают увеличением миграционной активности по типу позитивного или негативного (реакция избегания) хемотаксиса.

Резюмируя вышесказанное, структурный раздражитель через развитый рельеф КФ поверхности и выделение ионов кальция и фосфора в межклеточную жидкость, так же, как и гуморальный Т-клеточный активатор, активирует иммунокомпетентные клетки и создает локальное молекулярное микроокружение для инфильтрации тканей лейкоцитами крови. При этом провоспалительный цитокиновый/хемокиновый сигналинг между различными субпопуляциями Т-лимфоцитов усиливается в значительной большей степени при воздействии 3D-матрикса (рис.9), чем гуморального Т-клеточного активатора (рис.8).

Комбинация гуморального Т-клеточного активатора (активирующие антитела к CD2/CD3/CD28 комплексу), со структурным раздражителем (3D-матриksom), в определенной степени моделирует *in vitro* физиологическую ситуацию, складывающуюся при репаративной регенерации костной ткани. Степень взаимодействия иммунокомпетентных клеток с рельефом КФ поверхности снижается, о чем свидетельствует наличие всего двух (IL-13, IL-15) (рис.10), а не 14 корреляций показателей с коэффициентом шероховатости Ra (рис.9).

Представленную на рис.10 матрицу корреляций можно разделить на 2 крупных сопряженных кластера: зависимость процессов жизнеспособности МНК от секреции провоспалительных и противовоспалительных (IL-10) цитокинов/хемокинов; взаимосвязи CD4⁺, в меньшей степени, CD8⁺ Т-клеток, несущих маркеры активации/пролиферации CD25 и CD71, с цитокинами/хемокинами с про- (IL-1b; IL-6; хемокин IP-10), противовоспалительными регенераторным эффектом (IL-4; IL-13), с факторами ангио- и гемопоеза (G-CSF, Eotaxin).

По-видимому, имеет место поляризация Т-клеток на секрецию про-, противовоспалительных (регенераторных) или ангио-/гематогенных молекул, которая и лежит в основе выявленной кластеризации клеточно-молекулярных эффектов культуры МНК (рис.10). Соединяющим элементом двух крупных кластеров является трехчленная кооперация Ra/ IL-13 (противовоспалительный)/ IL-15 (провоспалительный), подчеркивающая роль поверхности структурного 3D-раздражителя в модулировании секреторной активности активационной культуры МНК крови.

