

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила  
Канта»

На правах рукописи

Мелашенко Елена Сергеевна

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

03.03.01 – физиология

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

**Научный руководитель:**  
доктор медицинских наук,  
Л.С Литвинова

**Научный консультант:**  
доктор медицинских наук,  
профессор И.А. Хлусов

Калининград-2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Клеточно-молекулярные механизмы активности иммунокомпетентных клеток (Т-лимфоцитов) <i>in vitro</i> .....	13
1.1.1. Контроль жизнеспособности Т-лимфоцитов .....	13
1.1.2. Способность Т- клеток к миграции (подвижности) .....	20
1.1.3. Функциональная активность Т-лимфоцитов .....	23
1.1.4. Пролиферативная активность (реакция на митогены) Т-лимфоцитов.....	24
1.1.5. Дифференцировка и созревание Т-лимфоцитов.....	28
1.2. Материалы, имитирующие природное межклеточное вещество (деминерализованный костный матрикс, коллаген, фосфаты кальция, системы золь/гель из природных и синтетических полимеров) .....	33
1.2.1 Основные классы биоматериалов для моделирования ЭЦМ.....	34
1.2.1.1 Биоматериалы природного происхождения и их аналоги, активно применяемые для замещения ЭЦМ кости.....	37
1.2.1.2. Синтетические биоматериалы, активно применяемые в качестве заменителя ЭЦМ кости .....	40
1.3.1 Особенности поведения иммунокомпетентных клеток в трехмерных культурах <i>in vitro</i> .....	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	48
2.1. Объект и материал исследования .....	48
2.1.1 Характеристика трехмерных матриксов для биологического тестирования .....	48
2.2. Методы исследования.....	51
2.2.1. Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови .....	53
2.2.2. Постановка экспериментальных моделей культивирования .....	53
2.2.3. Определение общего числа клеток и количества жизнеспособных лимфоцитов в культурах Т-клеток методом проточной цитометрии .....	54
2.2.4. Определение иммунофенотипа мононуклеарных клеток крови в культурах методом проточной цитометрии.....	55
2.2.5. Количественное определение факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов методом проточной флуориметрии .....	58
2.2.6. Выделение тотальной РНК .....	59
2.2.7. Обратная транскрипция образцов тотальной РНК.....	61
2.2.8. Определение уровня относительной экспрессии генов методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени.....	61

2.2.9. Определение миграционной активности моноклеарных клеток с помощью xCELLigence RTCA.....	66
2.3. Методы статистического анализа данных.....	67
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ НАБЛЮДЕНИЙ.....	70
3.1 Определение количества жизнеспособных и погибших (апоптотических, некротических) форм моноклеарных клеток крови в условиях сокультивирования с трехмерным искусственным матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани.....	70
3.2 Оценка мембранной экспрессии молекул клеточной дифференцировки, активации, апоптоза и созревания в культурах моноклеарных клеток крови в условиях сокультивирования с трехмерным матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани.....	72
3.3 Исследование секреции факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов в культурах моноклеарных клеток крови в условиях сокультивирования с трехмерным матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани.....	75
3.4. Оценка относительной экспрессии генов дифференцировки и пролиферации в культурах моноклеарных клеток крови в условиях сокультивирования с трехмерным матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани.....	81
3.5. Исследование динамики инвазивной активности культур моноклеарных клеток крови человека.....	83
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	87
4.1 Поведение МНК крови человека в 2D-гомеостатической культуре in vitro....	89
4.2 Поведение МНК крови человека в 2D-активационной культуре in vitro.....	98
4.3 Поведение МНК крови человека в 3D-гомеостатической культуре in vitro..	103
4.4. Поведение МНК крови человека в 3D-активационной культуре in vitro.....	108
ВЫВОДЫ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- 2D (от англ. 2-dimensional) – двумерная культура
- 3D (от англ. 3-dimensional) – трехмерная культура
- АПК – антиген-презентирующие клетки
- ГАП - гидроксиапатит
- ДК – дендритная клетка
- ДКФ - дикальцийфосфат
- К<sub>3</sub>ЭДТА - калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
- КГ - коллаген-гликозаминогликаны
- КФ - кальцийфосфатный
- МИ - индекс миграции
- МНК – моноклеарные клетки
- мРНК - матричная РНК,
- МРТ - магнитно-резонансная томография
- МСК – мезенхимные стволовые клетки
- ОКК - общее количество (моноклеарных) клеток крови
- ПВС - поливиниловый спирт
- ППС - полная питательная среда
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЭО - полиэтиленоксид
- рРНК – рибосомальная РНК
- ТАЕ - трис-ацетатный-ЭДТА буфер
- ТКФ - трикальцийфосфат
- ЦКП - центр коллективного пользования
- ЭЦМ - экстрацеллюлярный матрикс
- АРС - аллофикоцианин (флуоресцентная метка)
- Amp – аденозин монофосфат
- Bak - (от англ. Bcl-2 homologous antagonist/killer) - гомологичный антагонист / киллер Bcl-2
- Bcl-2 - (от англ. apoptosis regulator B-cell lymphoma 2) -регулятор апоптоза В-клеточной лимфомы
- ВМРs - костные морфогенетические белки

CaP - кальцийфосфатный

CD (от англ. cluster of differentiation) - кластер дифференцировки

CTL - цитотоксический Т-лимфоцит

CTLA-4 – (от англ. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) - цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4

DN - двойной отрицательный

dNTP – (от англ. Nucleoside triphosphate) - дезокси-Нуклеозидтрифосфаты

DP - двойной положительный

DTT – (от англ. Dithiothreitol) – Дитиотреитол

F - изотиоцианат флуоресцеина (флуоресцентная метка)

Fas – (от англ. tumor necrosis factor receptor superfamily member 6) - апоптотический антиген 1

FDA - управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

FLIP – антиапоптотический белок

FOXP3 (от англ. forkhead box P3) -. факторам семейства forkhead

FRET - (от англ. Förster resonance energy transfer) - флуоресцентно-резонансный перенос энергии

FSC – (рассеяние света под малым углом) - прямое светорассеяние

GATA - Эритроидный фактор транскрипции

ICAM-1 - (от англ. Intercellular Adhesion Molecule 1) - молекула межклеточной адгезии 1

ICOS (от англ. Inducible T-cell costimulator) - индуцибельный костимулятор Т-лимфоцитов

IL - интерлейкин

ККTi - крупнокристаллический титан

MHC - (от англ. major histocompatibility complex) - главный комплекс гистосовместимости

MMLV – (от англ. murine leukemia viruses) - вирусы мышинного лейкоза

MMP - матриксные металлопротеиназы

NF-κB - ядерный фактор «каппа-би»

NK - естественные киллеры

PE - фикоэритрин

PerCy7 - комплекс перидинин-хлорофилловый белковый

PGA - полигликолевая кислота

PLA - полимолочная кислота

PLGA - поли (молочно-гликолевая кислота)

Prf - перфорин (флуоресцентная метка)

RTCA – (от англ. Real Time Cell Analysis Instruments) - инструменты для анализа клеток в реальном времени

ROR – ретиноид ассоциированный рецептор

SA-PE - стрептавидин-фикоэритрин (флуоресцентная метка)

SP - одинарный положительный

SSC - (рассеяние света под прямым углом) - боковое светорассеяние

Stat1 и Stat3 - членов семейства транскрипционных факторов преобразователей сигналов и активаторов транскрипции

Sth – (от англ. ThPOK silencer) - ThPOK глушитель

t bet - T-box транскрипционные факторы

Tcm – T - клетки центральной памяти

TCR – (от англ. T cell receptor) - T - клеточный рецептор

Teff - T-клетки эффекторной стадии дифференцировки

Tem – T -клетки эффекторной памяти

TERT (от англ. telomerase reverse transcriptase) - теломеразная обратная транскриптаза

TGF- $\beta$  - трансформирующий ростовой фактор - бета

Th – T-хелпер

ThPOK – (от англ. T-helper inducing POZ-Kruppel like factor) - T-хелпер, индуцирующий POZ-Круппель-подобный фактор

TLR - Толл-подобные рецепторы

TNF - (от англ. tumor necrosis factor) - фактор некроза опухоли

TRAFs – (от англ. TNF receptor-associated factors) - факторы, связанные с рецептором TNF

Tscm – T - клетки подобные стволовым

UTRs - нетранслируемая область

ViO - краситель на основе кумарина

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **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" (Arron 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 активизирует 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** явилось 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-матрицков.

### **Положения, выносимые на защиту**

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.

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.

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.

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.

### **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-матриц 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-матрицей, имитирующей 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 персонализированной 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- $\alpha$ , VEGF).
6. Анализ клеточной инвазии через микропористую мембрану при помощи автоматизированной xCELLigence RTCA DP системы.
7. Статистический анализ данных.

## **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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Клеточно-молекулярные механизмы активности иммунокомпетентных клеток (Т-лимфоцитов) *in vitro*

Т-лимфоциты являются, с одной стороны, центральным звеном иммунного ответа. С другой стороны, они, наряду с моноцитами/макрофагами, регулируют своевременность и интенсивность воспалительных/регенераторных процессов в различных органах и тканях, включая кости (Loi F. et al., 2016). В функции Т-клеток входит распознавание и уничтожение клеток с чужеродными антигенами инфекционной и неинфекционной природы. Сущность иммунного ответа во многом связана с процессами активации, пролиферации и дифференцировки Т-клеток. Во время активации Т-клетки проявляют сложную картину взаимодействия с АПК. Тонкое понимание основных механизмов взаимодействия Т-клеток с АПК в естественных условиях экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) необходимо для имитации/модуляции процессов жизнедеятельности *in vitro*.

Поведение клеток в системе *in vitro* включает следующие реакции:

- 1) сохранение жизнеспособности в относительно физиологичных условиях существования;
- 2) подвижность;
- 3) пролиферация (бласттрансформация);
- 4) дифференцировка и созревание;
- 5) функциональная активность.

#### 1.1.1. Контроль жизнеспособности Т-лимфоцитов

Факторы, влияющие на жизнеспособность Т-клеток, варьируют в зависимости от их типа и состояния. Наивные Т-клетки погибают, преимущественно, через *Vcl-2/Vim*-зависимый путь апоптоза, предотвратить который можно с помощью *IL-7* и контакта с антигенами главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) (Marrack P., Kappler J., 2004).

Активированные Т-клетки погибают разными способами. Среди них есть путь, включающий сигналы, которые приходят извне Т-клетки и влияют на нее через поверхностные рецепторы, такие как апоптозный антиген 1 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 6, Fas). Помимо того, активированные Т-клетки погибают через путь, управляемый сигналами, генерируемыми внутри самой Т-клетки. В этом пути участвуют члены семейства регуляторов апоптоза (apoptosis regulator B-cell lymphoma 2, Bcl-2), в частности Bcl-2, Bcl-xl, Bim и, возможно, Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer). Жизнеспособность CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти контролируется по-разному. CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти поддерживаются IL-15 и IL-7. Контроль CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти более сложный, с включением IL-7 и/или контакта через Т-клеточный рецептор (TCR) (Marrack P., Kappler J., 2004).

### **Гуморальная регуляция жизнеспособности наивных Т клеток**

Относительно постоянное число Т-клеток и их наивных форм в организме человека может свидетельствовать о том, что клеточная популяция поддерживается неким ограничивающим фактором (факторами), за который они конкурируют. Так, IL-7 стимулирует *in vitro* выживание Т-клеток человека, в то же время IL-7 и IL-4 – у мышей (Rathmell J.C. et al., 2001, Wang R. et al., 2011). IL-6 и IL-12 также способствуют поддержанию культуры наивных Т-клеток *in vitro*, но в меньшей степени, чем IL-7 и IL-4 (Teague T.K. et al., 2000). Существуют дополнительные факторы, продуцируемые стромальными клетками, которые еще предстоит идентифицировать (Zhou Y.W. et al., 2003).

Присутствие в культуре IL-6 не является принципиальным фактором выживания Т-клеток у животных. IL-6-дефицитные мыши содержат нормальное количество Т-клеток (Scheller J. et al., 2011), а Т-клетки, полученные от нормальных животных, не содержат высоких уровней фосфорилированных членов семейства транскрипционных факторов преобразователей сигналов и активаторов транскрипции (Stat1 и Stat3), ассоциированных с экспрессией проапоптотических генов (Teague T.K. et al., 2000). Аналогично, животные с дефицитом IL-12 и IL-4 имеют нормальное количество Т-клеток, однако у них отсутствует или снижена способность к конверсии в фенотипы Th1 или Th2 (Kara E.E. et al., 2015; Mambres D.H. et al., 2016). Вместе с тем, учитывая тот факт, что IL-4 конститутивно экспрессируется у животных, маловероятно, что его секреция во время антигенной

стимуляции необходима для поддержания наивных Т-клеток. Тем не менее, у мышей, лишенных IL-7, удаление IL-4 также способствует большому снижению числа наивных Т-клеток (Marrack P., Kappler J., 2004).

Первые эксперименты, которые выявили участие IL-7 в поддержании популяции наивных Т-клеток у мышей, были проведены (Boursalian T.E., Bottomly K., 1999; Silva S.L., Sousa A.E., 2016). Авторы тимэктомировали взрослых мышей, а затем вводили антитела против IL-7. В результате этих манипуляций уменьшалось число наивных лимфоцитов, но не Т-клеток памяти. Следует отметить, что снижение числа наивных Т-клеток было выражено сильнее, если у животных отсутствовала способность вырабатывать IL-4. Исследователи пришли к выводу, что IL-7 участвует в поддержании субпопуляции наивных Т-клеток у мышей, хотя его активность может быть в некоторой степени заменена IL-4. Схожие результаты в отношении потребности клеток в IL-7 были опубликованы другими исследователями (Vivien L. et al., 2001).

Далее K.S. Schluns et al. (2000) показали отсутствие пролиферации CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> наивных Т-клеток у IL-7-дефицитных животных, что было подтверждено также другими авторами (Kawabe T. et al., 2018).

Известно, что наивные Т-клетки несут высокоаффинные рецепторы к IL-4 и IL-7 (Sorobetea D. et al., 2018), но не к IL-2 или IL-15 (Barra N.G. et al., 2014). Вероятно, что соответствующий внутрисигнальный путь включает в себя индукцию антиапоптотического белка Bcl-2. При этом, экспрессия Bcl-2 индуцируется всеми членами семейства IL-2 (Opferman J.T., Kothari A., 2018). Выживание покоящихся Т-клеток посредством увеличения экспрессии Bcl-2, вероятно, не является единственной функцией, которую IL-7 индуцирует в покоящихся Т-клетках. Rathmell J.C. et al. (2001) выявили значительное снижение метаболической активности и уменьшение размера наивных Т-клеток в культуре при отсутствии стимуляторов и показали, что индукция Bcl-2, опосредованная IL-7, достаточна для поддержания жизнедеятельности Т-клеток. Но для метаболической активности наивных Т-клеток требуется передача сигналов через фосфатидилинозитол-3-киназу и у млекопитающих через мишень рапамицина, путей, которые не требуют индукции Bcl-2 (Rathmell J.C. et al., 2001). Таким образом, IL-7 индуцирует различные каскады событий, которые способствуют

поддержанию жизнеспособности и функциональной активности наивных Т-клеток *in vivo* и *in vitro*.

### **Эффекты Т-клеточных рецепторов**

Ранее установлено, что поддержание жизнеспособности Т-клеток у животных обеспечивается вовлечением в этот процесс TCR-сигналикации (Marrack P., Kappler J., 2004 (2)), тесно связанной с МНС. В то же время, это не удалось продемонстрировать *in vitro*.

В целом, есть две гипотезы поддержания жизнеспособности Т-клеток у животных при их взаимодействии с МНС. Одна из них говорит о том, что сигнал доставляется при слабом взаимодействии с самим рецептором TCR. Другая заключается в том, что взаимодействие с МНС необходимо только для того, чтобы приблизить Т-клетку к какой-либо другой клетке, возможно, к дендритной, что и генерирует сигнал «выживания», т.е. сигнал доставляется из другой клетки через рецептор на Т-клетке, без участия TCR. Согласно данным литературы, первая из этих гипотез вероятнее. Компоненты CD3 фосфорилируются в нормальных Т-клетках у животных, и это фосфорилирование быстро исчезает после того, как взаимодействие между TCR на Т-клетках и МНС у животных прерывается (Seddon V., Zamoyska R., 2002). Нижестоящие молекулы, затронутые этой передачей сигналов, неизвестны. Предполагают, что некоторые из них могут быть членами семейства NF-κB (ядерного фактора «каппа-би») (Zheng Y. et al., 2003).

### **Регуляция жизнеспособности активированных Т клеток**

После контакта Т-клеток с антигеном они пролиферируют, после чего большинство активированных клонов умирает (клоновая селекция). Фаза экспансии, в значительной степени, обеспечивается цитокинами семейства IL-2. Эффективная пролиферация антиген-стимулированных Т-клеток требует также вовлечения молекулы CD28 на их поверхности (Tanaskovic S. et al., 2017). Лигирование CD28 индуцирует продукцию (экспрессию) Bcl-x1 (Boomer J.S., Green J.M., 2010), который оказывает протекторное действие на пролиферирующие клетки.

Следует отметить некоторые трудности в изучении механизмов гибели Т-клеток *in vitro*, ассоциированной с активацией, поскольку в целом, *in vitro*

активированные Т-клетки (например, с помощью антител к TCR), не проявляют такой же тенденции к гибели, как их аналоги *in vivo*.

Несколько факторов могут объяснить разницу. Так, в суспензионной культуре Т-клетки длительное время разобщены, поэтому межклеточные взаимодействия, которые вызывают клеточную гибель (контактная ингибиция, описано ниже), могут быть менее частыми в культуре, чем в тканях в условиях *in vivo*. Кроме того, Т-клетки, стимулированные *in vitro*, продуцируют в большем количестве антиапоптотический фактор (IL-2), тогда как *in vivo* продукция IL-2 носит ограниченный во времени характер (Marrack P., Kappler J., 2004). Фактически, регуляция всех цитокинов семейства IL-2 может быть менее показательной в культуре, нежели в условиях *in vivo*.

Факторы и механизмы, опосредующие гибель активированных Т-клеток, являются предметом обширных исследований в течение многих лет. Выявлено, что активированные, но не покоящиеся Т-клетки, экспрессируют рецепторы Fas и фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) (Lan W. et al., 2012), которые активируют гибель клетки через каспазы (Lenardo M. et al., 1999), тогда как другие иммунные клетки, экспрессируют лиганды для рецепторов Fas и TNF (Kavurma M.M., Khachigian L.M., 2003).

Однако, животные с дефицитом Fas или его лиганда не накапливают активированные CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Т-клетки, а также Т-клетки памяти; при том у таких Fas-дефицитных особей увеличивается число CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>+</sup> Т-клеток. Последние являются апоптотической субпопуляцией TCR-αβ<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> клеток (Wang L. et al., 2010; Miyagawa F. et al., 2013). Кроме того, активированные Т-клетки, в разной степени, экспрессируют белок FLIP (антиапоптотический белок), который защищает их от Fas-опосредованной гибели (Floros T., Tarhini A.A., 2015).

Следующий механизм клеточной гибели опосредован активацией клетки (Hildeman D.A. et al., 2003) и ассоциирован с вовлечением членов семейства Bcl-2 и сфокусирован на митохондриях. Связанные с Bcl-2 белки делятся на три подсемейства (Opferman J.T., Korsmeyer S.J., 2003). Первое из них, типичное для Bcl-2 и Bcl-x1, является антиапоптотическим, и включает все четыре короткие пептидные области, BH1-4. Другое подсемейство состоит из Т-клеточных белков Bax и Bak, которые являются фактическими убийцами клетки (Wei M.C. et al., 2001) и включает только три из четырех доменов гомологии, а именно BH1-3.

Третья группа этих белков, которые содержат только домены ВНЗ, расположенные в различных органеллах и ключевых контрольных точках по всей клетке и необходимы для мониторинга нормального метаболизма различных компартментов клетки (Strasser A. et al., 2000).

Гибель Т-клеток определяют условия, при которых они сталкиваются с антигеном. Так, меньшая доля антиген-специфических Т-клеток погибает, если антиген вводится животным с адьювантом (Di Genova G. et al., 2010). Идея о том, что АПК могут играть определенную роль в поддержании жизнедеятельности Т-клеток, подтверждается наблюдением, что анти-CD40, связываясь и стимулируя дендритные клетки, уменьшает количество активированных Т-клеток, которые погибают после иммунного ответа (Whitmire J.K. et al., 2000). Антитела, которые блокируют лиганды на активированных дендритных клетках, такие как анти-Ox40, анти-4-1BB лиганд или анти-CD27, при связывании с рецепторами на Т-клетках также помогают поддерживать их жизнеспособность (Gravestain L.A. et al., 1998).

Ox40, 4-1BB лиганд и CD27 - все связаны с рецепторами TNF. У них отсутствуют домены смерти в их внутриклеточных частях, но действуя через рецепторы факторов, связанных с рецептором TNF (TNF receptor-associated factors, TRAFs), обычно TRAF2 и / или TRAF5, они активируют членов семейства NF-κB (Edilova M.I. et al., 2018). Продукты генов, индуцированных NF-κB, действуют для сохранения жизнеспособности активированных Т-клеток. Кроме того, предполагают, что Т-клетки защищают себя от гибели, увеличивая содержание белков, которые могут инактивировать Bax и Bak.