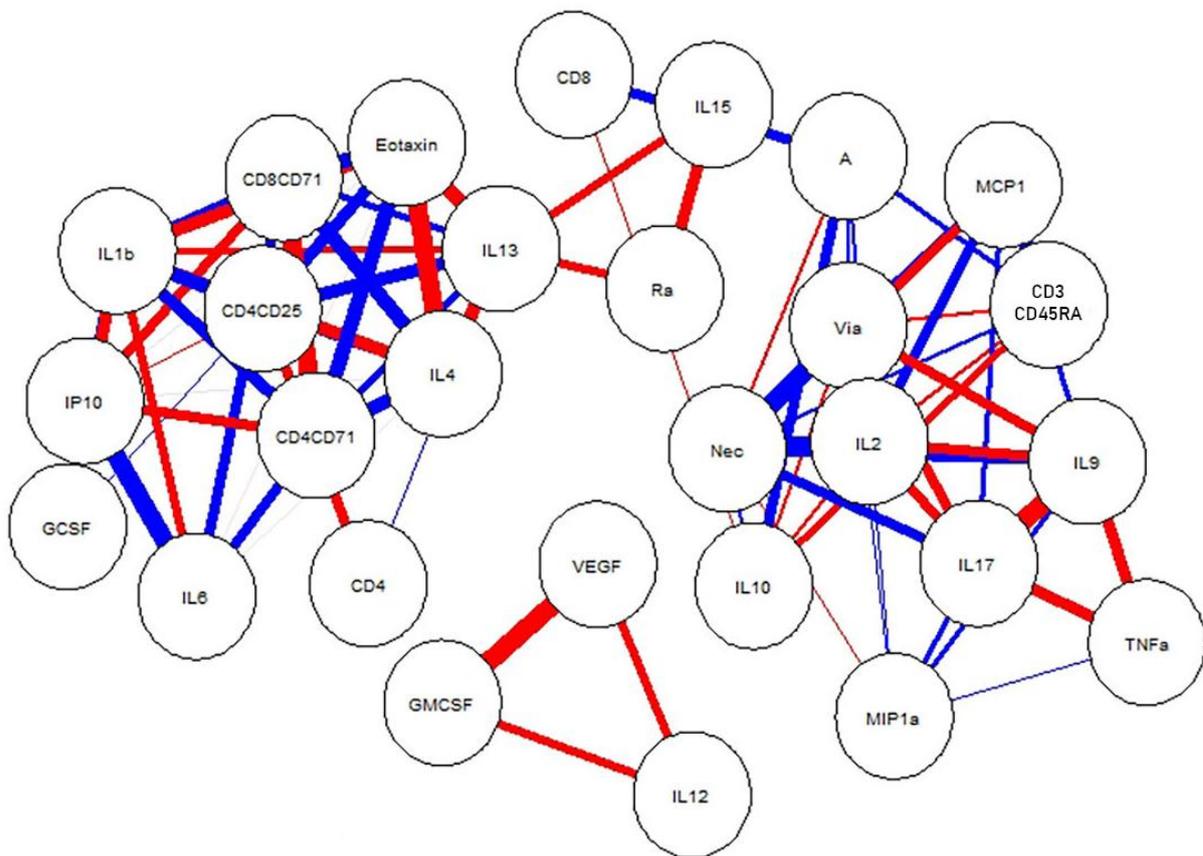


Рисунок 10 - Корреляционные взаимосвязи исследуемых клеточно-молекулярных показателей культуры МНК крови человека в активационной 3D-модели. Красным цветом отмечены сильные положительные, синим – отрицательные корреляции с коэффициентом $r > 0,8$ ($p < 0,05$; $n=6$). Сила корреляционных взаимосвязей выделена шириной линии, соединяющей показатели.

Таким образом, гуморальный Т-клеточный активатор, симулирующий сигналинг АПК, и структурный неиммуногенный 3D-раздражитель, имитирующий минеральное вещество регенерирующей костной ткани, оказывают выраженное синергичное стимулирующее влияние на секрецию изученных цитокинов/хемокинов. Особенно следует отметить высокие уровни факторов с противовоспалительным/ регенераторным потенциалом (рис.6). Об увеличении пролиферативного потенциала культуры свидетельствует рост экспрессии генов *ki-67* и *hTERT* (рис.11). В плане интерпретации данных, комбинация двух раздражителей в *in vitro* модели способствует синергичной активации МНК крови человека с ранней секрецией спектра воспалительных иммуномодуляторных молекул, способных инициировать васкуляризацию тканей и фазу регенерации костной ткани.

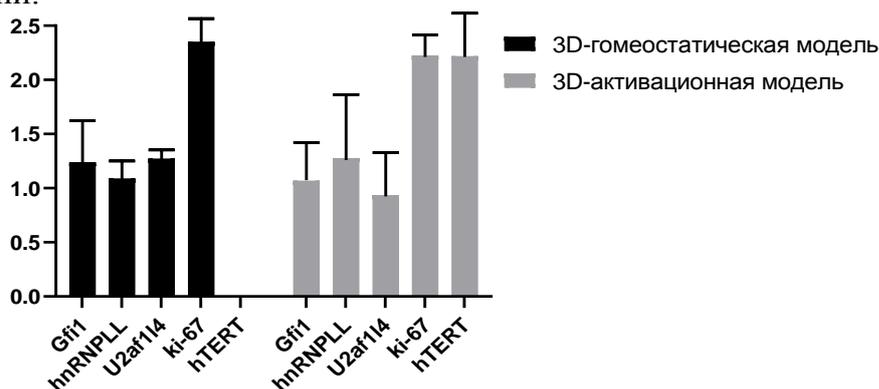


Рисунок 11 - Экспрессия генов дифференцировки и пролиферации Т-клеток.

Актиновый цитоскелет лимфоцитов считается центральным звеном формирования и созревания иммунологического синапса, его сигнальной и цитолитической активности (Wurzer H. et al, 2019). Когда Т-клетка встречает АПК с родственным главным комплексом гистосовместимости, сигналы от TCR запускают программу актиновых цитоскелетных перестроек, которая приводит к поляризации и активации Т-клетки (Burkhardt J.K. et al., 2008). Передача сигналов Ca^{2+} и активация интегрина ниже TCR приводят к дополнительным модификациям актин-ассоциированных белков, которые могут играть роль в изменении жесткости плазматической мембраны (Burkhardt J. K. et al., 2008).

В этом плане интересными являются результаты RTCA исследования, представленные на рис.12. МНК, стимулированные Т-клеточным активатором, интенсивнее осуществляют инвазию через микропористую (диаметр 8 мкм) мембрану на протяжении всего периода наблюдений ($T < 0,05$). К окончанию эксперимента (72-ч наблюдения) индекс миграции (МИ) в 1,5 раза ($p < 0,05$) превышал соответствующее значение в гомеостатической культуре (рис.12).