### **Жизнеспособность Т-клеток памяти**

Феномен иммунологической памяти является наиболее обсуждаемой тематикой в контексте реализации иммунных реакций. Объяснения факта иммунологической памяти, в некоторых случаях сохранения ее на всю жизнь, варьируются от идеи о том, что живые организмы, подвергшиеся антигенному воздействию, никогда не бывают полностью свободным от антигена, до представления о том, что Т-клетки памяти чрезвычайно долгоживущие. Одна из трудностей в понимании феномена Т-клеточной памяти заключается в том, что такие клетки трудно изучать *in vitro*. Например, Т-клетки памяти, которые не делятся, а просто жизнеспособны в течение длительного времени, будет очень

трудно отличить *in vitro* от какого-либо другого вида клеток, которые приобрели способность адаптироваться к некомфортным условиям культивирования.

Некоторый прогресс в этом отношении был достигнут для линии  $CD8^+ \alpha\beta TCR^+$  Т-клеток. Так, Tough и Sprent в 1994 году показали, что популяция Т-клеток памяти у мышей делится медленно, и скорость деления может быть увеличена за счет повышения концентрации интерферонов I типа в среде (Tough D.F., Sprent J., 1994). Позже та же группа показала, что интерфероны типа I не воздействовали непосредственно на клетки памяти, а скорее индуцировали продукцию IL-15 (Sallusto F. et al., 2004). Позже другие группы показали, что  $CD8^+$  Т-клетки памяти у животных находятся в состоянии постоянного, но медленного деления (Becker T.C. et al., 2002). IL-15 и, в меньшей степени, IL-7 (Schluns K.S. et al., 2000; Tan J.T. et al., 2002), вырабатываются конститутивно у животных (Mishra A. et al., 2014). Во время воспаления продукция IL-15 увеличивается макрофагами (Liew F.Y., 2003). Кроме того, известно, что IL-15 может связываться с высокой аффинностью с альфа-цепью своего рецептора (IL-15R $\alpha$ ) и, таким образом, удерживаться на клетках, а также взаимодействовать с IL-5R $\beta\gamma$  на других клетках (Dubois S. et al., 2002). В целом, IL-15 является ключевым фактором, обеспечивающим выживание  $CD8^+$  Т-клеток памяти у животных, что доказано на моделях IL-15 $^-$  и IL-15R $\alpha$   $^-$  дефицитных животных (Kennedy M.K. et al., 2000), которые имеют низкое количество  $CD8^+$  Т-клеток памяти.

Культура иммунных клеток после добавления IL-2 продуцирует Т-клетки, которые мигрируют в нелимфоидные органы (Manjunath N. et al., 2001). Эти клетки могут быть эквивалентны периферическим клеткам памяти (Manjunath N. et al., 2001); тем не менее, IL-2 не является поддерживающим медиатором для  $CD8^+$  Т-клеток памяти у животных (Marrack P., Kappler J., 2004).

$CD8^+$  Т-клетки памяти не зависят от взаимодействия с МНС класса I для поддержания их жизнеспособности (Abdelsamed H.A. et al., 2017). Однако, встреча с антигеном и/или повторное воздействие антигена в определенных случаях могут сохранить количество антиген-специфических клеток памяти  $CD8^+$  (Marrack P., Kappler J., 2004).

### 1.1.2. Способность Т- клеток к миграции (подвижности)

В организме человека лимфоциты непрерывно мигрируют в поисках чужеродного антигена из кровеносных сосудов в лимфоидные органы, такие как небные миндалины, пейеровы бляшки и лимфатические узлы. В условиях стресса Т-лимфоциты эмигрируют из кровеносного русла в нелимфоидные органы (Бабаева А.Г., 1990), где контролируют процессы репарации клеток и тканей (Гольдберг Е.Д. и др., 1999).

С использованием оптической микроскопии было показано, что Т-лимфоциты *in vitro* при миграции приобретают морфологию с четкой полярностью: хвост, образованный небольшим клеточным фрагментом (уроподой), и головка, с помощью которой иницируются межклеточные контакты. Головка соединена с телом клетки цитоплазматической нитью — «волоконном ретракции» (Mempel et al., 2004; Eisenbarth S. C., 2019). Большая часть цитоплазмы локализуется на переднем полюсе лимфоцита по ходу его движения. Ядро лимфоцита располагается в задней части тела клетки. Подобная форма клетки во время движения связана с перестройкой цитоскелета. Молекулярные механизмы, контролирующие ремоделирование актинового цитоскелета во время подвижности Т-лимфоцитов, были раскрыты лишь частично (Dupré L. et al., 2015).

У большинства мигрирующих клеток передний край состоит из тонкой и широко растянутой структуры, называемой ламеллоподией (Rikitake Y., Takai Y., 2011; Abdelsamed H.A. et al., 2017). Ламеллоподия представляет собой сильно разветвленные актиновые волокна, которые составляют плотную сеть. Ламеллоподия подвергается периодическим сокращениям, которые связаны с ретроградным потоком актина (Dimchev G. et al., 2017). Передний край клетки также характеризуется наличием тонких продольных выступов различной длины, которые называются филоподиями и выполняют исследовательскую функцию (Mattila P.K., Lappalainen P., 2008).

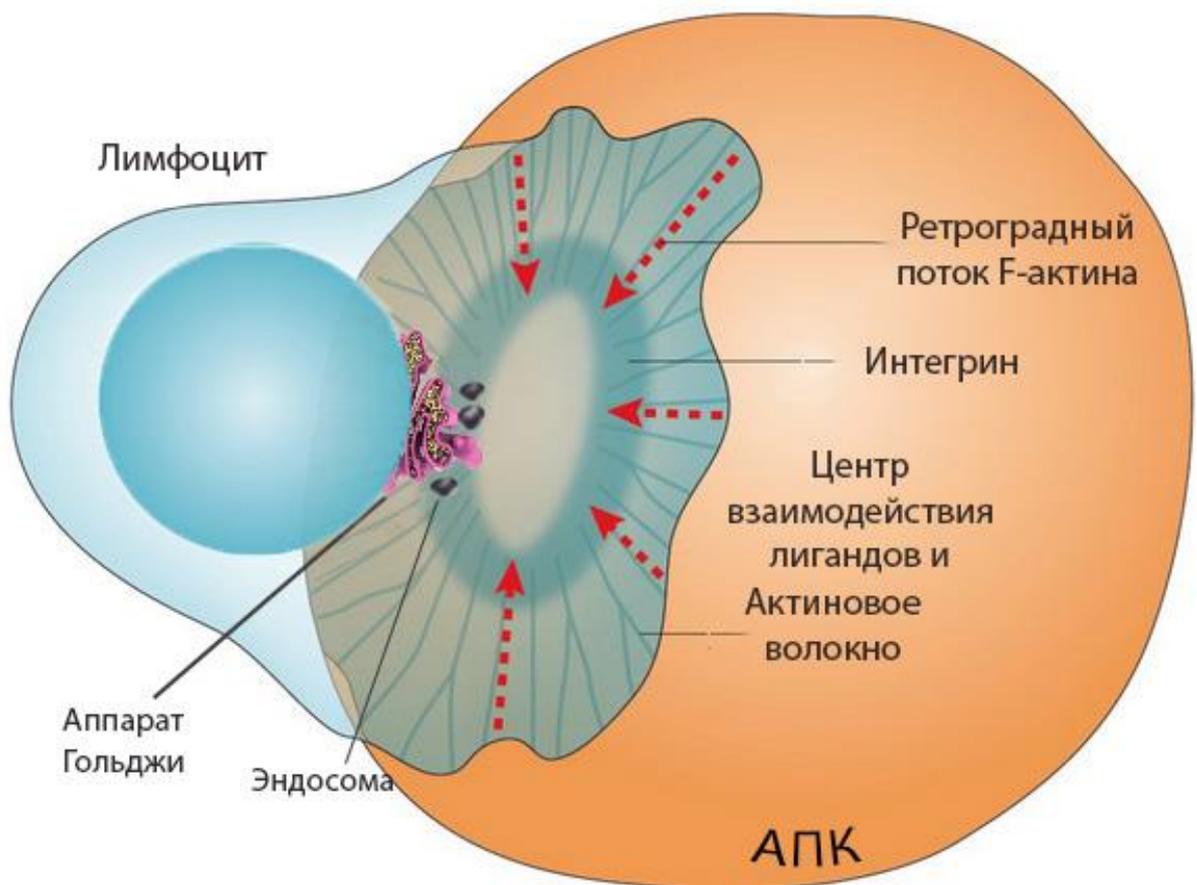
Клетки, в частности иммунные и опухолевые, которые способны преодолевать тканевые барьеры, состоящие из плотных сетей ЭЦМ, собирают инвадоподии или родственные структуры, которые могут локально разрушать ЭЦМ, чтобы обеспечить клеточную инвазию. В некоторых клетках, в частности, в лимфоцитах, ведущей структурой могут быть псевдоподии, которые являются

более громоздким выступом, чем ламеллиподии, так как они заполнены цитоплазмой. За передним краем клетки форму тела клетки поддерживает актиновая кора, тонкая сеть актиновых волокон, локализованная под клеточной мембраной. Альтернативные стратегии подвижности, не зависящие от сборки филоподии, могут быть обеспечены путем образования мембранных пузырьков в результате гидростатического давления внутри клетки и локальной релаксации коркового актина (Blanchoin L. et al., 2014).

Задний край клетки (уропода) обычно характеризуется пучками актиновых филаментов, связанных с миозином. Это позволяет скользить актиновым волокнам, которые вызывают натяжение клеток, толкая тело и заднюю часть клетки вперед. Важно отметить, что каждый тип клеток наделен определенными характеристиками подвижности, которые отражаются в различных способностях ремоделирования актинового цитоскелета для сборки выступов (Dupré L. et al., 2015). В этом контексте лимфоциты классифицируются как клетки, проявляющие амебоидную подвижность. Действительно, характеристики их подвижности сопоставимы с описанными для *Dictyostelium discoideum amoeba*. Морфология мигрирующих лимфоцитов характеризуется выделением богатой актином псевдоподии, пузырей и сократительного заднего края. Кроме того, амебоидная подвижность лимфоцитов характеризуется слабой адгезией к субстрату и небольшим или нулевым протеолизом компонентов ЭЦМ (Krummel M.F. et al., 2014).

Подвижность лимфоцитов тесно связана с их протективной и эффекторной функциями в реализации иммунных реакций. Действительно, лимфоциты могут мигрировать чрезвычайно быстро, адаптировать свои стратегии подвижности для преодоления различных тканевых барьеров и ориентировать свою миграцию в ответ на различные хемотаксические факторы. Кроме того, подвижность лимфоцитов регулирует качество их взаимодействия с АПК. Как специфические особенности миграции лимфоцитов контролируются актиновым цитоскелетом, выяснено лишь частично. После контакта с АПК Т-клетка может изменять свою морфологию и, в дальнейшем, мигрировать, либо остаться неподвижной (Shakhar et al., 2005; Devreotes P., 2015). Кроме того, клетка может поддерживать динамическое состояние и ползти по поверхности АПК со значительной скоростью - до 10 мкм/мин (Gunzer M. et al. 2000; Mempel T. R. et al. 2004).

Первоначально, вследствие отсутствия более совершенных технологий, исследователи могли заснять лишь статическую картину взаимодействия Т-клеток с АПК. Классические опыты Купфера и Зингера (1989) показали, что антиген-специфические Т-клетки физически взаимодействуют с В-клетками, презентирующими соответствующий пептидный антиген, а центры организации микротрубочек становятся переориентированными друг к другу. Позже было продемонстрировано, что при взаимодействии Т-клеток с АПК образуется высокоорганизованное мультимолекулярное соединение белков в плоскости взаимодействия, которое сейчас называют иммунологическим синапсом (рисунок 1) (Yi J. et al., 2019).



**Рисунок 1.** Контакт лимфоцита с антиген-презентирующей клеткой в 3D-среде. На межклеточной границе визуализируются мембранные выступы лимфоцита, фиксирующие АПК (по Bhavsar I. et al., 2019).

В то же время, при использовании суспензионной культуры клеток было продемонстрировано, что наивным Т-лимфоцитам для достижения эффекторного потенциала необходимо определенное время контактировать с АПК.

Продолжительность контакта составляла примерно 6 часов при взаимодействии с сильными АПК, но могла увеличиваться до 30 часов при взаимодействии со слабыми АПК. Поэтому сильные АПК, такие как дендритные клетки (ДК), были способны индуцировать пролиферацию Т-клеток в течение нескольких часов после контакта, даже при низких дозах антигена, в то время как для слабых АПК, таких как В-клетки, необходимо более длительное время контакта, даже при высоких уровнях антигена (Maуа V. et al., 2018).

### **1.1.3. Функциональная активность Т-лимфоцитов**

При использовании подхода прижизненной клеточной визуализации было показано, что в отсутствие узнаваемых комплексов пептид-МНС Т-клетки были мобильны и мигрировали к молекулам клеточной адгезии ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), которые содержались в липидных бислоях (Dustin M.L. et al., 1997). В то же время, когда комплекс пептид-МНС был доступен в липидных бислоях в дополнение к молекулам ICAM-1, Т-клетки переставали двигаться и оставались на МНС-пептиде (Dustin M.L., 2009). Согласно приведённой выше модели Dustin et al., наивные Т-клетки в лимфатических узлах при активации подвижны в связи с поиском конкретного комплекса пептид-МНС из всех имеющихся АПК. Как только наивный Т-лимфоцит обнаруживает комплекс МНС-пептид с высоким сродством, клетка останавливается и образует стабильный контакт с АПК в течение нескольких часов, до достижения полной активации. За это время формируется иммунологический синапс, который необходим для передачи сигналов и, возможно, участвует также в торможении подвижности Т-лимфоцитов (Dustin M. L., Chan A. C., 2000; Sallusto F. et al., 2000).

Однако, дальнейшие наблюдения за незрелыми Т-клетками и макрофагами в культурах показали несостоятельность модели Dustin et al. Было обнаружено, что Т-клетки мигрируют по цепочке АПК, останавливаясь только в течение ограниченного промежутка времени на одной из них, возобновляя затем движение к следующей АПК. Из этих наблюдений был сделан вывод, что Т-клетка последовательно получает сигналы от нескольких АПК (Underhill D. M. et al., 1999). В дальнейшем, в отношении данной гипотезы была высказана критика, что на поведение используемых Т-лимфоцитов могло влиять состояние

предварительной активации, и, таким образом, исследования Underhill et al. (1999) могли не отражать поведение наивного, неактивированного Т-лимфоцита.

В новом подходе трансгенные Т-клетки с наивным TCR и активированные ДК использовались как антиген-специфичная активационная пара. Оба типа клеток были встроены в 3D-колагеновый матрикс в качестве имитации лимфатической ткани. Установлено, что формирование скоротечных контактов со специфическими ДК является общей особенностью наивных Т-клеток (Gunzer M. et al. 2000). Тем не менее, возникает тот же вопрос: можно ли считать трансгенные Т-лимфоциты интактными наивными клетками?

Миграция Т-лимфоцитов включает в себя адгезионное взаимодействие интегринов поверхности цитоплазматической мембраны с лигандами, экспрессируемыми на других клетках, или с белками внеклеточного матрикса. Точная пространственно-временная активация интегринов от низкого к высокому состоянию на переднем крае клеток имеет важное значение для миграции Т-лимфоцитов. Аналогично, втягивание клеткой задней кромки, или уropyды, является необходимым шагом в поддержании стойкой интегрин-зависимой моторики Т-лимфоцитов (Krummel M.F. et al., 2014).

Многие терапевтические подходы к лечению аутоиммунных или воспалительных заболеваний предусматривают воздействие на целевые интегрин-лиганды для торможения миграции лейкоцитов. Относительно недавно *in vitro* был проведен анализ миграции клеток на двумерной подложке, имитирующей условия, которые Т-лимфоцит встречает во время выхода из сосудистой сети (эмиграция). Во время эксперимента Т-лимфоцитам давали возможность прилипать и мигрировать по подложке, покрытой молекулами межклеточной адгезии (ICAM-1), лигандом для интегрина LFA-1 и стромальных клеток. Данные показали, что Т-лимфоциты проявляют миграционную скорость ~ 15 мкм/мин.

Установлено, что блокада бета-интегрина или добавление актомиозиновых ингибиторов приводят к подавлению миграции Т-клеток (Krummel M.F. et al., 2016).

#### **1.1.4. Проллиферативная активность (реакция на митогены) Т-лимфоцитов**

Иммунная система опирается на гомеостатические механизмы для адаптации к изменяющимся условиям, возникающим во время устойчивого существования

организма. Для Т-клеток это включает поддержание разнообразного репертуара наивных клеток, быструю элиминацию эффекторных клеток после клиренса патогенов и долгосрочную выживаемость клеток памяти. (Marrack P., Kappler J., 2004).

Известно, что значительное снижение количества Т-клеток, опосредованное различными супрессирующими факторами (цитотоксические препараты, облучение, вирусы и др.), приводит к гомеостатической пролиферации, опосредованной лимфопенией, и восстановлению нормальных уровней Т-клеток. Такое увеличение/пополнение пула лимфоцитов обусловлено взаимодействием TCR с молекулами собственного пептида/МНС (п/МНС), а также цитокинами, в частности, IL-7. Эти же лиганды, т.е. молекулы п / МНС и IL-7, поддерживают наивные Т-лимфоциты в качестве покоящихся клеток в устойчивых условиях, достаточных для Т-клеток. В отличие от наивных лимфоцитов, «центральным» Т-клеткам памяти для их выживания в интерфазе и для клеточного деления необходима комбинация цитокинов IL-7 и IL-15 и не требуются сигналы от молекул пептид-МНС (Boyman O. et al., 2009).

Несмотря на постоянное взаимодействие TCR с молекулами п/МНС, зрелые постстимульные Т-клетки остаются иммунологически наивными в интерфазе в течение длительного периода времени. Когда наивные Т-клетки сталкиваются с чужеродным антигеном, представленным профессиональным АПК, сигналы TCR изменяются от субмитогенных к стимулирующим и приводят к активации и пролиферации. В дополнение к запуску TCR, оптимальная активация Т-клеток требует костимуляции через контакт CD28 с CD80 / CD86 (B7.1 / B7.2) на АПК, сигналы цитокиновых рецепторов от контакта с ауто/паракринным IL-2, а также производимые АПК цитокины, такие, как IL-12, интерферон- $\alpha$  и IL-15 (Sarkar S. et al., 2008; Letourneau S. et al., 2009). Эти различные стимулы имеют решающее значение не только для проведения оптимальных эффекторных функций, но и для генерации функциональных клеток памяти. Наоборот, регуляторные Т-клетки негативно модулируют функции эффекторных Т-клеток, снижая, тем самым их пролиферацию и способствуя апоптозу (Boyman O. et al., 2009).

Идентификация антигена Т-клеткой возможна только в случае одновременного протекания двух событий: во-первых, обнаружение присутствия антигенного рецепторного комплекса на поверхности АПК; во-вторых,

костимуляторный рецептор, коэкспрессируемый на Т-клетке, обнаруживающий лиганд на поверхности АПК.

В конечном итоге, костимуляция индуцирует эффективную выработку аутокринного фактора роста (IL-2), что приводит к генерации популяции эффекторных Т-клеток. Постоянная загруженность рецепторов Т-клеток, в отсутствие костимуляторных сигналов, приводит к потере антиген-чувствительности, называемой клональной анергией (Malvey E.N. et al., 1998).

Многочисленные эксперименты, проведенные в культуре тканей *in vitro* и *in vivo*, показали, что взаимодействия CD28-B7 (B7 лиганд на антигенпрезентирующей клетке – неспецифический сигнал активации) необходимы и достаточны для эффективной костимуляции роста популяции антиген-специфических Т-клеток и предотвращения клональной анергии. Тем не менее, Т-клетки могут развиваться и у мышей, отрицательных по маркеру CD28, и способны вызывать значительный, хотя и неоптимальный ответ после стимуляции антигеном. Это наблюдение повышает вероятность того, что другие костимуляторные рецепторы присутствуют в иммунной системе и, при определенных обстоятельствах, играют важную роль в ответе на патогены (Mueller D.L. et al., 2000).

Несмотря на структурное сходство с CD28, цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4) экспрессируется на Т-клетках только после активации. Кроме того, *in vitro* было показано, что запуск CTLA-4 ингибирует активацию Т-клеток и противодействует костимулирующему действию молекул B7 на экспансию клонов Т-клеток. В соответствии с этим, отсутствие CTLA-4 на Т-клетках у мышей (CTLA-4  $-/-$ ), приводит к развитию аутоиммунных реакций и летальному лимфопролиферативному заболеванию (Chen L., Flies D.B., 2013).

Командой Hutloff et al. (1999) идентифицирован третий член семейства CD28 – индуцибельный костимулятор Т-лимфоцитов (ICOS – Inducible T-cell costimulator) (цит. по Maazi H. et al., 2015). Он экспрессируется на активированных Т-клетках, а также на регуляторных Т-клетках и имеет решающее значение для выживания и функционирования Т-клеток, дифференцировки Th2-клеток и воспалительных реакций в легких. Выявлено, что ген ICOS имеет 27% и 18% идентичности последовательности с CD28 и CTLA-4 человека, соответственно.

Запуск ICOS значительно стимулирует пролиферацию Т-клеток, но не может заменить лигирование CD28 при индукции секреции IL-2. Костимуляция ICOS эквивалентна опосредованной CD28 продукции IL-4, IL-5, гамма-интерферона (IFN $\gamma$ ), фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), а также IL-10. Костимуляция ICOS усиливает экспрессию лиганда CD40, что может привести к увеличению секреции поликлональных антител в совместных культурах Т- и В-клеток (Tamatani T. et al., 2000). Coyle A. et al. (2015) синтезировали моноклональные антитела против ICOS.

Choi Y. S. et al. (2011) идентифицировали экспрессию ICOS не только на активированных зрелых Т-клетках, но также на нестимулированных тимоцитах. Они предполагают, что ICOS может регулировать способность активированных Т-клеток прикрепляться к потенциальным клеткам-мишеням и взаимодействовать с ними, а также влиять на их пролиферацию и дифференцировку в эффекторные клетки, в частности, Th2-типа, секретирующие IL-4, IL-5 и IL-10.

Степень активации TCR определяет дальнейшую судьбу Т-лимфоцитов. Так, сильные агонистические лиганды стимулируют максимальную клональную пролиферацию, дифференцировку в эффекторы и формирование пула клеток памяти, тогда как более слабые лиганды вызывают меньшую пролиферацию и дифференцировку в эффекторы и клетки памяти. Было показано, что определенные группы белков, такие как эффекторные цитокины, хемокины и хемокиновые рецепторы, высоко регулируются посттранскрипционно в Т-клетках (Anderson P., 2010). Например, примированные Т-клетки накапливают репертуар эффекторных мРНК (матричная РНК), которые превращаются в белки только после вторичной стимуляции TCR (Scheu S. et al., 2006), ограничивая продукцию мощных цитокинов сайтом повторного присутствия патогена. Выявлено, что многие мРНК подвергаются укорочению их 3'-UTRs (3'- некодируемая область) концов после нескольких раундов пролиферации Т-клеток (Sandberg R. et al., 2008). Это позволяет предположить, что контроль трансляции относится к мРНК и важен для функции Т-клеток. Также данные указывают на то, что после активации Т-клетки отдают приоритет трансляции специфических мРНК в дополнение к регуляции более глобального производства белков. Однако, механизмы Т-клеток, с помощью которых они отдают приоритет трансляции специфических мРНК, не совсем понятны (Tan T.C. et al., 2017).

В клетках млекопитающих стадией контроля скорости роста и пролиферации клеток является наличие рибосом (Moss T. et al., 2007; Tafur L. et al., 2016). Биогенез (сборка и функционирование) рибосом требует больших биоэнергетических затрат (Granneman S., Tollervey D., 2007) и активно поддерживается в постоянно пролиферирующих, трансформированных клетках и клеточных линиях. В связи с вышесказанным становится понятно, что после активации Т-клеток трансляция становится приоритетным процессом.

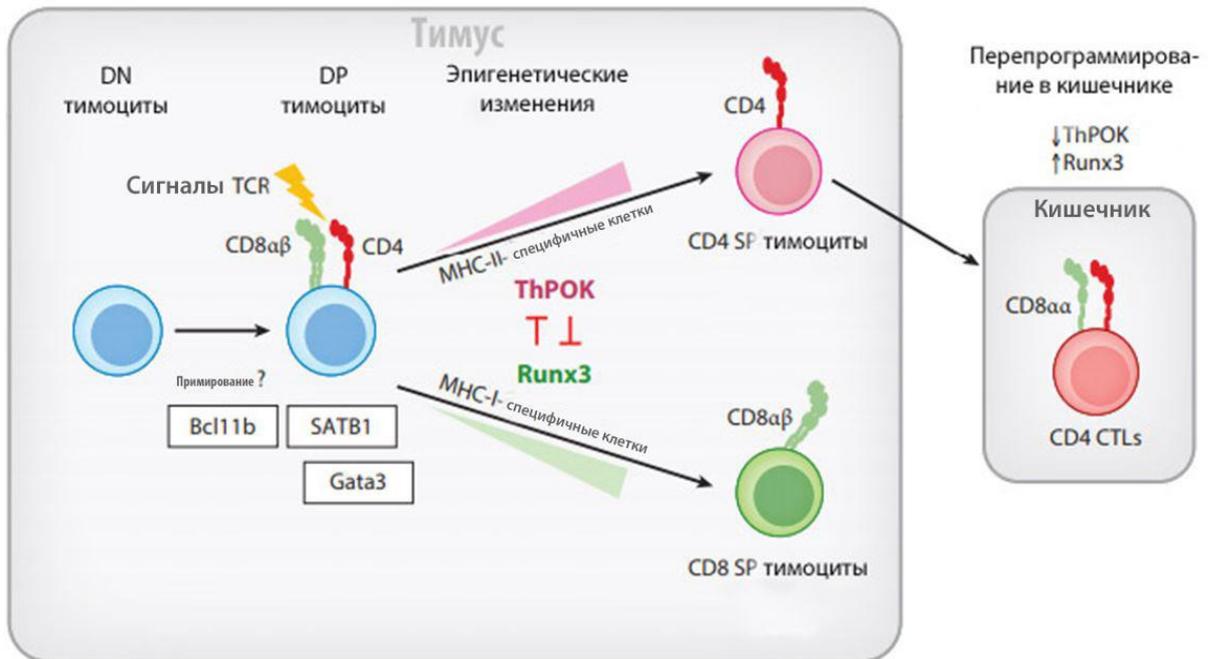
Изучая *in vitro* стимулированные лигандами наивные ТCR-трансгенные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, было обнаружено, что после активации ТCR биогенез рибосом контролируется на нескольких уровнях: на уровне транскрипции и процессинге предшественников рРНК (рибосомальная РНК) и при трансляции мРНК. Слабые сигналы, поступающие с ТCR, не способны поддерживать биогенез рибосом, что напрямую связано с их способностью продуцировать IL-2 и, таким образом, поддерживать избыток белка Мус, важного фактора транскрипции. Данные показывают, что Т-клетки динамически реагируют на стимуляцию ТCR, регулируя сборку и доступность функциональных рибосом в клетке, что оказывает влияние как на глобальную, так и на специфическую трансляцию белка и способность к пролиферации (Tan T.C. et al., 2017).

### **1.1.5. Дифференцировка и созревание Т-лимфоцитов**

Популяция лимфоцитов преимущественно состоит из лимфоцитов тимуса (Т-лимфоцитов), костного мозга (В-лимфоцитов) и клеток естественных киллеров (NK-клеток). В тимусе МНС-I- и МНС-II-селективные тимоциты, в конечном итоге, по завершении процесса созревания, приобретают CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> одноположительные (CD8 SP) и CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> одноположительные (CD4 SP) поверхностные фенотипы, соответственно. Что еще более важно, эти тимоциты CD8 SP и CD4 SP стремятся стать функционально отличными эффекторными подгруппами, то есть цитотоксическими и хелперными Т-клетками соответственно (Singer A. et al., 2008).

Исторически две модели были предложены для объяснения того, как паттерны экспрессии корцепторов CD4 и CD8 коррелируют с классом МНС  $\alpha\beta$ TCR на тимоцитах, а также с выбором хелперной / цитотоксической линии (Gerard C. et al., 2019). Первая модель предполагала, что различия в сигналах ТCR

активируют четкую генетическую программу, приводящую к активации гена Cd4 или Cd8 (Taniuchi I., 2018). Другая модель, названная стохастической/селекционной моделью, предполагает, что экспрессия корцептора CD4 или CD8 случайна, и что выбираются тимоциты, экспрессирующие корцепторы, которые соответствуют специфичности их TCR для типов MHC (Littman D.R., 2016). На сегодняшний день создана модель эпигенетической регуляции разделения CD4 и CD8 (рисунок 2).



**Рисунок 2.** Модель дифференцировки Т-клеток.

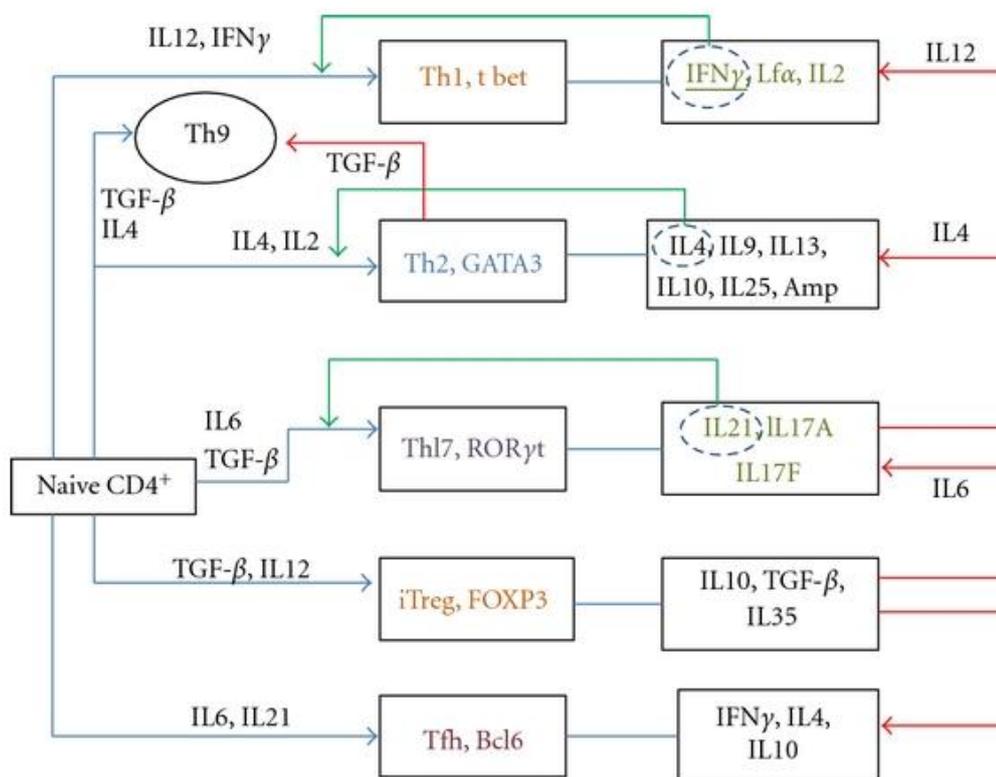
Сокращения: CTL - цитотоксический Т-лимфоцит; DN - двойной отрицательный; DP - двойной положительный, SP - один положительный; Sth - ThPOK глушитель (по Taniuchi I., 2018).

С тех пор исследования, направленные на раскрытие молекулярных механизмов, регулирующих экспрессию генов, кодирующих корцепторы CD4 и CD8, позволили выявить важные цис-регуляторные элементы в этих локусах. За этими результатами последовала идентификация транскрипционных факторов, которые участвуют в регуляции генов Cd4 и Cd8, а также в разделении хелперных и цитотоксических линий Т-клеток. Наряду с успехами в понимании эпигенетической регуляции, в 2000-х годах стала доступной информация о том, как стабильно наследуется экспрессия гена Cd4 (Issuree P.D. et al., 2017). В середине

2010-х годов была обнаружена пластичность, обеспечивающая цитотоксическую функцию Т-клеток хелперного происхождения (Cheroutre H. et al., 2013).

Наивные  $CD4^+$  Т-клетки активируются после взаимодействия с комплексом антиген-МНС и дифференцируются в специфические подтипы, в основном, зависящие от цитокиновой среды в микроокружении. Помимо классических Т-хелпера 1 (Th-1) и Th-2, были идентифицированы и другие субпопуляции, включая Th-17, регуляторные Т-клетки, фолликулярные Th и Th-9, каждый из которых имеет характерный профиль цитокинов.

Для дифференциации определенного фенотипа необходим набор сигнальных путей цитокинов в сочетании с активацией специфичных для клонов факторов транскрипции и эпигенетических модификаций в соответствующих генах. Эффекторные функции этих клеток опосредуются цитокинами, секретируемыми дифференцированными клетками (рисунок 3) (Luckheeram R.V. et al., 2012).



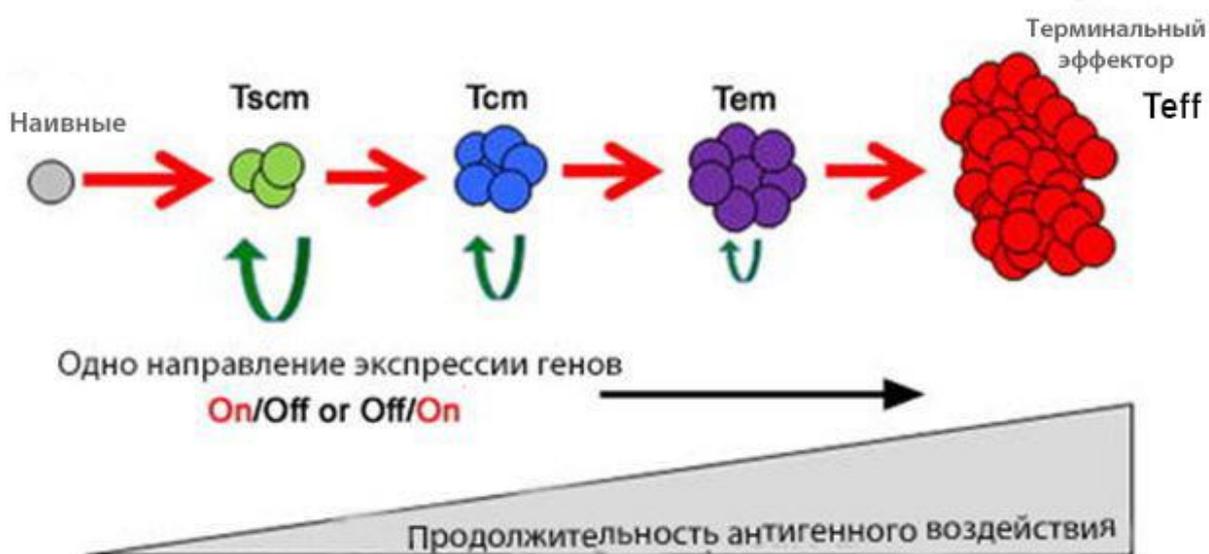
**Рисунок 3.** Влияние различных цитокиновых сред на дифференцировку  $CD4^+$  Т-клеток. Синие стрелки показывают дифференцировку наивных клеток в присутствии определенных цитокинов. Зеленые стрелки представляют фазу самоусиления окружающими цитокинами. Пластичность подмножества Т-клеток под влиянием специфического цитокина представлена красными стрелками

Сокращения: TGF- $\beta$  - Трансформирующий ростовой фактор - бета, Amp – аденозин монофосфат, GATA - Эритроидный фактор транскрипции, ROR – ретиноид ассоциированный рецептор, t bet - T-box транскрипционные факторы, (по Luckheeram R.V. et al., 2012).

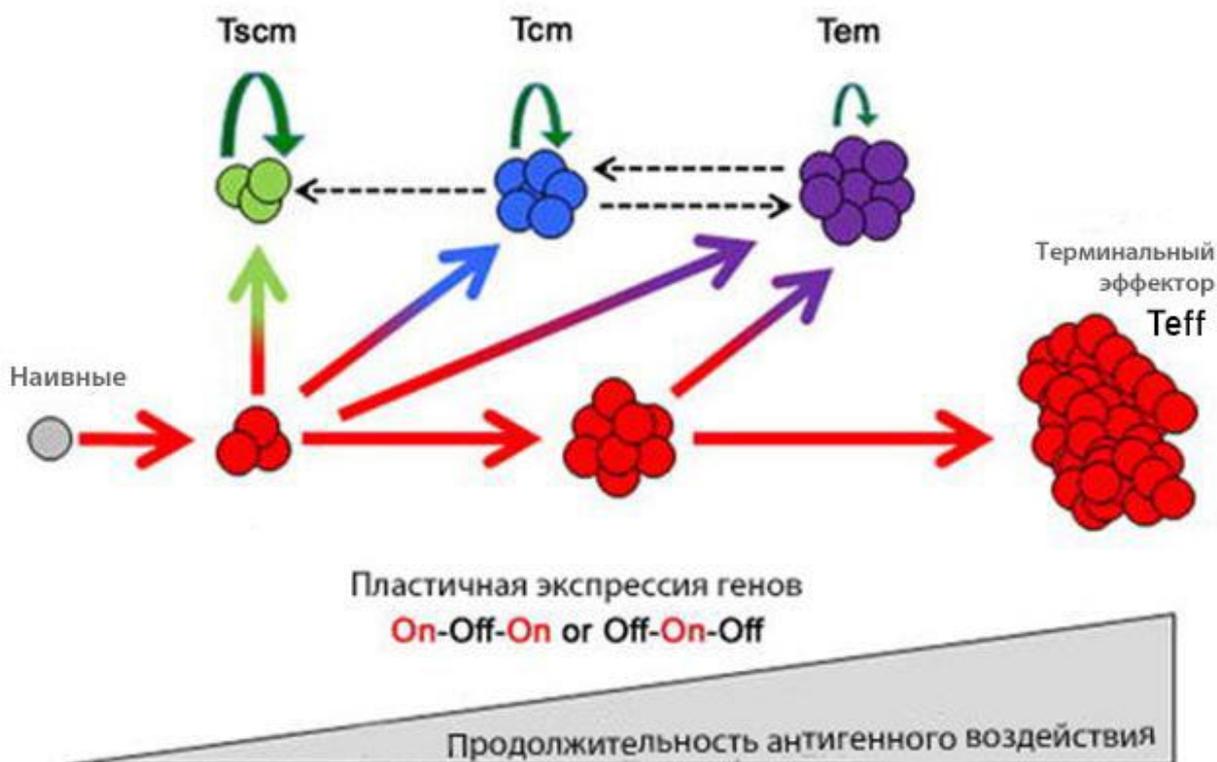
В условиях *in vitro* естественные Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> не пролиферируют, но подавляют пролиферацию и активацию других субпопуляций Т-лимфоцитов. Поэтому предполагают, что их основная функция состоит в ограничении активации CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (Железникова Г.Ф., 2011). *In vitro* установлено, что Treg приобретают способность к пролиферации после стимуляции их Толл-подобных рецепторов (TLR)-лигандами микроорганизмов. Супрессорная активность Treg, как выяснилось, теснее всего связана с наличием молекулы внутриклеточного фактора транскрипции FOXP3 (forkhead box P3), вовлеченного в иммунные реакции (Ярилин А.А., 2010). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3 Treg расселяются из тимуса в периферические лимфоидные органы, выполняя свою роль по сохранению иммунного гомеостаза, начиная с самого раннего периода постнатального онтогенеза.

Число циркулирующих наивных Т-клеток ограничено, но при обнаружении родственного им антигена, наивные CD8<sup>+</sup> Т-клетки подвергаются клональной экспансии, увеличивая их количество примерно в 105 раз (Blattman J.N. et al., 2002). Во время этой высокопролиферативной фазы иммунного ответа клетки приобретают способность экспрессировать эффекторные молекулы, включая IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , перфорин (Prf) и гранзимы, поскольку они подвергаются эффекторной дифференцировке. Как только концентрация антигена падает, 90–95% антигенспецифических эффекторных клеток погибают, а выжившие клетки превращаются в пул долгоживущих Т-клеток памяти (рисунок 4).

## (А) Дифференцировка память в эффектор



## (Б) Дифференцировка эффектор-в-память



**Рисунок 4.** Модели генерации CD8 эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти. Схемы (А) и (Б) представляют две различные модели прогрессивной дифференцировки Т-клеток памяти. Согласно модели дифференцировки памяти к эффектору (А) подмножества Т-клеток памяти - подобные стволовым клеткам (Tscm), клетки центральной памяти (Tcm) и эффекторной памяти (Tem) возникают на ранних стадиях активации наивных Т-клеток до эффекторной стадии дифференцировки (Teff). Модель

дифференцировки эффектор-в-память (Б) предполагает, что в начале после активации наивных Т-клеток генерируются эффекторские клетки-предшественники памяти, которые приобретают эффекторские функции, но сохраняют потенциал для возникновения подмножеств памяти. В обеих моделях сила и длительность воздействия антигена снижают потенциал памяти клеток. Размер стрелки отражает способность к самообновлению подмножеств памяти (по Dogra P. et al., 2016).

Таким образом, не всегда удастся исследовать реакции клеток *in vivo*, что требует использования методов *in vitro*. Повторяя (симулируя) особенности микроокружения *in vivo*, можно изучить жизнеспособность лимфоцитов, их способность к миграции, пролиферации (бласттрансформация), дифференцировке и созреванию в условиях, приближенных к тканям.