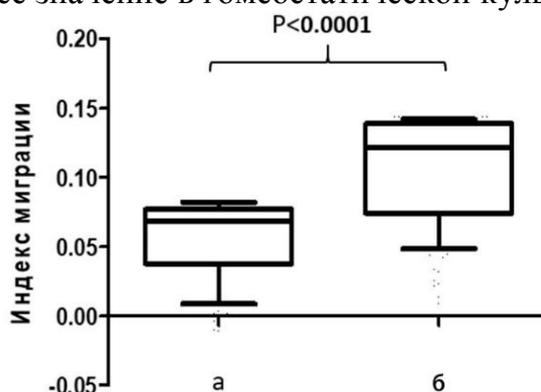


Рисунок 12 - Значения индекса миграции (Me; Q1-Q3) через микропористую мембрану в направлении к бесклеточной питательной среде через 72-ч мониторинга: а) спонтанная инвазия МНК; б) миграция клеток, стимулированных MACSiBead™ Т-клеточным активатором.

Таким образом, активатор Т-клеток, симулирующий сигналинг АПК через CD2CD3CD28 мембранный комплекс, по-видимому, стимулирует цитоскелет CD3⁺ лейкоцитов, что позволяет им активнее проникать через микропористую мембрану, имитирующую стенку кровеносных сосудов. В связи с этим, клеточный цитоскелет может быть общей субклеточной мишенью для синергичного эффекта использованных в работе гуморального и структурного (3D-матрикс с рельефным КФ покрытием) раздражителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунокомпетентные МНК человека демонстрируют различные паттерны структурно-функциональной активности в различных условиях их 48-ч *in vitro* культивирования (табл.3). Полученные количественные данные согласуются с корреляционным (качественным) анализом молекулярных путей кооперации клеток крови в ответ на структурно-функциональные раздражители. Экспериментальное *in vitro* 3D-моделирование эффектов и кооперации Т-лимфоцитов, сигналов АПК на границе раздела клетка/поверхность регенерирующей кости привело к новым фундаментальным знаниям в области физиологии ремоделирования костной ткани. Поведение и взаимодействие Т-лимфоцитов и АПК на трехмерной границе раздела кровь/кость значительно отличается от существующих представлений о механизмах функционирования клеток, полученных в обычной (двумерной стационарной) культуре *in vitro*.

Таблица 3 - Реакции иммунокомпетентных клеток в использованных *in vitro* моделях культивирования

2D-гомеостатическая модель	2D-активационная модель
<p>1. Высокая жизнеспособность клеточной культуры.</p> <p>2. Низкая секреторная активность.</p> <p>3. Низкая миграционная активность культуры.</p> <p>4. Разобщение клеточной культуры на относительно независимые структурно-функциональные кластеры.</p>	<p>1. Увеличение клеточной массы, смерть клеток через гиперактивацию.</p> <p>2. Активация экспрессии CD маркеров дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов.</p> <p>3. Средне-высокая секреторная активность клеточной культуры в отношении про- и противовоспалительных/регенераторных цитокинов/хемокинов.</p> <p>4. Усиление инвазивной способности МНК крови.</p> <p>5. Консолидация клеточно-молекулярной активности Т-клеток с укрупнением корреляционных кластеров при сохранении общего числа взаимосвязей.</p>
3D-гомеостатическая модель	3D-активационная модель
<p>1. Смерть клеток через гиперактивацию.</p> <p>2. Стабильность иммунофенотипа Т-клеток и экспрессии генов дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов относительно 2D гомеомодели.</p> <p>3. Средне-высокий секреторный сигналинг МНК в отношении провоспалительных медиаторов.</p> <p>4. Стрессорное (неспецифическое) воздействие на Т-клетки с синхронизацией их функционирования по типу "неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем" (Браун А.Д., Моженко Т.П., 1987)</p>	<p>1. Смерть клеток через гиперактивацию.</p> <p>2. Усиление презентации CD антигенов дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов.</p> <p>3. Высокая и средняя секреторная активность культуры МНК.</p> <p>4. Повышение экспрессии генов пролиферации при сохранении стабильности экспрессии генов дифференцировки и созревания Т-клеток.</p> <p>5. Поляризация Т-клеток на секрецию про- или противовоспалительных (регенераторных) или ангио-/гематогенных молекул, что лежит в основе кластеризации клеточно-молекулярных эффектов культуры МНК.</p> <p>6. Соединяющим элементом синергичности действия раздражителей можно предполагать трехчленную кооперацию $Ra/IL-13$ (противовоспалительный)/$IL-15$ (провоспалительный цитокин), подчеркивающую роль поверхности структурного 3D-раздражителя в модулировании поведения культуры МНК крови, активированной модельным сигналом АПК для Т-лимфоцитов.</p>

ВЫВОДЫ

1. Неприлипающие мононуклеарные клетки крови в стандартной 48-ч культуре на пластиковой поверхности являются, преимущественно, CD45+CD3+ Т-лимфоцитами с наивным CD45RA фенотипом Т-хелперов и характеризуются секрецией цитокинов и хемокинов в физиологическом диапазоне концентраций.

2. Антиген-независимая стимуляция мононуклеарных клеток Т-клеточным активатором, имитирующим сигналы антиген-презентирующих клеток, повышает в культуре *in vitro* долю наивных Т-хелперов, значительно усиливает *in vitro* клеточно-молекулярную кооперацию, экспрессию детерминант активации (CD25,

CD71) Т-лимфоцитов, а также секреторную и двигательную (инвазия через микропористую мембрану) способности клеток.

3. Образцы с кальцийфосфатным покрытием, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани, формируют трехмерную культуру мононуклеарных клеток, в которой существенно возрастает молекулярная кооперация клеток за счёт значительного увеличения секреции цитокинов и хемокинов с преимущественным провоспалительным потенциалом, что вызывает гибель части клеточной популяции посредством гиперактивации. Сильная корреляционная связь биологических показателей с индексом шероховатости кальцийфосфатной поверхности подчеркивает ее роль как неспецифического физиологического раздражителя клеточной культуры.

4. In vitro моделирование антиген-независимой активации Т-лимфоцитов в трехмерной культуре способствует синергичной клеточной стимуляции, сопровождающейся повышенной экспрессией генов пролиферации (hTERT, ki-67), усиленной презентацией мембранных молекул дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов, поляризацией клеток на секрецию цитокинов/хемокинов, преимущественно, с противовоспалительным/регенераторным эффектом.

5. Минеральное вещество регенерирующей костной ткани является триггером формирования на границе раздела "кость/кровеносное русло" локального клеточно-молекулярного микроокружения, способствующего взаимодействию Т-лимфоцитов и антиген-презентирующих клеток, активации хемотаксиса и воспалительного/регенераторного потенциала иммунокомпетентных клеток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Литвинова Л.С., Юрова К.А., Шуплецова В.В., **Мелашенко Е.С.**, Хазиахматова О.Г., Шаркеев Ю.П., Хлусов И.А. Краткосрочное культивирование мононуклеарных лейкоцитов с рельефным кальций-фосфатным покрытием на титане // **Медицинская иммунология**. – 2017. – Т. 19. – №. 3. – С.59. (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,636).
2. **Мелашенко Е. С.**, Шуплецова В.В., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Литвинова Л.С., Хлусова М.Ю., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Шаркеев Ю.П., Хлусов И.А. Клеточно-молекулярные реакции иммунокомпетентных клеток в трехмерной культуре // Издательство: ООО "Инконсалт К": Сборник тезисов участников форума "наука будущего - наука молодых", Нижний-Новгород, 12-14 сентября 2017. – С. 264-265.
3. Литвинова Л.С., Юрова К.А., Шуплецова В.В., **Мелашенко Е.С.**, Хазиахматова О.Г., Хлусова М.Ю., Шаркеев Ю.П., Хлусов И.А. Новый подход к культивированию иммунокомпетентных клеток на трехмерных образцах, имитирующих минеральный матрикс костной ткани // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: сборник статей Международной конференции, Пущино, 22-25 мая – 2017. – С. 430-435.
4. Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., Юрова К.А., **Мелашенко Е.С.**, Хазиахматова О. Г., Шаркеев Ю. П., Хлусов И.А. Новый подход к культивированию иммунокомпетентных клеток // **Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии**. – 2018. – Т. 35. – №. 2. – С. 159-166 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,629).
5. Литвинова Л.С., Юрова К.А., Шуплецова В.В., Мелашенко Е.С., Хазиахматова О.Г., Видонова М.А., Хлусова М.Ю., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Хлусов И.А. Влияние трехмерного матрикса с кальцийфосфатным покрытием на морфофункциональную активность мононуклеарных лейкоцитов крови // Издательство: Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова: Материалы всероссийской научной конференции "современные проблемы гистологии и патологии скелетных тканей". Рязань, 05-06 октября 2018 г. – С. 58-60.