## **1.2. Материалы, имитирующие природное межклеточное вещество (демнерализованный костный матрикс, коллаген, фосфаты кальция, системы золь/гель из природных и синтетических полимеров)**

Преобладающее число морфофункциональных, молекулярно-генетических исследований реакций МНК и Т-лимфоцитов проводится *in vitro* в суспензионных культурах (Hilbert U. et al., 2001; Bohnenkamp H. et al., 2002; Lin Y. et al., 2009), которые, преимущественно, моделируют поведение клеток в жидких средах организма (кровь, отечная жидкость). Тем не менее, кровь является транзитной системой для (хемо)таксиса Т-лимфоцитов в органы и ткани, где они осуществляют морфогенетический "надзор" за процессами физиологической и репаративной регенерации (Тишевская Н.В. и др., 2015). Отечная жидкость (транссудат) или экссудат характерны для некоторых патологических процессов, в частности, для начальных этапов (острой фазы) воспаления, что предполагает опосредованное (через секреторные молекулы) влияние МНК на резидентные клетки органов и тканей.

Для прямого (контактного) регулирования функций стромальных и паренхиматозных клеток Т-лимфоцитам необходимо преодолеть сосудистую стенку и вступить во взаимодействие с межклеточным матриксом. Межклеточный или внеклеточный (экстрацеллюлярный) матрикс (ЭЦМ) представляет собой, как правило, волокнистую структуру, играющую важную структурно-функциональную

роль в регуляции поведения клеток и роста тканей. В современных условиях проектирование искусственных каркасов сосредоточено на воспроизведении функций путем имитации свойств естественного ЭЦМ (Wei G., Ma P.X., 2008). Подражание параметрам ЭЦМ (биомиметическое направление биоинженерии) позволяет целенаправленно влиять на жизнедеятельность клеток и формирование/регенерацию тканей (Ma P.X., 2008).

Общие требования, предъявляемые к материалам, из которых могут быть изготовлены заменители природного ЭЦМ, достаточно стандартны: отсутствие токсичности и выраженных иммунологических реакций, биосовместимость; наличие адгезивной поверхности, способствующей пролиферации и дифференцировке клеток; биодegradация, скорость которой соответствовала бы росту собственной ткани; оптимальный размер пор для пространственного распределения клеток, васкуляризации, а также диффузии питательных веществ и удаления продуктов жизнедеятельности. Существующие материалы, в той или иной степени, отвечающие указанным требованиям, делятся на три группы (Saini M. et al., 2015; Li Q., Mai Y.W., 2017):

- биоорганические (деминерализованный костный матрикс, коллаген, целлюлоза, фибронектин и др.);
- керамические (фосфаты кальция, биоактивные стекла и др.);
- синтетические полимеры (полимолочная кислота, полилактид-полигликолид сополимер, полиангидрид, полиортоэстер и т.п.).

### **1.2.1 Основные классы биоматериалов для моделирования ЭЦМ**

Биоматериалы можно разделить на природные и синтетические. По физико-химическим свойствам это, прежде всего, металлы, керамика, полимеры, углерод и их композиты (Ratner B.D. et al., 2004).

Из множества современных полимерных материалов, используемых для тканевой инженерии, некоторые являются производными природного происхождения, включая коллаген, желатин и хитозан; многие другие получены синтетически, включая, в том числе, полиэтиленоксид (ПЭО), поливиниловый спирт (ПВС), полимолочную кислоту (PLA) и полигликолевую кислоту (PGA) и их сополимеры (PLGA) (Smith I.O., Ma P.X., 2010).

К аутологичным материалам природного происхождения весьма ограничен доступ (например, коллаген); другие не являются полностью соответствующими тканям человека (например, хитозан); не исключен также риск передачи человеческих (аллотрансплантаты) и зоонозных инфекций, например, при использовании гидроксиапатита из бычьих костей.

Синтетические материалы, прежде всего полимеры, широко доступны и активно используются при разработке ЭЦМ для различных применений в тканевой инженерии. PLA, PGA и их сополимеры являются наиболее часто используемыми синтетическими полимерами, которые разлагаются в результате гидролиза в нетоксичные продукты (мономер, аналогичные природным; углекислый газ, вода). В частности, поли (L-молочная кислота) (PLLA) представляет собой синтетический полимер, из которого легко формировать тонкие пленки, микро- и нановолокна, пористые каркасы, трехмерные волокнистые сетки и другие сложные формы, что делает его хорошим кандидатом в качестве материала для изготовления различных скаффолдов (Smith I.O., Ma P.X., 2010). Однако, PLA имплантаты расщепляются и замещаются костной тканью, по данным разных авторов, не ранее, чем через 7 лет после имплантации (Jukkala-Partio K. et al., 2002). По другим данным, винты из полимолочной кислоты находятся в живой кости человека не менее 5 лет, что может провоцировать воспалительную реакцию организма на инородное тело. Во всех динамических наблюдениях не отмечено ни одного случая замещения рассасывающегося имплантата костью в указанные сроки (Поведение имплантатов в костной ткани в различные сроки согласно МРТ-исследованию: электрон. публикация<sup>1</sup>).

ЭЦМ костной ткани представляет собой природный композит, в котором коллагеновые волокна имеют диаметр от 50 до 500 нм. Эти волокна служат основой для отложения кристаллов апатита в процессе минерализации ЭЦМ в период формирования/регенерации кости (Wei G., Ma P.X., 2008). Поэтому современная биоинженерия костной ткани основана на создании и применении биомиметических композитных каркасов, в первую очередь, "металл-керамика", "керамика-полимер". Например, комбинируя полимерные волокна с гидроксиапатитом (ГАП), можно моделировать минерализацию костного ЭЦМ

---

<sup>1</sup> <http://www.lechenie-sustavov.ru/patient/articles/povedenie-implantatov-v-kostnoj-tkani-v-razlichnye-sroki-soglasno-mrt-issledovaniyu/>).

(Smith I.O., Ma P.X., 2010). Однако, биомеханика подобных композитных материалов не соответствует таковой для природной кости.

К материалам, используемым для воспроизведения (симуляции) ЭЦМ разных тканей, предъявляются специфичные, часто противоречащие друг другу, биомедицинские требования из общего набора, включая биосовместимость (биотолерантность, биоинертность, биоактивность), соответствующие физико-химические и биомеханические свойства, способность биодеградировать и замещаться природным ЭЦМ. Искусственный матрикс должен поддерживать клеточные функции, такие как миграция, адгезия, пролиферация, дифференцировка и созревание клеток стромы и паренхимы с помощью своего объема (трехмерные (3D) ЭЦМ), поверхности (двумерные 2D-матрикс) и/или продуктов растворения (при условии биодеградации) (Ratner B.D. et al., 2004). Для улучшения биомедицинских свойств, материалы могут быть функционализированы посредством химической (биотехнологической) обработки объема или поверхности, нанесения покрытий (Roach P. et al., 2007).

Биосовместимость. Определение термина «биосовместимость» постоянно претерпевает изменения (Williams D.F., 2008; Mandrycky C. et al., 2016). В самом общем смысле, биосовместимость может быть определена как способность материала, устройства или системы функционировать необходимое время без выраженной негативной реакции организма-хозяина (del Peso G. et al., 2016).

(Био)механические свойства. Как правило, дизайн искусственного ЭЦМ зависит от природы ткани, подлежащей замене. В идеальном случае имплантат должен соответствовать всем механическим свойствам ткани-мишени и иметь определенную степень функциональности в процессе репаративной регенерации (Agarwal S. et al., 2016). Например, биоматериалы, используемые при регенерации суставных связок, являются вязкоупругими и, таким образом, способствуют сохранению стабильности и сгибанию суставов. Для остеосинтеза (замещения ЭЦМ в костной ткани) требуются, в большей степени, другие механические свойства, такие как жесткость и упругость биоматериалов (Hutmacher D.W., 2000; Thompson M.K. et al., 2016).

Способность/неспособность к биодеградации. В тех случаях, когда биоматериалы несут опорную функцию (например, при полной замене тазобедренного или других крупных суставов), выраженная способность к

биодegradации нежелательна, поскольку может отрицательно сказываться на функциональности биоматериала. Напротив, способность к разложению является желательным свойством в большинстве применений ЭЦМ, когда конечной целью является полная или частичная регенерация ткани (Agarwal S. et al., 2016). Скорость деградации материала должна соответствовать скорости тканевой регенерации (Dhandayuthapani B. et al., 2011).

Биоактивность. Биохимические свойства материалов играют решающую роль в регенерации тканей *in vivo*. При этом биоматериалы соответствующим образом проектируются для стимулирования специфических молекулярных и клеточных реакций. В таких применениях, как имплантаты костной ткани, инертные титановые (Ti) сплавы часто покрывают слоем фосфатов кальция (КФ), чтобы улучшить остеоинтеграцию (Ripamonti U. et al., 2012).

Пористость и шероховатость объема/поверхности являются важным физическим параметром биоактивности в отношении искусственного ЭЦМ для костной ткани. Пористость может достигать и даже превышать 90%, чтобы обеспечить засевание клеток и врастание кровеносных сосудов. Однако, с увеличением пористости любого биоматериала, особенно КФ, значительно снижается его механическая прочность, что может привести к разрушению и механической нестабильности имплантата, что называют "неуспех имплантата" (Nepola J.V. et al., 1996). Поэтому частым материаловедческим решением является придание определенного рельефа (топографии, шероховатости) поверхности, улучшающего ее биомеханическую прочность и биосовместимость для костных клеток (Шаркеев Ю.П. и др., 2014).

#### **1.2.1.1 Биоматериалы природного происхождения и их аналоги, активно применяемые для замещения ЭЦМ кости**

Коллаген является наиболее распространенным белком в организме и обеспечивает прочность и структурную стабильность всех тканей организма, исключая головной и спинной мозг. Наряду с ГАП коллаген является одним из двух основных компонентов ВКМ кости. Он составляет 89% матрикса и 32% объемного состава кости, обладает значительным потенциалом для культивирования клеток *in vitro* и *in vivo*. Обычно комбинируется коллаген (тип I) с гликозаминогликанами, полисахаридами, обнаруженными во многих тканях

организма, и, используя контролируемый процесс сублимационной сушки, производится высокопористый каркас коллаген-гликозаминогликаны (КГ) (Tang D. et al., 2016). Это один из самых первых скаффолдов, разработанных для применения в тканевой инженерии. Он был разработан профессором Иоаннисом Яннасом в Массачусетском технологическом институте и получил одобрение FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) для регенерации кожи у пациентов с ожогами (Yannas I.V. et al., 1989). Данная разработка не утратила значимости до настоящего времени и упоминается в ряде исследований последних лет (Raftery R. M. et al., 2016; Shen X. et al., 2016; Grier W.K. et al., 2017).

Как и у всех природных полимеров, одной из основных проблем использования коллагена в качестве основного компонента каркаса для ортопедической тканевой инженерии является то, что, при хороших упруго-эластических свойствах, он обладает недостаточной устойчивостью к деформации (O'brien F.J., 2011). Тем не менее, есть исследования, которые продемонстрировали, что механические свойства при сжатии и растяжении каркасов из коллагена и КГ можно улучшить с помощью физических и химических методов поперечной сшивки (Fernandez-Yague M.A. et al., 2015; Cunniffe G.M. et al., 2016).

Несмотря на то, что КГ каркасы продемонстрировали огромную перспективу восстановления кости в областях тела с минимальной нагрузкой, для облегчения восстановления областей, где каркасы подвергаются более высокому уровню нагрузки, они были усилены путем введения керамической фазы на основе коллагена и КФ (Fernandez-Yague M.A. et al., 2015; Lin H. et al., 2019). Таким образом, была разработана серия высокопористых биомиметических коллаген-гидроксиапатитовых каркасов на основе двух основных компонентов кости. В то же время, широкое распространение подобных композитов ограничено, прежде всего, объемными дефектами кости вне активных нагрузок на изгиб, сдвиг, сжатие и растяжение. Кроме того, вопросы стерилизации и хранения медицинских изделий на основе коллагена гораздо сложнее таковых для композитов "металл-КФ".

Вследствие высокой биосовместимости, биологической активности, нетоксичности и неиммуногенности гидроксиапатит  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  широко применяется в медицинских целях (Ratnayake J.T. et al., 2017). Аналоги природного ГАП и покрытия на его основе получают многими методами: ультразвуковое

облучение (Haider A. et al., 2017), синтез при помощи эмульсионной жидкостной мембраны (Bahloul L. et al., 2014), метатезис, опосредованный микроволновым излучением (Kalita S.J., Verma S., 2010), ускоренное облучение в микроволновой печи (Zhou H., Lee J., 2011), радиочастотная тепловая плазма, химическое осаждение, микроэмульсия и гидролиз (Barakat N.A. et al., 2009). Процессы синтеза ГАП, согласно "зеленой химии", могут быть сложными, биологически небезопасными с точки зрения отходов производства, поэтому были разработаны методы извлечения ГАП из животных источников (Shi P. et al., 2018; Bee S.L., et al. 2019; Lalzawmliana V. et al., 2019), биологических отходов, которые экономически и экологически оправданы (Barakat N.A. et al., 2009). Однако, степень сродства подобного ГАП весьма далека от его молекул в скелете человека.

ГАП содержит только ионы кальция и фосфата, и поэтому ни в одном исследовании не сообщалось об его неблагоприятной локальной или системной токсичности. При имплантации новообразованная кость связывается непосредственно с ГАП через слой апатита на границе между костью и имплантатом (Dorozhkin S.V., 2012). Поверхность ГАП поддерживает адгезию, рост и дифференцировку мезенхимных стволовых клеток (МСК) и остеобластных клеток. Скаффолды ГАП также могут служить в качестве средств доставки для цитокинов, способных связывать и концентрировать костные морфогенетические белки (BMPs) *in vivo* (García-Gareta E. et al., 2015).

Исследования остеоиндуцирующей активности ГАП относительно других групп остеиндуцирующих материалов, таких как трикальцийфосфат (ТКФ), двухфазный фосфат кальция (ГАП /  $\beta$ - ТКФ) показали, что ГАП является наиболее биоинертным и наименее растворимым материалом ( $K_{sp}$  (коэффициент растворения в воде)  $\approx 6,62 \times 10^{-126}$ ). В некоторых исследованиях было обнаружено, что он достигает определенной остеоиндуктивности из-за своей низкой скорости растворения (Hong Y. et al., 2010; Wang Z. et al., 2012; Wang J. et al., 2014).  $\beta$ -ТКФ обладает отношением Ca/P=1,5 и значением  $K_{sp} 2,07 \times 10^{-33}$  при 25 °C, что способствует его растворению в большей степени, чем ГАП, но приводит к быстрой биодеградации и низкой износостойкости (Yuan H. et al., 2001). Следовательно, композитная смесь, состоящая из плохо растворимого ГАП и высокорастворимого  $\beta$ - ТКФ с различными соотношениями  $\beta$ - ТКФ/ГАП, считается оптимальной. Вместе с тем, тенденция КФ материалов к

остеоиндуктивности может быть представлена как дикальцийфосфат (ДКФ) >  $\beta$ -ТКФ > ГАП >>  $\alpha$ -ТКФ (Hong Y. et al., 2010; Wang Z. et al., 2012; Wang J. et al., 2014; Tang Z. et al., 2018).

### **1.2.1.2. Синтетические биоматериалы, активно применяемые в качестве заменителя ЭЦМ кости**

В воспроизведении физико-химических и механических свойств ЭЦМ биологических тканей достигнуты реальные технологические успехи (Ratner B.D. et al., 2004) на основе различных классов биоматериалов и их композитов. Механотрансдукция, изучающая реакции клеток на топографию и жесткость искусственных матриц, является одной из наиболее активно развивающихся областей тканевой биоинженерии (Ermiş M. et al., 2018).

**Металлы** традиционно и давно используются в хирургических приложениях (травматология и ортопедия, дентальная имплантология, челюстно-лицевая хирургия). Наиболее часто используемые материалы для хирургических приложений включают нержавеющую сталь (SS), сплавы на основе кобальта и хрома (Co-Cr), титан (Ti) и его сплавы (Navarro M. et al., 2008).

Имплантаты на основе Ti и его сплавов обладают высокой коррозионной стойкостью по сравнению с материалами на основе SS и системы Co-Cr (Okazaki Y., Gotoh E., 2005). Это связано с эффектом "самопассивации" его поверхности, обусловленной высокой способностью Ti вступать в химические реакции с кислородом с образованием тонких пленок (толщиной порядка 1-2 мкм) оксидов титана, обладающих, в свою очередь, биоинертностью. Тем не менее, "чистый" Ti (российская маркировка ВТ1.0) не имеет достаточной прочности для фиксации переломов костей. Сплавы Ti, такие, как Ti6Al4V(ВТ6) содержат небольшие (легирующие) добавки других металлов например, алюминий (Al) и ванадий (V) и неметаллических легирующих элементов и разработаны для улучшения механических свойств подложки. Однако, ионы V и Al, высвобождаемые при деградации Ti сплавов, являются цитотоксичными в довольно низких концентрациях и при длительном нахождении имплантатов в организме могут вызывать его интоксикацию (Geetha M. et al., 2009). Чтобы преодолеть эти ограничения, были синтезированы и изучаются такие сплавы, как Ti6Al7Nb и

Ti5Al2.5Fe, которые включают менее токсичные для организма ниобий (Nb) и железо (Fe) взамен V (Niinomi M., 2008).

**Керамика** - это группа разнородных материалов, которые нашли широкое применение в ортопедии и стоматологии. Биомедицинская керамика претерпела значительную эволюцию потребительских свойств: материалы первого поколения были разработаны для замены кости; материалы второго поколения были предназначены для восстановления кости и функционируют по типу скаффолда; материалы третьего поколения проектируются для полноценной регенерации кости (Vallet-Regí M., Ruiz-Hernández E., 2011). Наиболее распространенные керамические материалы для биоинженерии костной ткани включают биоактивные фосфаты кальция, диоксид кремния (например, Bioglass 45S5s), а также биоинертные соединения на основе оксидов алюминия и циркония.

Кальцийфосфатные (КФ) материалы являются остеокондуктивными, т.е. способствующими продвижению костной ткани, и могут обладать широким спектром физических и химических свойств (Vallet-Regí M., González-Calbet J.M., 2004; LeGeros R.Z., 2008). Широко известными синтетическими КФ являются ГАП, β-ТКФ и двухфазный фосфат кальция (различные соотношения ГАП и ТКФ), поскольку минеральная часть кости состоит, преимущественно, из этих двух форм фосфатов кальция. Тем не менее, как модель ЭЦМ кости, объемные биоматериалы на основе КФ являются хрупкими, имеют ограниченное применение для заполнения дефектов костной ткани в виде блоков, гранулятов и порошков. Более продвинутыми в плане практического применения при остеосинтезе переломов можно считать КФ покрытия как на металлах, так и на композитных материалах, сочетающих биоактивность и способность к биодеградации КФ с механической прочностью металлов (Narayanan R. et al., 2008; Jimbo R. et al., 2011; Vallet-Regí M., Ruiz-Hernández E., 2011).

**Биостекло.** Полученное из расплава биоактивное силикатное стекло (торговая марка Bioglass 45S5s) является представителем группы биостекол (Hench L.L., 2006) и представляет собой неорганическую модифицированную сетку из диоксида кремния, состоящую из 45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% Na<sub>2</sub>O, 24,5% CaO и 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Благодаря своей способности химически связываться с окружающей нативной тканью, этот материал способствует превосходному восстановлению ЭЦМ кости (Hench LL., 2006; Vallet-Regí M., Ruiz-Hernández E., 2011) и не вызывает

образования фиброзной капсулы вокруг имплантата. Вследствие активации (био)химических процессов, гистологическая оценка выявляет частичную деградацию, фрагментацию и инвазию соединительной ткани в имплантат (Bahmad Jr.F., Merchant S.N., 2007).

Золь-гель технология позволяет получать биоактивные стекла, которые, в отличие от полученного из расплава Bioglass 45S5s, способны полностью деградировать *in vivo* (Li R. et al., 1991; Nandi S.K. et al., 2009). В частности, композиция  $70\text{SiO}_2 / 30\text{CaO}$  (мол.%), с добавкой  $\text{P}_2\text{O}_5$  или без дополнительных соединений, в настоящее время является популярным материалом третьего поколения для регенеративной медицины (Hench LL., 2006). Золь-гель кварцевые стекла производятся в широком спектре размеров и форм (каркасы, пены, порошки, наночастицы и т.д.) для широкого спектра ортопедических и стоматологических применений. Проблема в том, что структура пены из биостекла приближается к структуре губчатой кости, однако, исследования демонстрируют хрупкость и недостаточную прочность (относительно губчатой кости) ЭЦМ из биостекла до и после имплантации (Chen Q.Z. et al., 2006).

**Глинозем.** Глинозем ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), как биоинертный материал с высокой стойкостью на износ, широко применяется в производстве искусственных протезов для эндопротезирования тазобедренного и коленного суставов с 1970-х годов (Jeffers J.R.T. et al., 2012). Мелкозернистый диоксид алюминия является материалом для изготовления искусственных головок тазобедренной кости, т.к. дает технологическую возможность достигнуть практически идеальной сферической поверхности, хорошо смазываемой суставной жидкостью, что обеспечивает минимальное трение с искусственной чашкой тазовой кости и снижает износ материала при трении (Hannouche D. et al., 2011). Несмотря на широкое использование глинозема в ортопедических приложениях, диоксид алюминия, как и все керамические материалы, могут страдать от сколов и разрушения при ударной нагрузке.

### **1.3.1 Особенности поведения иммунокомпетентных клеток в трехмерных культурах *in vitro***

Тестирование *in vitro* на клеточных культурах рассматривается как важнейший инструмент доклинических испытаний фармацевтических и

биотехнологических субстанций, медицинских изделий и клеточных препаратов. Стандартная тест-система в двумерной (2D) стационарной культуре клеток в многолуночных планшетах не соответствует условиям реального организма, так как по многим параметрам отличается от естественного микроокружения клеток *in situ* и *in vivo* (Sung J.H., Shuler M.L., 2009).

Физиологическое микроокружение для стволовых клеток возможно воспроизводить *ex vivo* с помощью его трехмерной (3D) реконструкции. В 1964 году A.S. Curtis и M. Varde предположили (Curtis A.S.G, Varde M., 1964), а в 1997 – доказали важнейшую роль топографии геометрии поверхности ЭЦМ в детерминации клеточного поведения (Curtis A.S.G, Wilkinson C., 1997). Отмечается значение 3D-организации ЭЦМ для воспроизведения физиологических условий для клеток *ex vivo* (Dellatore S.M. et al., 2008). Между 2D- и 3D-культурами клеток обнаружены существенные различия (Birgersdotter A. et al., 2005).

В настоящее время физиологические условия создаются также в результате модификации структурных и функциональных факторов ЭЦМ – гидродинамики (биореакторы различного типа, микрофлюидная техника), транспорта питательных веществ и газов, микро- и нанотопографии внеклеточного матрикса (Sniadecki N.J. et al., 2006; Sung J.H., Shuler M.L., 2009). Комбинация традиционной стационарной культуры клеток с микрогеометрической модификацией поверхности и объема культуральной посуды позволила разработать новую технологию – «клетки на чипе» (*cells-on-a-chip*), когда одновременно культивируются несколько клеточных линий и становится возможным изучать их взаимодействие (El-Ali J. et al., 2006). При этом параметры искусственных микроразмерных систем еще далеки от естественного ЭЦМ биологических тканей.

Хотя 2D-культуры дают очень полезную информацию о клеточной биологии (Matic J. et al., 2013; Guasch J. et al., 2017), их использование неизбежно вносит артефакты в естественное поведение клеток из-за адаптации к плоским пластиковым поверхностям (Knight E., Przyborski S., 2015), свойства которых отличаются от 3D среды *in vivo*. Разработка подходящих трехмерных условий для культивирования клеток важна не только для клеточной биологии, она приносит пользу для продвижения методов тканевой инженерии, которая направлена на регенерацию тканей или создание моделей исследования посредством взаимодействий клетка-материал.

В частности, анализ поведения клеток, контактирующих с биорезорбируемым 3D-коллагеновым матриксом, показал увеличение числа цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток по сравнению с суспензионной (на пластиковой поверхности культуральных сосудов) 2D-культурой лимфоцитов. Подобные изменения в 3D-культуре клеток наблюдались во всех образцах крови, взятых в исследование, независимо от исходного иммунного статуса доноров (Rusu D. et al., 2019). При этом коллагеновый матрикс не вызывал значимой апоптотической гибели Т-клеток. Более того, относительное содержание жизнеспособных и мертвых клеток было одинаковым в 2D- и 3D-культурах (Rusu D. et al., 2019).

Другими словами, коллагеновый матрикс нетоксичен для иммунокомпетентных клеток и не препятствует процессу заживления и регенерации после операции. Дальнейшие исследования должны быть направлены на рассмотрение совместимости коллагенового матрикса с другими важными участниками процессов регенерации внутренних органов. Например, клетками, принадлежащими к эпителиальному компартменту. Увеличение длительности периода заживления и/или хроническое воспаление могут инициировать или способствовать прогрессии опухолевых процессов (Pobezinsky L.A. et al., 2012; Melichar H.J. et al., 2013).

Клетки способны определять химические и механические свойства окружающей среды и реагировать на них (Guasch J. et al., 2016; Li Y et al., 2017), вызывая, например, фосфорилирование или дефосфорилирование тирозина, связывание специфических молекул или морфологические изменения (Geiger B. et al., 2009). Активация Т-клеток происходит во вторичных лимфоидных органах после взаимодействия антигенпрезентирующих клетками. Эти органы имеют очень сложную и плотно упакованную структуру со специфическими механическими и химическими характеристиками (Cupedo T. et al., 2012), которые позволяют клеточной плотности быть на 3 порядка выше, чем в суспензионных клеточных культурах. В связи с этим, были разработаны скаффолды на основе гидрогелей, которые оптимально сочетают биосовместимость, жесткость, пористость и способность к функционализации для имитации параметров ЭЦМ (Knight E., Przyborski S., 2015).

По данным литературы, основные исследования гидрогелей направлены на анализ инвазивности и способности клеток к миграции. Результаты показали, что

миграция Т-клеток зависит, в том числе, от секреции матриксных металлопротеиназ (ММР), наличия ингибиторов ММР (Leppert D. et al., 1995).

Миграция опухолевых клеток Т-лимфобластомы также зависит от секреции ими ММР. В частности, IL-2 приводил к увеличению продукции ММР, что позволяло активировать клетки к миграции через плотный матриксель. Желеобразные полимерные каркасы интересны в качестве матрицы для 3D клеточных культур из-за их разнообразия и технологий изготовления, таких как эмульсионная полимеризация, разделение фаз, электроспиннинг, или 3D печать (Perez del Rio E. et al., 2018). Данные методы позволяют изготавливать каркасы с контролируемыми размерами и пористостью, важными характеристиками для системы культивирования клеток. Учитывая, что обработанный плазмой полистирол является повсеместным материалом для стандартной 2D-культуры клеток, неудивительно, что объемные полистирольные каркасы были разработаны для использования в качестве 3D-систем для культивирования клеток (Baker S.C. et al., 2006).

Гидрогели воссоздают 3D-структуру, которая не позволяет клеткам расплываться, поддерживает их сферическую форму и, в то же время, сохраняет подвижность (Lämmermann T., Germain R.N., 2014). Подобный режим клеточной миграции сопровождается низкой адгезией с компонентами ЭЦМ. Тем не менее плотная сетка гидрогеля, состоящая из белков и факторов роста, играет роль в эпигенетическом контроле процессов пролиферации (Perez del Rio E. et al., 2018).

Другим фактором контроля клеточной судьбы является крупная пористость. Так, 3D-каркас из полистирола, описанный в статье (Baker S.C. et al., 2006), имел поры с диаметром 400 мкм и способствовал пролиферации клеток лимфомы. Таким образом, коммерческие желеобразные 3D-системы обладают большим потенциалом для сокультивирования с различными типами клеток в качестве модельных систем для изучения их физиологического и патологического поведения, в частности, экспансии Т-клеток (Perez del Rio E. et al., 2018).

Активно ведутся исследования реакции Т-клеток и с «классическими» материалами (металлы и их сплавы, керамика, углерод, полимеры и их композиты) в 3D системах культивирования с различной поверхностной обработкой материала (Longo G. et al., 2016). Установлено, что изменение топографии поверхности и объема приводит к усилению контакта кости с имплантатом и увеличению

(био)механического сцепления с костью *in vivo* (Buser D. et al., 2017; Rupp F. et al., 2018). Многочисленные исследования *in vitro* или *in vivo* сосредоточены на влиянии механической или химической модификации поверхности имплантата (например, пескоструйная обработка, травление, плазменное напыление, нанесение КФ покрытия и т. д.) на адгезию клеток и формирование понимания долгосрочного взаимодействия имплантата с клетками и тканями в процессе остеоинтеграции (Duraccio D. et al., 2015).

Однако, разнообразные варианты модификации поверхности значительно затрудняют анализ сопоставимости результатов (Ong J.L., Chan D.C., 2000). Например, не все модификации поверхности образцов титана (Ti) приводят к значительным изменениям пролиферации клеток (Ponsonnet L. et al., 2003; Boyan B.D. et al., 2016).

В настоящее время реальным, используемым в клинике (Moroni A. et al., 2001; Шаркеев Ю.П. и др., 2014), искусственным аналогом естественного ЭЦМ являются КФ материалы и покрытия, имитирующие минеральную часть кости и способствующие регенерации костной и кроветворной тканей (Хлусов И.А. и др., 2005), позволяющие управлять *in vitro* поведением МСК (Khlusov I.A. et al., 2018), и способствовать *in vivo* 3D-ремоделированию системы кость/костный мозг (Khlusov I.A. et al., 2018a).

В последние годы сформировалась и развивается новая концепция, получившая название "остеоиммунология" (Arron, J.R., Choi Y., 2000; Greenblatt M.B., Shim J.H., 2013), в которой моделирование и изучение взаимодействия клеток с костным ЭЦМ проводится с использованием композитных 3D-материалов (Murr L.E., 2019).

Большая часть литературы показывает положительное влияние ГАП покрытия на пролиферацию клеток (Allo B.A. et al., 2012; Albertini M. et al., 2015). При этом, отходя от восторженности свойствами ГАП, исследователи все чаще отмечают противоречивость его клеточных/тканевых эффектов в зависимости от происхождения (биологический, синтетический), химического состава и/или кристалличности (Albertini M. et al., 2015; Rana D. et al., 2016).

Важнейшим показателем степени взаимодействия клеток с искусственными материалами является их функциональная (ферментативная, секреторная и т.п.) активность. Так, в исследовании V. Peššková и соавт. (2007) проведена оценка

концентраций цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-8) и пролиферативной активности при сокультивировании с трехмерными шероховатыми подложками. Наибольшая секреция провоспалительных цитокинов при наименьшей пролиферации наблюдалась на поверхностях с большей шероховатостью (Peššková V. et al., 2007), что говорит об ускорении созревания и функциональной активности клеточной системы, обусловленным выраженным рельефом поверхности.

Согласно литературным данным, разные виды имплантатов, разные виды модификации их поверхности провоцируют различные клеточные реакции. В связи с этим, изучение морфофункциональных свойств и поведения Т-лимфоцитов в тканях, их взаимодействие с ЭЦМ, с паренхимой органов и тканей, а также с твердыми шероховатыми поверхностями имплантатов, является актуальным вопросом современности.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Двумерная (2D) культура клеток до сих пор является наиболее распространенной *in vitro* испытательной платформой изучения клеточных реакций. Однако, имеется множество доказательств, что экстраполировать результаты исследований 2D не всегда удается, например: модель неадекватно имитирует естественный ЭЦМ (Janeway, C.A., et al. 2005); ингибирует дифференцировку клеток из-за ограниченных взаимодействий клеток (Cukierman et al., 2002). Поэтому в мире активно разрабатываются системы, позволяющие культивируемым клеткам приобрести или сохранить их естественную морфологию и структуру (3D-культуры). Одним из примеров таких культур является сокультивирование имплантатов с клетками (Sul et al. 2002; Sul et al. 2009), поскольку важно изучать их влияние на жизнедеятельность клеток, участвующих в процессах регенерации, следовательно, и в жизнеобеспечении всего организма (Vallee et al. 2014; Lavenus et al. 2015; Ogino et al. 2015). В связи с этим, множество исследований направлено на модулирование поверхностного рельефа имплантата (Sul et al., 2009), где проходит граница живой/неживой материи и происходят большинство клеточных реакций между имплантатом и организмом.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объект и материал исследования

В основу работы положены результаты исследования *in vitro* культуры лейкоцитов крови 20 условно здоровых доноров (в возрасте от 22 до 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. Материалом для исследования явились мононуклеарные клетки, полученные из периферической крови условно здоровых доноров. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете (№5 от 16 мая 2016 г.). Экспериментальные исследования проведены в Центре иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета (БФУ) им. И.Канта (директор – д-р мед. наук Л.С. Литвинова).

#### 2.1.1 Характеристика трехмерных матриц для биологического тестирования

Для экспериментального 3D-моделирования клеточных и гуморальных реакций иммунокомпетентных клеток крови были использованы 3D-матрицы, несущие рельефное КФ покрытие с индексом шероховатости поверхности  $R_a$  (по ГОСТ 2789-73) в диапазоне 2-5 мкм. При таком индексе шероховатости искусственного матрикса размер впадин в поверхности соответствует блюдцеобразным углублениям (до 40 мкм) (Риггз Б.Л., Мелтон III Л. Дж., 2000), образуемым остеокластами в кости при ее регенерации. Физические параметры покрытия представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Физические параметры кальцийфосфатной поверхности 3D-матриц для биологического тестирования, Me[ $Q_1$ ;  $Q_3$ ]

$R_a$ , мкм	Масса, мг	Толщина, мкм
3,04 [2,71; 3,80] n=12, n <sub>1</sub> = 120	6,45 [5,80; 12,90] n=12, n <sub>1</sub> = 36	25,0 [23,0; 52,0] n=12, n <sub>1</sub> = 36

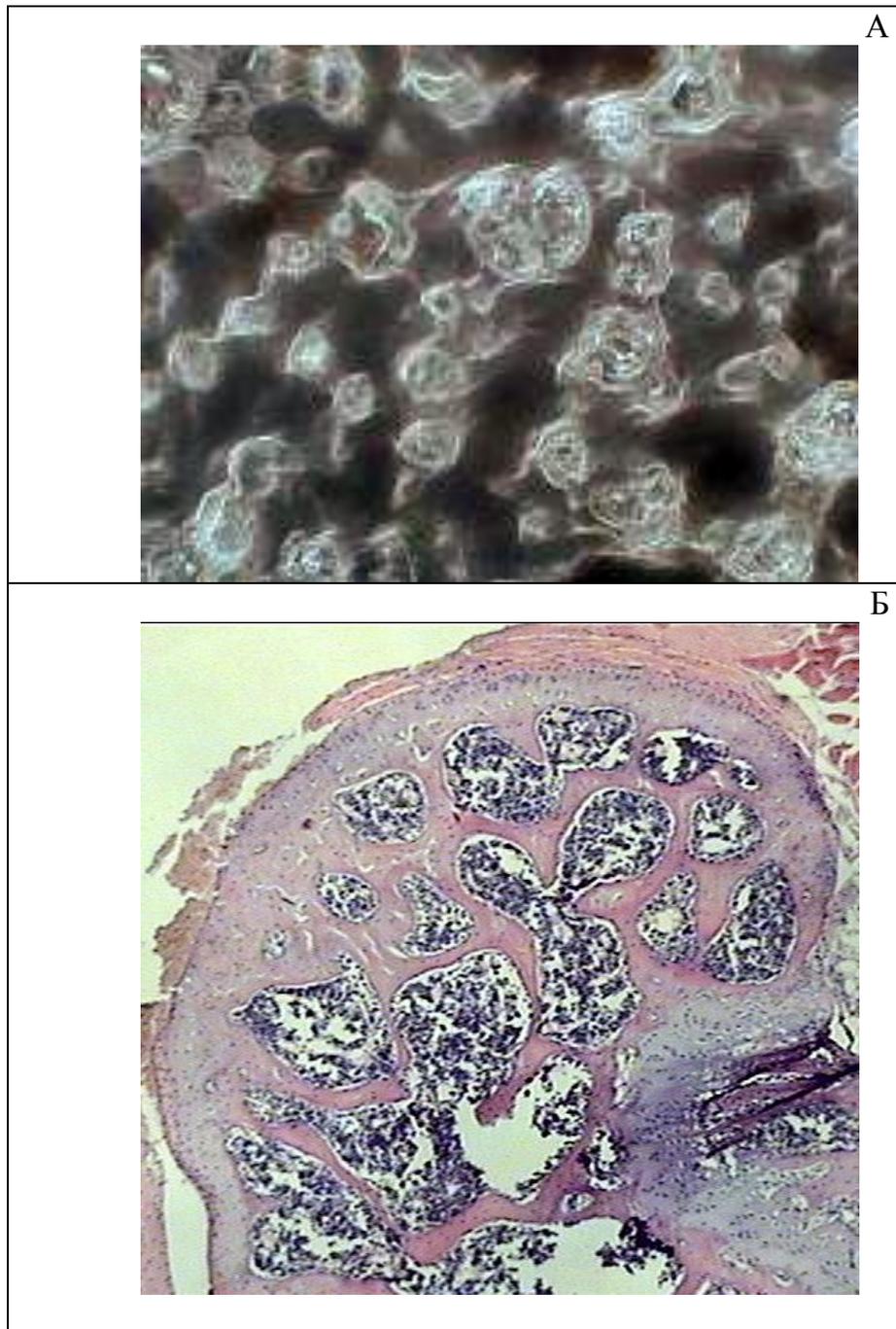
Примечание: n – число использованных образцов; n<sub>1</sub> – число измерений.

Экспериментальные образцы 3D-мактриксов изготовлены в Институте физики прочности и материаловедения СО РАН (г. Томск). Двустороннее микродуговое КФ покрытие формировали на титановых подложках ( $10 \times 10 \times 1$  мм<sup>3</sup>) 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) с использованием установки Microarc-3.0 (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, ИФПМ СО РАН, г. Томск) в анодном режиме как описано ранее (Khilusov I.A. et al., 2018). Электролит состоял из водного раствора ортофосфорной кислоты (20 мас. %), карбоната кальция (9 мас. %) и синтетического гидроксиапатита (6 мас. %). Порошок синтетического гидроксиапатита (ГАП)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  с диаметром частиц 40 – 100 нм получен механохимическим способом (Chaikina M.V. et al., 2008).

Исследование элементного состава поверхности образцов осуществляли на сканирующем электронном микроскопе Quanta 200 ESEM FEG с EDX-анализатором элементного состава (FEI, Нидерланды; Томский материаловедческий центр коллективного пользования при ТГУ). Элементный состав КФ покрытий на титане варьировался в следующих диапазонах: Ca (6.6–11.4 атомных %), P (17.4–21.1), O (52.0–62.2), Ti (12.3–17.8). Рентгенофазовый анализ (дифрактометр Shimadzu XRD-7000, Япония; ЦКП "Нанотех", ИФПМ СО РАН) показал на дифрактограммах покрытий фазы бета-кальцийпирофосфата ( $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) и монетита ( $\text{CaHPO}_4$ ).

Толщину покрытий измеряли по микрофотографиям их кросс-секций, полученных при сканирующей электронной микроскопии (SEM; LEOEVO 50, Zeiss, Германия; ЦКП "Нанотех", ИФПМ СО РАН), массу - путем взвешивания подложек до и после нанесения покрытия на электронных весах GR-202 (AND, Япония). Морфологию и топографию КФ покрытия изучали с помощью отражающего металлографического оптического микроскопа Olympus GX-71 с цифровой камерой Olympus DP 70 (Olympus Corporation, Япония; Томский материаловедческий центр коллективного пользования при ТГУ).

Согласно оптической отражающей микроскопии, топография КФ покрытия представлена сообщающимися каналами, формирующими углубления между сферолитами, имеющими диаметр 10-20 мкм (рисунок 5).



**Рисунок 5** - Оптические фотографии: (А) типичного микрорельефа кальцийфосфатного покрытия на титане. Представлены светлые сферолиты, разделенные темными каналами и углублениями; (Б) среза головки бедренной кости мыши. Представлены костные балки, разделенные лакунами с красным костным мозгом. Увеличение  $\times 1000$  (А) и  $\times 100$  (Б).

Топография КФ поверхности (рисунок 1А) имитирует в микромасштабе рельеф активно регенерирующей губчатой костной ткани, лакуны которой заполнены клетками костного мозга и крови (рисунок 1Б). При этом состояние поверхности микродугового КФ покрытия соответствует биологически активному

диапазону их рельефа для *in vivo* дифференцировки мезенхимных стволовых клеток в остеобласты (Gnedkov S.V. et al., 2011).

Таким образом, условия культивирования лейкоцитов приближены к таковым *in vivo*, когда клетки крови мигрируют в участки костного ремоделирования, что позволяет на модели *in situ* исследовать новые закономерности функционирования клеточного звена иммунитета в условиях прямого контакта с регенерирующей костной тканью.

Образцы стерилизовали автоклавированием LAC-5101P (BMG Labtech, Германия) при 121°C, 0,5 атм. в течение 45 минут.

## 2.2. Методы исследования

В соответствии с поставленной целью и задачами исследования, был разработан протокол экспериментального блока, позволяющий оценить реакцию МНК, полученных от здоровых доноров, на сокультивирование с 3D-матриксами, имитирующими минеральное вещество регенерирующей костной ткани. В связи с возможностью *in vitro* моделирования взаимоотношений иммунокомпетентных МНК и 3D-матрикса в условиях его имплантации в организм, были разработаны протоколы гомеостатической и активационной моделей культивирования:

- Гомеостатическая модель предполагает *in vitro* культивирование иммунокомпетентных МНК в отсутствие гуморального раздражителя.
- Активационная модель отражает процесс антиген-независимой активации МНК, в первую очередь, Т-лимфоцитов, моделируемой добавлением в культуру клеток *in vitro* реагента T-cell activation/expansion kit human (частицы с лигандами к CD2, CD3 и CD28 антигенам), имитирующего сигналы антиген-презентирующих клеток (АПК).

Дизайн исследования схематично представлен на рисунок 6.