6. Хлусов И.А., Литвинова Л.С., Юрова К.А., **Мелашченко Е.С.**, Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Хлусова М.Ю. Моделирование микроокружения мезенхимных стволовых клеток как перспективный подход к тканевой инженерии и регенеративной медицине (краткий обзор) // **Бюллетень сибирской медицины**. - 2018. Т. - 17. - № 3. - С. 217–228. (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,509).
7. Spirina E., Sizikova A., Litvinova L., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Yurova K., **Melashchenko E.**, Dvornichenko M., Khlusov I. Morphofunctional in vitro reaction of stromal and blood cells on implants for bone tissue engineering // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. - 2018. - V.123(Suppl.3). - P.14. (Q2 WoS, JCR = 2.659).
8. Litvinova L.S., Yurova K.A., Shupletsova V.V., **Melashchenko E.S.**, Khaziakhmatova O.G., Porohova E.D., Spirina E.A., Sharkeev Y.P., Khlusov I.A. Effect of three-dimensional matrix imitating of bone tissue regeneration on the differentiation of mnc under conditions of TCR receptor activation // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, Budapest, 24-26 October, 2018. – V. 124(Suppl.1). – P. 16. (Q2 WoS, JCR = 2.659).
9. Khlusov I., Litvinova L., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., **Melashchenko E.**, Yurova K., Leitsin V., Khlusova M., Pichugin V., Sharkeev Y. Rough titanium oxide coating prepared by micro-arc oxidation causes down-regulation of hTERT expression, molecular presentation, and cytokine secretion in tumor Jurkat T cells // *Materials*. – 2018. – V. 11. – №. 3. – Статья 360. doi: 10.3390/ma11030360. (Q2 WoS, JCR = 2.467).
10. Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., **Melashchenko E.S.**, Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Shupletsova V.V., Ivanov P.A., Khlusov I.A., Litvinova L.S. Cellular and Molecular Basis of Osteoblastic and Vascular Niches in the Processes of Hematopoiesis and Bone Remodeling (A Short Review of Modern Views) // *Current Pharmaceutical Design*. – 2019. – V. 25. – №. 6. – С. 663-669. (Q2 Scopus, SJR = 0.703).
11. Юрова К.А., Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., **Мелашченко Е.С.**, Шаркеев Ю.П., Мелашченко В.В., Шунькин Е.О., Комарова Е.Г., Чебодаева В.В., Иванов П.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Секреция провоспалительных цитокинов клетками, участвующими в регенерации костной ткани // **Гены и клетки** –2019. –Т.14. – С. 269-270. (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,428).
12. Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Мелашченко В.В., Норкин И.К., Иванов П.А., Хлусов И.А., Шунькин Е.О., Тодосенко Н.М., **Мелашченко Е.С.**, Литвинова Л.С. Клеточно-молекулярные аспекты воспаления, ангиогенеза и остеогенеза. Краткий обзор // **Цитология**. – 2020. – Т. 62. – №. 5. – С. 305-315. (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,721).
13. Литвинова Л.С., **Мелашченко Е.С.**, Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Тодосенко Н.М., Хлусов И.А. Морфофункциональная реакция Т-лимфоцитов при in vitro контакте с кальцийфосфатным покрытием в присутствии Т-клеточного активатора // **Цитология** – 2020. – Т.62. - №8. – С. 556–565 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,721).

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

2D (от англ. 2-dimensional) – двумерная культура	APC - аллофикоцианин
3D (от англ. 3-dimensional) – трехмерная культура	F - изотиоцианат флуоресцеина
АПК-антиген-презентирующие клетки	PE - фикоэритрин
КФ - кальцийфосфатный	PerCy7 - комплекс перидинин-хлорофилловый белковый
МНК – моноклеарные клетки	RTCA - real-time cell analyzer
ОКК - общее количество моноклеарных клеток крови	SA-PE - стрептавидин-фикоэритрин
ППС - полная питательная среда	TCR - Т-клеточный рецептор
ПЦР – полимеразная цепная реакция	Th – Т-хелпер
ЭДТА - Этилендиаминтетрауксусная кислота	ViO - краситель на основе кумарина
ЭТС - эмбриональная телячья сыворотка	

Мелашенко Елена Сергеевна

**КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ РЕАКЦИИ
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ
КЛЕТОК В ТРЕХМЕРНОЙ КУЛЬТУРЕ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

03.03.01 - физиология

Подписано в печать ___.__.2020
формат 60X90 1/16. Усл. печ. листов 0,65. Тираж 100 экз. Заказ №
Отпечатано полиграфическим отделом
Издательства Балтийского федерального университета им. И. Канта
236041, г. Калининград, ул. А. Невского 14