## Моноклеарные клетки крови условно здоровых доноров



Рисунок 6. Блок-схема дизайна эксперимента.  $R_a$  - индекс шероховатости КФ поверхности.

### 2.2.1. Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови

Для выделения МНК использовали цельную венозную кровь, полученную от здоровых доноров-добровольцев. Кровь (20 мл) забирали из локтевой вены с помощью стандартных вакуумных систем "BD VACUTAINER TM" («Greiner-bio-one», Австрия) с калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (К<sub>3</sub>ЭДТА), в течение 30 мин отстаивали при 4°C для оседания эритроцитов. Надосадок (2-3 мл), содержащий лейкоцитарный осадок, смешивали с фосфатным буфером (4 мл) и наслаивали на 4-5 мл фиколл-урографина ( $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ ) («Pharmacia», Швеция) по стенке пробирки, откручивали в центрифуге 45 минут при 1500 об/мин. Далее собирали лейкоцитарное кольцо и дважды его отмывали центрифугированием 15 минут при 1500 об/мин при низкой (4 °C) температуре в фосфатно-солевом буфере, исходя из соотношения один к одному. Надосадок сливали и после второго отмывания к осадку добавляли полную питательную среду (ППС) для дальнейших манипуляций.

### 2.2.2. Постановка экспериментальных моделей культивирования

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 (индекс шероховатости Ra = 2-5 мкм) микродуговое двустороннее кальцийфосфатное (КФ) покрытие, симулирующее состояние минерального матрикса регенерирующей костной ткани.

3D-культивирование МНК ( $3 \times 10^6$  кл/лунку) проводили в 24-х луночных планшетах («Orange Scientific», Бельгия) в 1,5 мл полной питательной среды ППС.

ППС для гомеостатической модели культивирования 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 единственным отличием от гомеостатической являлось добавление 10 мкл ( $1 \times 10^6$ ) анти-биотиновых MACSiBead™ частиц T-Cell Activation/Expansion Kit human с антителами к CD2, CD3 и CD28 антигенам («Miltenyi Biotec», Германия). Анти-

биотиновые частицы MACSiBead™, нагруженные антителами, используются в качестве активатора для покоящихся Т-клеток, так как имитируют стимулирующий сигнал АПК. Соотношение клеток и активирующих частиц составляло 1:2.

Культивирование проводилось в течение 48 часов при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Контролем служила клеточная взвесь без тестируемых образцов с КФ покрытием в качестве 2D-модели клеточного культивирования.

По истечении срока инкубации клетки ресуспендировали, переносили в контейнеры типа эппендорф («Eppendorf», Германия) и центрифугировали 5 мин при 1200 об/мин (225g относительного центробежного ускорения) на центрифуге («Eppendorf», Германия). Затем аккуратно отбирали надосадочную жидкость (супернатанты) в чистые эппендорфы.

### 2.2.3. Определение общего числа клеток и количества жизнеспособных лимфоцитов в культурах Т-клеток методом проточной цитометрии

**Принцип метода.** Дифференциальная проницаемость для ДНК-связывающих красителей позволяет разграничивать мертвые и живые клетки в любых клеточных суспензиях (рисунок 7).

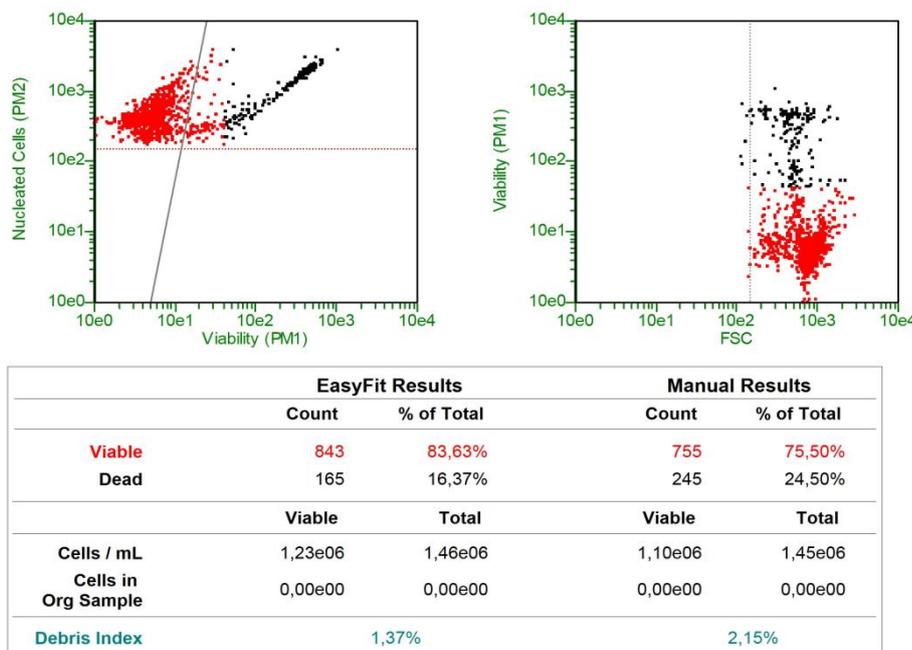


Рисунок 7. Стандартный протокол с использованием реагента и одноименной программы «GuavaViacount» («Millipore», США).

В культурах МНК подсчет общего количества клеток (ОКК) и их жизнеспособность проводили с использованием программы «Guava ViaCount» («Millipore», США), методом проточной лазерной цитометрии на приборе «Guava Easy Cite Plus» («Millipore», США). Пробы ресуспендировали с реагентом ViaCount Reagent из расчета 12,5 мкл на 125 мкл реагента и помещали в темное место на 5 мин, затем проводили анализ согласно протоколу производителя.

#### 2.2.4. Определение иммунофенотипа мононуклеарных клеток крови в культурах методом проточной цитометрии

**Принцип метода.** Метод проточной цитометрии основан на преломлении лазерного луча при прохождении клеток через него, и по длине рассеивания света определяется тип моноклонального антитела, помеченного флуоресцентными метками. Иммунофенотипирование МНК проводилось с использованием коктейля моноклональных антител, исследуемые поверхностные молекулы распределяли по трем группам (таблица 2), CD4 и CD8 («Евролаб», Россия), CD3, CD25, CD28, CD71, CD95, CD45RA/RO («Miltenyi Biotec», Germany). Антитела были помечены флуоресцентными метками аллофикоцианин (APC), фикоэритрин (PE), комплекс перидинин-хлорофилловый белковый (PerCy7), изотиоцианат флуоресцеина (F) и краситель на основе кумарина (ViO).

Таблица 2. Используемые в исследовании моноклональные антитела

CD3 (ViO)	CD3 (ViO)	CD3 (ViO)
CD8 (pE)	CD8 (pE)	CD8 (pE)
CD4 (F)	CD4 (F)	CD4 (F)
CD71 (APC)	CD95 (APC)	CD45RO (APC)
CD25 (PerCy7)	CD28 (PerCy7)	CD45RA (PerCy7)

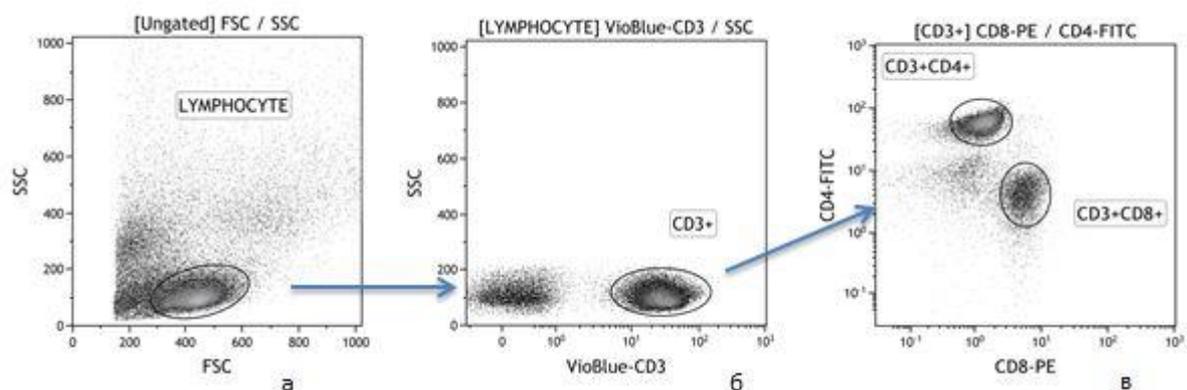
После культивирования 50 мкл ресуспендированного образца и 9 мкл различных моноклональных антител (pH=7,4) переносили в пробирки типа "эпедорф", добавляли 200 мкл фосфатно-солевого буфера, инкубировали 30-45 мин при температуре 4<sup>0</sup>С в темноте и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин уже при комнатной температуре.

Надосадочная жидкость аккуратно сливалась. После этого фосфатно-солевым буфером довели общий объем пробы до 200 мкл, тщательно ресуспендировали автоматическим дозатором и переносили в лунки иммунологического планшета. Измерение в пробах клеточных суспензий проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant («Miltenyi Biotec», Германия).

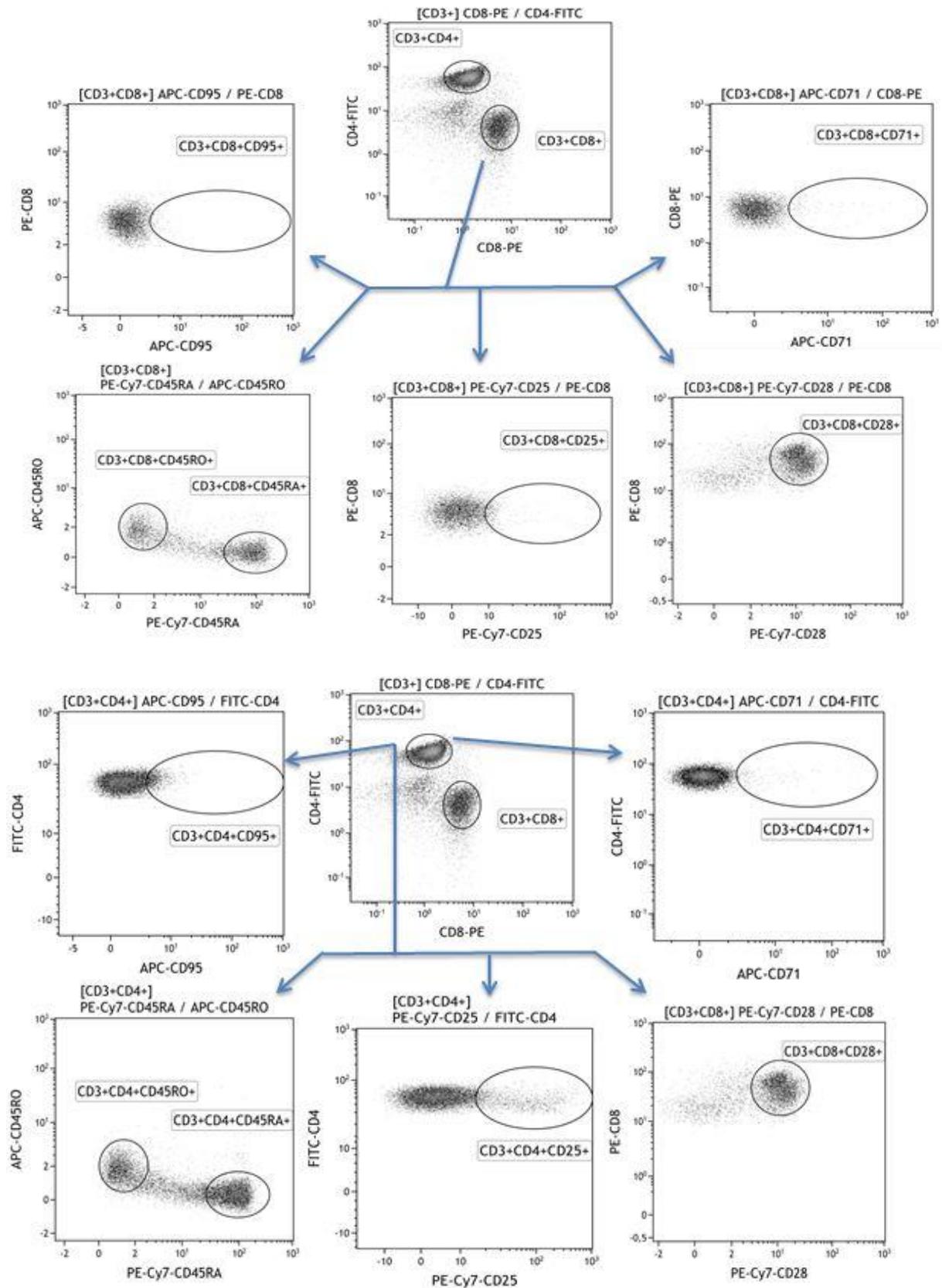
Результаты были проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software» («Beckman Coulter», США). Сбор данных осуществляли до тех пор, пока не набиралось 10 000 событий (т.е. 10 000 клеток). Для выделения популяции лимфоцитов область событий гейтировалась по прямому (FSC, размер клетки) и боковому (SSC, гранулярность) светорассеянию. Для получения корректных статистических данных вводили необходимые логистические ограничения в гистограммы распределения клеток по SSC (боковое светорассеяние, характеризующее цитоплазматические и мембранные особенности клетки) и флуоресценции CD3. Затем выполняли гейтирование в области [CD4<sup>+</sup>] или [CD8<sup>+</sup>] по SSC и интенсивности флуоресценции CD3-*Viablue*.

На основании построенного гейта [CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>] или [CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>] анализировали информацию об основных субпопуляциях Т-лимфоцитов: наивных Т-клеток (CD45RA), активированных Т-клеток и клеток памяти (CD45R0).

Тактика тактика гейтирования представлена на рисунках 8 и 9.



**Рисунок 8.** Гейтирование по физическим параметрам светорассеяния FSC и SSC (а), по интенсивности флуоресценции CD3 (б), а также результаты экспрессии CD4/CD8 в популяции клеток, позитивной по CD3.



**Рисунок 9.** Выявление кластера событий, положительного по антигенам  $CD3^+CD4^+$  или  $CD3^+CD8^+$ , и варианты экспрессии этими клетками маркеров CD95, CD45RA/R0, CD25, CD28, CD71.

### **2.2.5. Количественное определение факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов методом проточной флуориметрии**

*Принцип метода:* анализ основан на интенсивности люминесценции, пропорциональной количеству излучающих и поглощающих центров и доле поглощенного света, который возникает при облучении вещества лазером. Измерение флуоресценции происходило относительно стандартного образца.

Количественное определение 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- $\alpha$ , VEGF) в супернатантах культур, полученных методом центрифугирования при 1000 об/мин в течение 15 минут на холоду (4 °C) оценивали методом проточной флуориметрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-PlexProHuman cytokine Group I Assays, Bio-Rad, США). К антителам, ковалентно связанным с микросферами, содержащими целевой биомаркер, после серии промывок для удаления несвязанного белка, добавляли биотинилированное детектирующее антитело для создания сэндвич-комплекса. Конечный комплекс обнаружения образовывался при добавлении конъюгата стрептавидин-фикоэритрин (SA-PE).

В очищенные образцы добавляли по 50 мкл микросфер, затем промывали на промывочной станции (Bio-PlexPro™ WashStations, Bio-Rad, США) с помощью буферного раствора. Согласно стандартному протоколу, в планшет вносилось по 50 мкл стандартных, экспериментальных и контрольных образцов, и инкубировалось 30 мин при комнатной температуре в темноте при непрерывном встряхивании (300 об/мин). По окончании инкубации и 3-х кратной отмычки добавляли по 25 мкл специфических антител. После второй инкубации проводилась 3-х кратная отмычка, после чего вносили 100 мкл SA-PE, связывающегося с биотинилированными антителами. Инкубировали в темноте, при комнатной температуре 10 мин при 300 об/мин. После 3-х кратной отмычки, в каждую лунку вносилось по 125 мкл буфера, затем, после 30 сек встряхивания при 1100 об/мин помещали планшет на платформу в Bio-Plex.

На автоматическом фотометре для микропланшетов Bio-Plex (Bio-Plex® 200 Systems, «Bio-Rad», США) проводилось считывание результатов с использованием программы Bio-Plex Manager («Bio-Rad», США). Для каждого набора концентрация исследуемого вещества определялась по стандартной кривой (определяемый динамический диапазон 2 - 32000 пг/мл) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. В связи с сопоставимостью данных измерения инсулина методом проточной флуориметрии с результатами иммуноферментного анализа, результаты представлены в «нг/мл».

### **2.2.6. Выделение тотальной РНК**

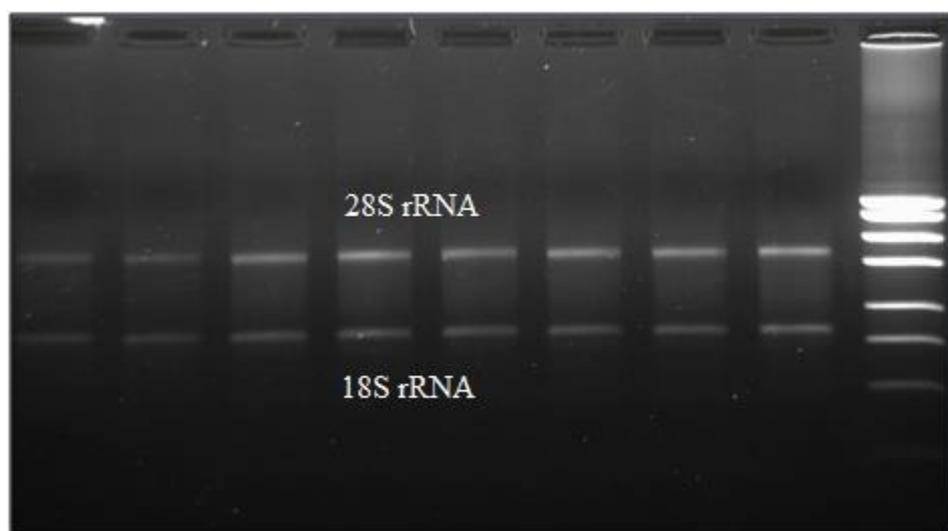
Выделение тотальной (суммарной) РНК из полученных образцов проводили с использованием реагента Extract RNA kit («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Весь процесс выделения РНК можно разделить на подготовительные этапы и само выделение РНК.

Подготовительный этап заключался в следующем:

- гомогенизация пробы в растворе Extract RNA kit («Евроген», Россия) для лучшего выхода РНК, далее инкубация 10-15 мин при комнатной температуре и центрифугирование 12000-15000 об/мин в течение 10 мин; это приводит к удалению нерастворенных фрагментов и полная диссоциация нуклеопротеидных комплексов.
- разделение фаз добавлением 0,2 мл хлороформа на каждый 1 мл реагента Extract RNA, добавленного на этапе гомогенизации, далее инкубация лизата 5 мин при комнатной температуре при периодическом встряхивании, после центрифугирование при 12000 об/мин в течение 15 мин при 4°C для разделения фаз на фенол-хлороформную и бесцветную водную.

В дальнейшем, для выделения суммарной РНК ее отмывали центрифугированием разными спиртами: изопропанолом и этанолом. После РНК разводили нужным объемом воды, свободной от РНКаз. Чистоту разведенной в воде РНК проверяли на спектрофотометре Nanovue Plus («GE Healthcare Bio-Sciences», Швеция). Раствор суммарной РНК считался чистым при диапазоне значений от 2,7 до 2,9 усл. ед и показателях длины волны A260/ A280 нм.

Метод электрофореза в 1,5% агарозном геле применялся для оценки качества тотальной РНК выделенной из экспериментальных образцов. Электрофорез - это процесс разделения видов нуклеиновых кислот на основе их длины путем приложения к ним электрического поля. Поскольку нуклеиновые кислоты заряжены отрицательно, они проталкиваются электрическим полем через матрицу, обычно агарозный гель, причем меньшие молекулы проталкиваются дальше и быстрее. Электрофоретическое разделение проводили, погружая гель в буфер ТАЕ (трис-ацетатный-ЭДТА буфер) и пропуская электрический ток, мощность которого была высчитана из соотношения объема камеры и ожидаемых длин продукта РНК. Выделенная РНК должна была разделиться на 2 бэнда по размеру соответствующих участков, соответствующих большой (28S) и малой (18S) рибосомным субъединицам рибосомальной РНК (рРНК). Высота полос 28S и 18S сравнивалась друг с другом и маркером молекулярного веса («Евроген», Россия), с соотношением 2:1, указывающим на неразложившуюся РНК (рисунок 10).



**Рисунок 10.** Определение качества клеточной РНК по соотношению высоты бэндов, соответствующих малой (18S) и большой (28S) рибосомных субъединицам.

Гель (1,5 %) для электрофореза получали при смешении 150 мг агарозы и 100 мл однократного буфера ТАЕ. Полученную смесь для достижения более оптимального растворения агарозы кипятили, затем, остудив до 50-60 °С, в нее добавляли 2 мкл 10% раствора бромистого этидия. Хорошо размешав бромистый этидий, пока еще жидкий гель заливают в форму и дают остыть и затвердеть при комнатной температуре. Оптимальная напряженность электрического поля для

нашего размера камеры составила 60 В/см. Результаты электрофореза фиксировали при помощи CCD камеры GelDoc XR («Bio-Rad», США) в УФ-свете.

Концентрация полученной РНК измерялась с помощью спектрофотометра NanoVuePlus («GEHealthcare», США). Полученные образцы были заморожены при  $-80^{\circ}\text{C}$  до дальнейшего использования.

### **2.2.7. Обратная транскрипция образцов тотальной РНК**

Тотальная РНК, выделенная из экспериментальных образцов, была приведена к одной концентрации (10 мкг/мл) для получения одинакового количества кДНК. Дальнейшая реакция рассчитывалась на 13,5 мкл реакционной смеси для каждого образца из следующих компонентов: 4,5 мкл oligo(dT)23-primer (20 мкМ) + 9 мкл РНК матрицы (10 мкг) смешивали с («Beagle», Россия). Аккуратно ресуспендированная смесь, после сбрасывания капель со стенок на микроцентрифуге («ELMISkyLine», Латвия), помещалась в амплификатор Real-time CFX96 («Bio-Rad», США). По окончании реакции образцы переносили на лед. Далее добавляли по 16,5 мкл смеси, подготовленной заранее: 6 мкл пятикратного буфера для синтеза первой цепи, 3 мкл dNTP (20 мМ), 3 мкл DTT (20 мМ) и 4,5 мкл ревертазы MMLV. После, аккуратно ресуспендируя и сбрасывая капли со стенок на микроцентрифуге («ELMI SkyLine», Латвия), смесь помещалась в амплификаторе Real-time CFX96 («Bio-Rad», США). По окончании реакции пробирки с образцами замораживали до дальнейшего использования при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.8. Определение уровня относительной экспрессии генов методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени**

Мультиплексная ПЦР проводилась для определения уровня относительной экспрессии генов с использованием коммерческой смеси qPCRmixHS («Евроген», Россия), праймеров в концентрации 10 пМ («Beagle», Россия) и специфических зондов TaqMan. Матрицей служила кДНК (2 мкл), референсным геном, после проверки на стабильность экспрессии в разных образцах, был выбран *RPLPO*.

Пара праймеры и зонд к ним для проведения ПЦР реакции подбирались при помощи online инструментов сайта Integrated DNA Technologies. Предварительную оценку специфичности праймеров, ампликонов и зондов относительно исследуемых генов проводили с помощью online программы BLAST.

**Принцип метода** реализовывался вследствие добавления к реакционной смеси, флуоресцентных зондов, что комплементарны внутренней последовательности амплифицируемых фрагментов. Зонд с флуоресцентной меткой представляет собой олигонуклеотид, несущий на 5'-конце флуорофор и на 3'-конце так называемый «гаситель», и подобран таким образом, чтобы его диапазон поглощения совпадал с диапазоном эмиссии флуорофора, связанного с 5'-концом. Подобная комбинация обеспечивала полноценное гашение флуоресценции 5'-концевого флуорофора 3'-концевым флуорофором за счет флуоресцентно-резонансного переноса энергии (FRET).

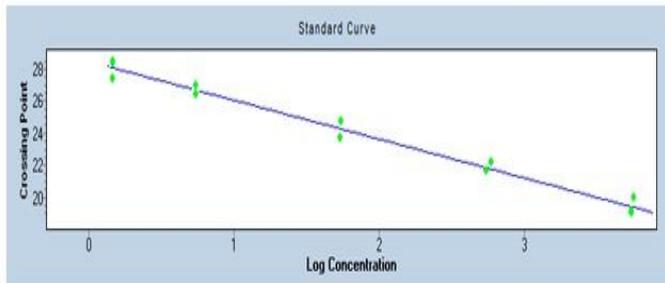
Таким образом, флуоресценция 5'-концевого флуорофора при условиях целостности первичной структуры зонда оказывалась близкой к нулю. ПЦР представляет собой многократно повторяющиеся циклы синтеза (амплификации) фрагмента ДНК ограниченного участками посадки праймеров. На каждом цикле амплификации происходит гибридизация олигонуклеотидного зонда к комплементарному участку ампликона с последующим разрушением (гидролизом) зонда ферментом – термостабильной ДНК-полимеразой (благодаря ее 5'-экзонуклеазной активности). При гидролизе зонда происходило пространственное разобщение 5'- и 3'-концевых флуорофоров, что делает невозможным гашение флуоресценции посредством FRET взаимодействия. Регистрируемое при этом увеличение значений флуоресценции 5'-флуорофора прямо пропорционально увеличению числа синтезированных ампликонов и отражает концентрацию ДНК в исходной матрице. Последовательность олигонуклеотидных праймеров указана в таблице 3.

Таблица 3 - Последовательность использованных олигонуклеотидных праймеров

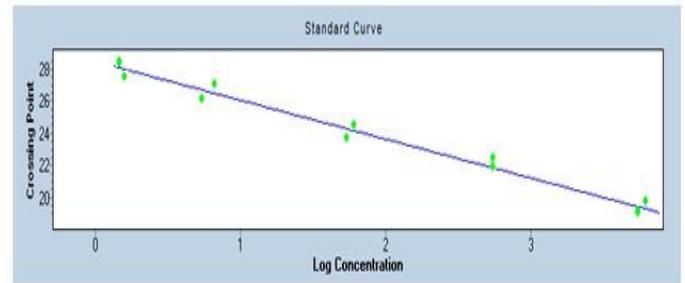
Название гена	Последовательность
<i>Gfi1</i>	for 5'-TGGAGCAGCACAAAGCC-3' rev 5'-GACAGTGTGGATGACCTCTTG-3' probe FAM-5'-CGCAGGAACGGAGCTTTGACTGTA-3'~BHQ-1
<i>hnRPLL</i>	for 5'-CTCTCAATTCAGAATCCGCTTTATC-3' rev 5'-CCATTGCTTGTATCCCATTTCTC-3' probe FAM-5'-TATGCAACCCTGTTGGCAAAGTGC-3'~BHQ-1
<i>hTERT</i>	for 5'-TGACACCTCACCTCACCCAC-3' rev 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3' probe FAM-5'-ACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG-3'-BHQ-1
<i>RPLPO*</i>	for 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAAC-3' rev 5'-CCATCAGCACCACAGCCTTC-3' probe HEX-5'-ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA-3'-BHQ-1
<i>Ki-67</i>	for 5' GCCCTCCAGCTCCTAGTC-3' rev 5' TCCGAAGCACCACCTTCTTCT-3'
<i>GAPDH*</i>	for 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' rev 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3' probe HEX-5'-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'-BHQ-1
<i>U2af14</i>	For 5'-CTTCACAACAAGCCGACATTC-3' rev 5'-CAAGGTTGTCGCACACATTC-3' probe FAM-5'-CCAGGAGGTGTTACAGAACTGCA-3'~BHQ-1

Примечание (\*) – два референсных гена, из которых выбран наиболее стабильно экспрессируемый.

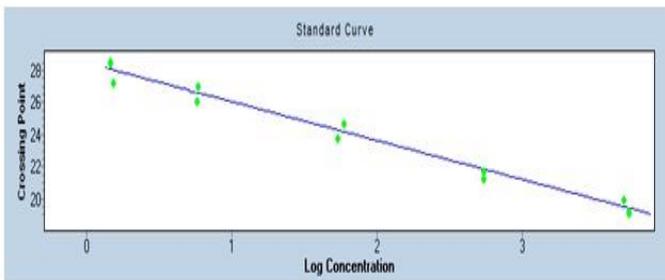
Для каждой пары праймеров была подобрана оптимальная температура отжига с использованием градиентной ПЦР (Bio-Rad T-100, Bio-Rad C-1000, США). Оптимизация условий ПЦР проводилась при амплификации пяти последовательных 2-х кратных разведений кДНК, каждая точка была представлена в двойном повторе (рисунок 11).



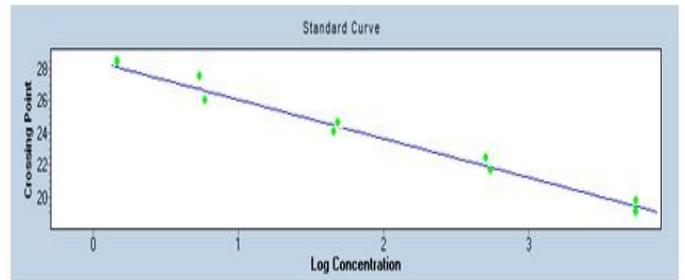
а.



б.



в.



г.

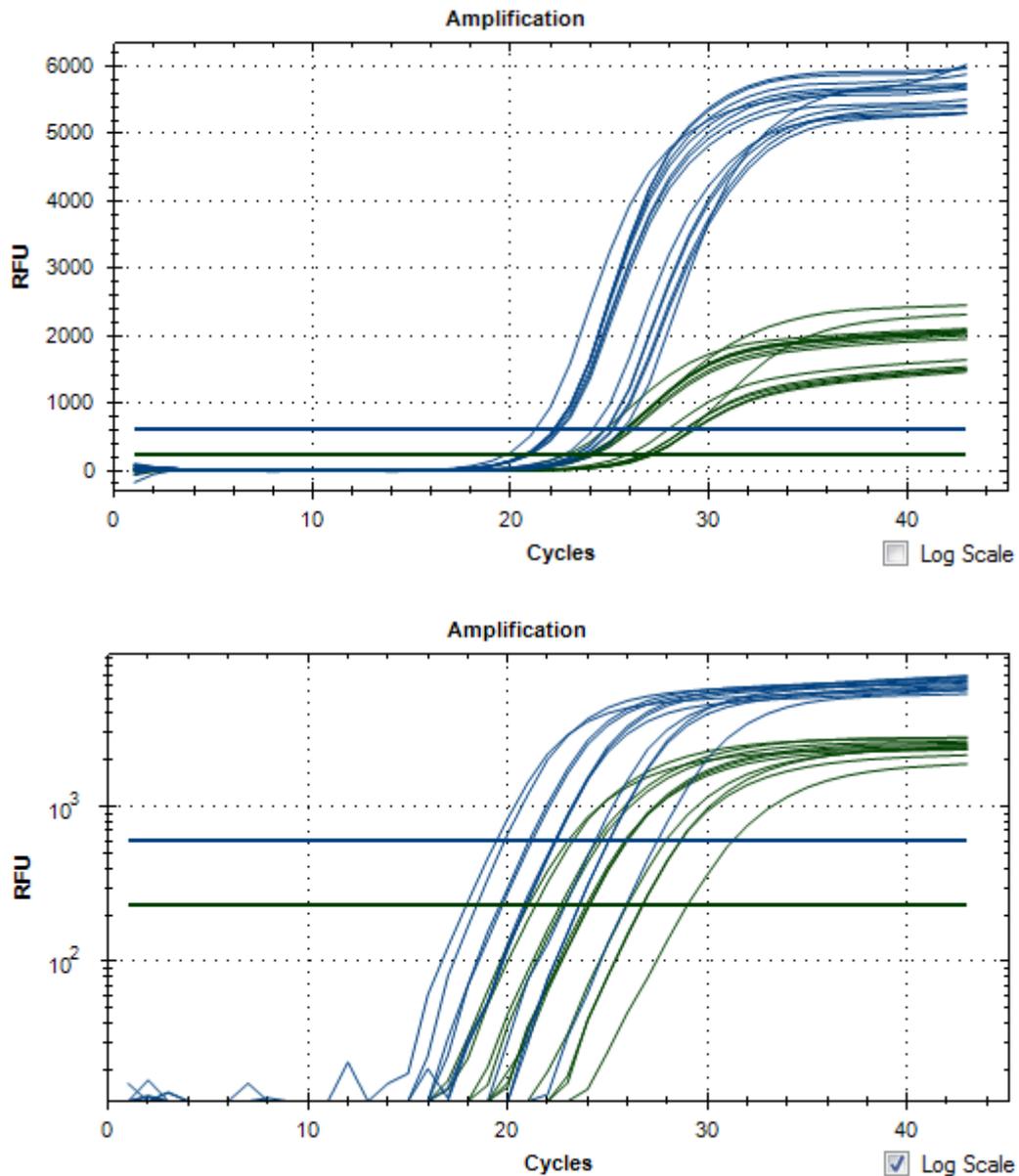
**Рисунок 11.** Проекция значений  $C_t$  серии двукратных разведений для построения калибровочной кривой генов: а) *ki-67*; б) *hnRNPLL*; в) *Gfi1*; г) *hTERT*.

ПЦР-реакцию проводили в трех повторах. Для проведения ПЦР использовали амплификатор LightCycler 480 Real-Time PCR («Roche», Швейцария).

Протокол амплификации:

- первичная денатурация – 3 мин при 95 °С;
- амплификационный цикл ( $\times 45$ ):
  - денатурация – 20 с при 95 °С;
  - отжиг праймеров - 30 с при 60 °С (58С<sup>0</sup> для гена *hnRPLL*);
  - элонгация - 50 с при 72 °С;
- постинкубация - 5 мин при 72 °С;

Результаты ПЦР анализировали с помощью метода максимума второй производной (Second Derivative Maximum method), т.е. определения значения некоторой характеристической точки  $C_p$  (Crossing point) на графике накопления ДНК по форме кривой (рисунок 12).



**Рисунок 12.** Кривые плавления ПЦР продукта.

Расчет уровня относительной экспрессии исследуемого гена производился с помощью модифицированной формулы Пфаффа с учетом эффективности амплификации по программе REST (дальнейшая статистическая обработка экспрессии гена описана в пункте 2.3. Методы статистического анализа данных):

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

Относительный уровень экспрессии исследуемого гена вычислялся, исходя эффективности ПЦР в реальном времени (E), где  $\Delta$  - разности точек пересечения (CP) экспериментального образца по сравнению с контрольным ( $\Delta CP = CP$

контрольного образца – СР исследуемого образца) порогового цикла флуоресценции.

Используемый относительный количественный анализ (Relative Quantification) основан на отношении экспрессий исследуемого гена к экспрессии референсного гена и является достаточным для большинства целей исследовать физиологические изменения в уровнях экспрессии генов. Полученные в ходе анализа результаты зависят от референсного гена и применяемой процедуры нормализации. Некоторые математические модели уже разработаны для расчета относительных уровней экспрессии в одних образцах, с или без коррекции эффективности. Данная формула показывает наиболее удобную математическую модель, которая включает в себя коррекцию эффективности для эффективности ПЦР в реальном времени отдельных транскриптов.

### **2.2.9. Определение миграционной активности моноклеарных клеток с помощью xCELLigence RTCA**

Мониторирование однонаправленной миграции (инвазии) МНК через микроотверстия (диаметр 8 мкм) в полимерной мембране, имитирующие поры кровеносных сосудов, осуществляли с помощью специализированных 16-луночных СИМ-планшетов xCELLigence RTCA DP системы («Roche Applied Science», Квебек, Канада). Real-time cell analyzer (RTCA) позволяет в реальном времени фиксировать динамическое изменение импеданса при контакте клеток с золотыми электродами с вычислением клеточного индекса, прямо коррелирующего с числом и площадью контакта клеток, прилипших к электроду. Каждая лунка СИМ-планшета состоит из двух камер.

Эксперименты по инвазии-миграции клеток проводили согласно (Monigi M.R. et al., 2015) в нашей модификации. В верхние камеры вносили по 30 мкл культуральной среды, инкубировали в течение 1 ч в RTCA DP Analyzer для калибровки прибора. Клетки инкубировались при 37° С в течение 10 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, затем в верхние камеры СИМ-планшета добавляли суспензию клеток (интактных или MACSiBead™-активированных) из расчёта  $4 \times 10^4$  клеток в 150 мкл культуральной среды (RPMI1640+10% ЭТС + 280 мг/л L-глутамин +10 мкг/мл гентамицин). В контрольных лунках в верхние камеры добавляли по 180 мкл культуральной среды. Нижние камеры планшета (180 мкл) были заполнены

питательной средой. По четыре лунки были использованы для каждой экспериментальной группы. Для определения индекса миграции (МИ) импеданс регистрировали с помощью RTCA Software каждые 15 минут в течение 72 часов при температуре культивирования клеток 37 °С.

Дизайн исследования представлен в таблице 4.

### 2.3. Методы статистического анализа данных

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью алгоритмов программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences) и R (<https://www.r-project.org/>), 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). При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова-Смирнова). 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 либо критерий Вилкоксона ( $T$ ) для зависимых выборок.

Для определения силы связи показателей использовался непараметрический ранговый коэффициент корреляции Спирмена ( $r$ ), так как объем выборки не позволял изучить закон распределения. Отличие коэффициентов от нуля считали статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ . Сила корреляционной связи оценивалась как сильная ( $r > 0,75$ ), умеренная ( $0,25 < r < 0,75$ ) и слабая ( $r < 0,25$ ). Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$  (Кремер Н.Ш., 2004).

Относительная экспрессия генов по программе REST рассчитывается на основе математической модели, основанной на оценке эффективности ПЦР и среднем отклонении точки пересечения между образцом и контрольной группой. Впоследствии результаты выражения экспрессии до четырех исследуемых транскриптов проверяются на достоверность с помощью теста рандомизации (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test). Тест рандомизации основан на вероятности, которая наблюдается при подтверждении нулевой гипотезы. Если эта

гипотеза верна, значения в одной группе с той же вероятностью имели место в другой группе. Рандомизационный тест многократно и случайным образом перераспределяет наблюдаемые значения в две группы и каждый раз отмечает видимый эффект (в нашем случае соотношение выражений). Пропорция этих эффектов, которая так же велика, как и наблюдаемая в эксперименте, дает значение Р теста. Средняя ошибка для анализа рассчитывается при помощи ряда Тейлора:

$$\begin{aligned}
 S.E.(\hat{\phi}) = & \phi \left\{ \frac{(CP_{targ,cont} - CP_{targ,test})^2}{\hat{E}_{targ}^2} SE^2(\hat{E}_{targ}) \right. \\
 & + \frac{(CP_{ref,cont} - CP_{ref,test})^2}{\hat{E}_{ref}^2} SE^2(\hat{E}_{ref}) \\
 & + (\log_e E_{targ})^2 (SE^2(CP_{targ,cont}) + SE^2(CP_{targ,test})) \\
 & \left. + (\log_e E_{ref})^2 (SE^2(CP_{ref,cont}) + SE^2(CP_{ref,test})) \right\}^{0,5}
 \end{aligned}$$

Таблица 4 - Методический дизайн in vitro исследования

Методы исследования	Условия культивирования	3D-образцы с КФ покрытием
Определение ОКК и количества жизнеспособных лимфоцитов в культурах Т-клеток методом проточной цитометрии	<b>Гомеостатическая модель</b>	<b>Гомеостатическая модель</b>
Определение методом проточной цитометрии поверхностных молекул CD4, CD8, CD24, CD71, CD28, CD95 на Т-клетках разной степени дифференцировки	<u>Контрольные культуры</u> 2D культура МНК	Имплантаты: №55_ККТi_CaP (Δm=5,9 мг; Δl/2=24 мкм; Ra=2,72 мкм) №47_ККТi_CaP (Δm=5,2 мг; Δl/2=19 мкм; Ra=2,03 мкм) №50_ККТi_CaP (Δm=5,5 мг; Δl/2=23 мкм; Ra=2,21 мкм)
Количественное определение факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов цитокинов, хемокинов (IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, TNF-α, VEGF) методом проточной флуорометрии.	<u>Экспериментальные культуры</u> 3D культуры МНК	№ 79_ ККТi_CaP в электролите №5 (U=250В; t=5 мин; Δm=17,2 мг; Δl=64 мкм; Ra=4,2 мкм) № 2_ ККТi_CaP (U=200В; t=10 мин; Δm=12,9 мг; Δl=49 мкм; Ra=3,3 мкм) №1_ ККТi_CaP (U=200В; t=10 мин; Δm=12,9 мг; Δl=49 мкм; Ra=3,5 мкм)

Оценка уровней относительной экспрессии мРНК генов методом ПЦР	<b>Активационная модель + (CD2-/CD3-/CD28-) частицы</b>	<b>Активационная модель + (CD2-/CD3-/CD28-) частицы</b>
Определение миграторной активности мононуклеарных клеток с помощью xCELLigence RTCA (2D гомео- и активационные модели)	<u>Контрольные культуры</u> 2D культура МНК	Имплантаты: №47_ККТi_CaP ( $\Delta m=6,45$ мг; $\Delta l/2=25$ мкм; Ra=2,76 мкм)
Статистический анализ данных: 1) IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences) и R ( <a href="https://www.r-project.org/">https://www.r-project.org/</a> ), 2) Визуализация данных: ( <a href="https://rstudio.com/">https://rstudio.com/</a> )	ППС (RPMI-1640+10% фетальная бычья сыворотка +2 мМ/мл L – глутамин +10мкг/мл гентамицин) + MACSiBead T-Cell Activation/Expansion Kit human) <u>Экспериментальные культуры</u> 3D культуры МНК ППС +10мкг/мл гентамицин + MACSiBead T-Cell Activation/Expansion Kit human)	№51C_ККТi_CaP ( $\Delta m=5,8$ мг; $\Delta l/2=21,5$ мкм; Ra=2,77 мкм) №51_ККТi_CaP ( $\Delta m=5,9$ мг; $\Delta l/2=25$ мкм; Ra=2,7 мкм) №59_ККТi_CaP ( $\Delta m=11,9$ мг; $\Delta l/2=45$ мкм; Ra=3,38 мкм) №69_ККТi_CaP ( $\Delta m=15,8$ мг; $\Delta l/2=55,8$ мкм; Ra=4,1 мкм) №17_ККТi_CaP ( $\Delta m=15,8$ мг; $\Delta l/2=55,8$ мкм; Ra=4,65 мкм)

Примечание: ККТi - крупнокристаллический титан; CaP - кальцийфосфатное покрытие;  $\Delta m$  - масса покрытия;  $\Delta l/2$  - толщина покрытия с одной стороны.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ НАБЛЮДЕНИЙ

### 3.1 Определение количества жизнеспособных и погибших (апоптотических, некротических) форм мононуклеарных клеток крови в условиях сокультивирования с трехмерным искусственным матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани

Согласно данным таблицы 5, в 2D-гомеостатической модели культивирования через 48 ч инкубации общее количество мононуклеарных клеток крови (ОКК), неприлипающих к пластику, составило  $2,97 [2,89; 3,05] \times 10^5$  нуклеаров/мл; доля жизнеспособных клеток в культуре была равной 87,45 [84,62; 88,55] %.

Активационная модель культивирования клеток в 2D стандартной культуре на пластиковой поверхности культуральных планшетов достигалась, согласно (Юрова К.А., 2015), путем добавления  $1 \times 10^6$  анти-биотиновых MACSiBead™ частиц T-Cell Activation/Expansion Kit human (CD2-/CD3-/CD28-) к исследуемым клеткам. При введении в культуру клеток частиц активирующего комплекса (гуморальный активатор), симулирующего АПК-сигналинг, ОКК достигало  $5,41 [5,32; 5,89] \times 10^5$  клеток/мл при 80,65 [80,17; 82,25] % жизнеспособности (таблица 1). Статистически значимое снижение (на 7 %) доли жизнеспособных МНК было обусловлено усилением их гибели путем апоптоза (на 0,9 %) и некроза (на 4,5 %) в сравнении с гомеостатической 2D-культурой (таблица 5). На фоне статистически значимого роста ОКК (на 82 % в сравнении с 2D-гомеомоделью) в активированной клеточной культуре повышенная гибель неприлипающих МНК была расценена как известный феномен "смерть клетки через гиперактивацию" (Massanella M. et al., 2010).

Присутствие 3D-матрикса с КФ покрытием в гомеостатической культуре МНК, как и в случае с гуморальным Т-активатором, способствовало значительному уменьшению (на 17 %) клеточной жизнеспособности, обусловленной усилением апоптоза (на 0,7 %) и, в большей степени, некроза (на 16 %) в сравнении 2D-культурой. ОКК при этом статистически значимо не менялось (таблица 5). Была выдвинута гипотеза, что 3D-матрикс является структурным раздражителем, запускающим физиологические механизмы адаптации культуры МНК через

механизмы гиперактивации и последующей гибели неприлипающей части популяции (преимущественно, Т-лимфоцитов). Подобные процессы характерны для Т-клеток, например, при реакции стресс и введении глюкокортикоидов.

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 (3D-активационная модель клеточного культивирования, таблица 5).

Таблица 5 - Абсолютное ( $\times 10^5$  клеток/мл) и относительное (%) содержание жизнеспособных, апоптотических и некротических форм неприлипающих мононуклеарных клеток крови человека в различных условиях 48-ч культивирования *in vitro*, Me [ $Q_1$ ;  $Q_3$ ], n=6

Исучаемые показатели/ группы	Гомеостатическая модель культивирования		Активационная модель культивирования	
	2D-культура клеток	3D-культура клеток	2D-культура клеток	3D-культура клеток
	1	2	3	4
Абсолютное содержание мононуклеарных клеток крови				
Общее количество кариоцитов	2,97 [2,89; 3,05]	2,55 [2,36; 2,89]	5,41 [5,32; 5,89] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	3,62 [3,47; 3,92] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
Относительное содержание различных форм мононуклеарных клеток крови				
Живые клетки	87,45 [84,62;88,55]	70,20[67,90; 71,00] <b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,05</b>	80,65 [80,17;82,25] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	64,95 [57,50;69,90] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> p <sub>2-4</sub> >0,05
Апоптоз	1,80 [1,25; 2,05]	2,50 [2,4; 3,9] <b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,05</b>	2,70 [2,37; 3,35] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	4,10 [3,10; 5,00] p <sub>3-4</sub> >0,05 p <sub>2-4</sub> >0,05
Некроз	11,05 [9,40;13,82]	26,90 [25,40;28,20] <b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,05</b>	15,75 [15,00;17,25] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	31,25 [26,40;36,00] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> p <sub>2-4</sub> >0,05

Примечание: здесь и в таблица 6-9: n - число наблюдений (образцов) в каждой группе исследования; p<sub>1-4</sub> –отмечены различия между соответствующими группами согласно U критерию Манна-Уитни.

### **3.2 Оценка мембранной экспрессии молекул клеточной дифференцировки, активации, апоптоза и созревания в культурах мононуклеарных клеток крови в условиях сокультивирования с трехмерным матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани**

Доля Т-лимфоцитов, выделенных из не прилипающей фракции МНК крови человека после 48-ч культивирования *in vitro*, несущих CD45CD3 кластеры дифференцировки, составила более 98 %. Как следует из таблицы 6, в гомеостатической 48-ч 2D-культуре на пластиковой поверхности культуральной посуды основная доля CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> клеток экспрессировала CD4 (67 %) и CD8 (22 %) антигены. 55 % клеточной культуры являются CD45RA<sup>+</sup> наивными (не активированными антигеном) Т-клетками. CD4<sup>+</sup> Т-хелперы/индукторы в 76 % случаев экспрессировали CD28 молекулу дифференцировки как коstimулятор TCR-активированных Т-лимфоцитов, способствующий их длительному выживанию. CD8<sup>+</sup> популяция была представлена, преимущественно, Т-клетками с цитолитической активностью, поскольку на 79 % CD3CD8-позитивных лимфоцитов выявлена экспрессия молекулы CD28, не характерной для Т-супрессоров (Delves P.J., Roitt I., 1998). Другие антигены клеточной пролиферации, дифференцировки, созревания и смерти (CD25(альфа-цепь рецептора к IL-2); CD71 (рецептор к трансферрину); CD95(Fas/Apo-1)) обнаруживались на CD4<sup>+</sup> клетках в 3,5-12 %, на CD8<sup>+</sup> лимфоцитах - в 0,26-1,43 % случаев (таблица 6).

После окончания срока культивирования (48 ч) гомеостатическая 3D-культура клеток, индуцированная введением матриксов с шероховатым КФ покрытием (таблица 6), не имела статистически значимых различий с экспериментальной 2D-моделью ( $p > 0,05$ ) по уровню мембранной экспрессии всех исследуемых маркеров активации, созревания и дифференцировки (CD4, CD8, CD25, CD71, CD45, CD28, CD95, CD3CD45RA и CD3CD45R0). Как следствие, применяемые 3D-матрикс можно считать неиммуногенными физиологическими раздражителями.

Напротив, активационная 2D-модель *in vitro* культуры МНК демонстрировала существенные вариации CD профиля Т-клеток (таблица 6). Интересным оказался тот факт, что искусственный гуморальный Т-активатор (частицы с лигандами к CD2, CD3 и CD28 мембранным антигенам) достоверно

снижал на 10-13 % изначально высокое число CD28<sup>+</sup> хелперов и цитолитиков, но существенно повышал в изучаемых CD4-CD8 субпопуляциях Т-лимфоцитов долю CD25<sup>+</sup> (на 8,5-22 %) и CD71<sup>+</sup> (на 4,5-12 %) фракций, слабо представленных в гомеостатической 2D-культуре (таблица 6). Относительное содержание CD95-позитивных клеток возрастало (на 1,5 %;  $p < 0,05$ ) только в CD8 субпопуляции Т-лимфоцитов. Иммуномодулирующий эффект Т-активатора, имитирующего сигнал от АПК, увеличивал на 4 % ( $p < 0,05$ ) долю CD45RA<sup>+</sup> наивных (не активированных антигеном) Т-клеток, что представляется весьма оригинальным результатом.

В активационной 3D-культуре (клетки+частицы Т-активатора+3D-матрикс) были зафиксированы следующие результаты (таблица 6):

1) выявлен синергичный стимулирующий эффект гуморального и структурного раздражителей 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 не влиял на падение экспрессии CD28, обусловленное гуморальным активатором;

3) 3D-матрикс достоверно снижал (до уровня 3D-гомеомодели) повышенное количество CD45RA<sup>+</sup> Т-клеток, индуцированное (CD2-/CD3-/CD28-/-)активатором;

4) 3D-матрикс статистически значимо уменьшал долю CD4 Т-хелперов (на 3,5 % в сравнении с 3D-гомеомоделью), а также CD8 Т-киллеров/супрессоров (более чем на 2 %,  $p < 0,05$ ) по отношению как к 3D-гомеостатической, так и 2D-активационной моделям.

Полученные результаты говорят о том, что 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 "кость/кровеносное русло" может значительно отличаться от наших представлений о механизмах функционирования клеток, полученных в обычной (двумерной стационарной) культуре *in vitro*.

Таблица 6 - Относительное (%) содержание жизнеспособных CD45<sup>+</sup> мононуклеарных клеток крови человека, несущих мембранные детерминанты клеточной дифференцировки, активации и созревания CD3<sup>+</sup> клеток (Т-лимфоцитов) в различных условиях 48-ч культивирования *in vitro*, Me[Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>], n=6

Исследуемые показатели / группы	Гомеостатическая модель культивирования		Активационная модель культивирования	
	2D-культура клеток	3D-культура клеток	2D-культура клеток	3D-культура клеток
	1	2	3	4
CD4 <sup>+</sup>	67,17[64,88; 68,54]	67,77[66,89; 68,76] p <sub>1-2</sub> >0,05	64,47 [58,22; 64,99] p <sub>1-3</sub> >0,05	64,21[62,27;66,29] p <sub>3-4</sub> >0,05 <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
CD8 <sup>+</sup>	21,81[20,15; 23,91]	21,10 [20,59; 21,62] p <sub>1-2</sub> >0,05	21,28 [20,70; 23,77] p <sub>1-3</sub> >0,05	18,84[18,03;19,77] p <sub>3-4</sub> <0,05 <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
CD4 <sup>+</sup> CD71 <sup>+</sup>	3,5 [2,45; 5,29]	5,87 [4,73;6,35] p <sub>1-2</sub> >0,05	15,43[11,11; 17,04] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	22,99[15,78;25,94] p <sub>3-4</sub> >0,05 <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
CD8 <sup>+</sup> CD71 <sup>+</sup>	1,19[0,87; 1,90]	1,99[1,73;2,17] p <sub>1-2</sub> >0,05	5,89 [4,13; 6,74] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	8,41[5,64; 10,08] p <sub>3-4</sub> >0,05 <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
CD4 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup>	11,77[11,04;12,5 2]	10,75[10,13; 11,89] p <sub>1-2</sub> >0,05	9,17 [8,27;10,71] p <sub>1-3</sub> >0,05	11,79[10,6; 12,14] p <sub>3-4</sub> >0,05 p <sub>2-4</sub> >0,05
CD8 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup>	1,43 [1,13; 1,71]	1,30[1,13; 1,59] p <sub>1-2</sub> >0,05	2,96 [2,64; 3,79] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	4,66[4,33; 5,12] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	6,3 [6,13; 6,9]	6,22[5,62; 6,8] p <sub>1-2</sub> >0,05	28,68 [27,19; 29,93] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	28,39[27,27;28,73] p <sub>3-4</sub> >0,05 <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	0,26 [0,22; 0,43]	0,34[0,26; 0,51] p <sub>1-2</sub> >0,05	8,92 [8,32; 10,31] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	9,35[8,5; 9,54] p <sub>3-4</sub> >0,05 <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	76,38[74,91; 76,63]	75,28[74,46; 75,47] p <sub>1-2</sub> >0,05	65,05 [64,02; 66,30] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	65,48[64,86;65,75] p <sub>3-4</sub> >0,05 <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	79,38[78,18; 79,42]	78,97[78,49; 79,20] p <sub>1-2</sub> >0,05	68,13 [66,95; 69,48] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	68,80[68,17;69,69] p <sub>3-4</sub> >0,05 <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>

CD3 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>	55,35[54,31; 55,71]	56,15 [55,6; 57,30]  p <sub>1-2</sub> >0,05	59,77 [59,02; 60,43] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	55,75[54,98; 56,81] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> p <sub>2-4</sub> >0,05
CD3 <sup>+</sup> CD45R0 <sup>+</sup>	34,82[32,99; 36,73]	36,46[35,19; 38,07] p <sub>1-2</sub> >0,05	32,89 [32,30; 33,80] p <sub>1-3</sub> >0,05	36,02[34,2; 36,79] p <sub>3-4</sub> >0,05 p <sub>2-4</sub> >0,05

### 3.3 Исследование секреции факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов в культурах мононуклеарных клеток крови в условиях сокультивирования с трехмерным матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани

Результаты мультиплексного анализа представлены в таблицах 7-9. Как следует из таблиц, неактивированные антигеном МНК (2D-гомеостатическая 48-ч культура) секретируют *in vitro* широкий спектр (не менее 23 видов) биологически активных молекул. По классификации van den Broek et al. (2014) уровни медиаторов в межклеточной жидкости можно разделить на следующие группы:

- высокие (более 1 нг/мл) концентрации медиаторов (**IP-10; IL-8**);
- средние (0,1-1 нг/мл) концентрации медиаторов (**TNF-a; IL-1ra; IFN-g; GM-CSF**);
- низкие (1-100 пг/мл) концентрации медиаторов (**IL-1b; IL-2; IL-12; IL-15; IL-17; IL-9; IL-6; MIP-1a; MIP-1b; MCP-1; IL-4; IL-10; IL-13; Eotaxin; G-CSF; VEGF; IL-7**).

В то же время, минимальные (<1 пг/мл) и неопределяемые (0 пг/мл) концентрации молекул в 2D-гомеокультуре МНК не выявлены. Другими словами, секреторную способность неактивированных МНК можно считать низкой и сбалансированной в отношении про- и противовоспалительных медиаторов, гемо- и ангиопоэтинов.

Моделирование контакта неактивированных МНК с поверхностью регенерирующей кости (3D-гомеостатическая культура) приводило к статистически значимому (по отношению к 2D-культуре) всплеску секреции практически всех (исключая TNF-a и IL-12, IFN-g и IP-10) анализируемых провоспалительных цитокинов/хемокинов (таблица 7):

MIP-1a(в 113 раз) >IL-6 (в 57 раз) >IL-1b (в 48 раз) >MIP-1b (в 21 раз) > MCP-1 (в 16 раз) > IL-8 (в 5 раз) > IL-2 (в 4 раза) > IL-9 (в 3,6 раза) > IL-15 (в 3,5 раза) > IL-17 (в 2,7 раза).

Из спектра 4 анализируемых противовоспалительных биомолекул в 3D-гомеокультуре МНК отмечено статистически значимое возрастание (в 3,4 раза по отношению к 2D-культуре) только концентрации IL-1ra (таблица 8). Исходя из данных литературы о двойной роли IFN-g, данный медиатор отнесен к группе провоспалительных факторов (Lee S. H., 2017).

3D-матрикс не влиял на секрецию ангиопоэтинов VEGF, Eotaxin и IL-7 фактора роста предшественников Т-клеток (Moret F. M., 2011), но увеличивал выход колониестимулирующих факторов гранулоцитов (G-CSF; в 42 раза;  $p<0,05$ ) и, в меньшей степени, гранулоцитов/макрофагов (GM-CSF; в 1,2 раза;  $p<0,05$ ), способных также стимулировать рост кровеносных сосудов. В нашем исследовании Eotaxin рассматривался как один из ряда хемокинов, стимулирующих ангиогенез, обусловленный воспалением (Ridiandries A. et al., 2016).

Как следствие, согласно классификации van den Broek et al. (2014), спектр секретлируемых биомолекул в 3D-гомеостатической культуре МНК может быть представлен следующим образом:

- высокие (более 1 нг/мл) концентрации медиаторов (**IP-10; IL-6; MIP-1b; IL-1ra; IL-8**);
- средние (0,1-1 нг/мл) концентрации медиаторов (**IL-1b; TNF-a; IL-17; MIP-1a; MCP-1; IFN-g; G-CSF; GM-CSF**);
- низкие (1-100 пг/мл) концентрации медиаторов (**IL-2; IL-12; IL-15; IL-9; IL-4; IL-10; IL-13; Eotaxin; VEGF; IL-7**).

Таким образом, неантигенный 3D-раздражитель индуцирует секреторную активность МНК в отношении, преимущественно, провоспалительных и отдельных противовоспалительных медиаторов, гемопоэтинов, но не ангиопоэтинов. Подобный спектр цитокинов/хемокинов может лежать в основе повышенной *in vitro* гибели МНК через гиперактивацию (таблица 5) при 48-ч контакте с 3D-матриksom, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани.

Введение гуморального Т-клеточного активатора, симулирующего сигналинг АПК, также существенно ( $p<0,05$ ) стимулировало секрецию практически всех

тестируемых медиаторов (за исключением IL-2) в активационной 2D- культуре МНК *in vitro* по сравнению с гомеостатической 2D-моделью (таблицы 7-9). Уровни провоспалительных цитокинов/хемокинов в супернатантах определялись в следующем ряду (по убыванию повышенной концентрации, таблица 7):

MIP-1b (в 222 раза) >IL-1b (в 49 раз) >IL-6 (в 33 раза), MIP-1a (в 33 раза) >MCP-1 (в 19 раз) > IL-9 (в 21 раз) >IP-10 (в 17 раз) >TNF-a (в 8,3 раза) >IL-8 (в 6 раз) > IL-15 (в 3,9 раза) > IL-12 (в 3,5 раза).

Ранжирование концентраций противовоспалительных биомолекул привело к следующим результатам (таблица 8):

IL-13 (в 75 раз) > IL-10 (в 50 раз) >IL-1ra (в 6,5 раза) > IFN-g (в 4,4 раза) > IL-4 (в 1,4 раза).

В свою очередь, реактивность МНК в 2D-активационной культуре в отношении секреции гемопоэтинов (G-CSF, GM-CSF) и ангиопоэтинов оказалась менее выраженной при сравнении с таковой для про- и противовоспалительных цитокинов/хемокинов (таблица 9). Концентрация G-CSF повысилась в 12 раз > VEGF (в 3,5 раза) > GM-CSF (в 1,5 раза) > Eotaxin (в 1,3 раза). При этом концентрация IL-7 даже снизилась в 3 раза в сравнении с 2D-гомеокультурой клеток.

В русле классификации van den Broek et al. (2014), спектр секретируемых биологически активных веществ в 2D-активационной культуре МНК может быть представлен в следующем виде:

- высокие (более 1 нг/мл) концентрации медиаторов (**IP-10; MIP-1b; IL-6; IL-1ra; IFN-g; IL-13; MCP-1; IL-8**);

- средние (0,1-1 нг/мл) концентрации медиаторов (**IL-1b; TNF-a; IL-17; IL-9; MIP-1a; IL-10; G-CSF; GM-CSF; VEGF**);

- низкие (1-100 пг/мл) концентрации медиаторов (**IL-2; IL-12; IL-15; IL-4; Eotaxin; IL-7**).

Таким образом, гуморальный Т-клеточный активатор, симулирующий сигналинг АПК, оказывает, в определенной степени, более выраженное и сбалансированное стимулирующее действие на спектр изучаемых цитокинов/хемокинов по отношению к подобному эффекту, описанному для структурного неиммуногенного 3D-раздражителя.

В активационной 3D-культуре (МНК+частицы Т-активатора+3D-матрикс) были зафиксированы следующие результаты (таблицы 7-9):

1. Комбинация двух раздражителей дополнительно индуцировала (в сравнении с 3D-матриksom) *in vitro* уже повышенную (по отношению к 2D-гомеокультуре клеток) секреторную активность МНК в отношении провоспалительных регуляторных молекул в следующем порядке (таблица 7): TNF-а (в 45 раз) > IL-17 (в 14 раз) > IL-1b (в 12 раз) > MIP-1b (в 11 раз) > IL-9 (в 7,3 раза) > IL-12 (в 3,6 раза) > IL-6 (в 2,4 раза). Кроме того, в 3D-активационной модели статистически значимо возрастала (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). Однако, концентрация IP-10 в 3D-активационной модели снижалась до 73 % ( $p_{1-3} < 0,05$ ) от уровня, выявленного в 2D-активационной культуре клеток, но оставалась, тем не менее, в 13 раз выше ( $p < 0,05$ ), чем в 3D-гомеокультуре клеток.

2. Сочетание двух раздражителей дополнительно индуцировало *in vitro* уже повышенную (по отношению к 2D-активационной культуре клеток с Т-клеточным активатором) секреторную активность МНК в отношении изученных противовоспалительных регуляторных молекул следующим образом: IFN-g (в 5,4 раза) > IL-4 (в 1,7 раза) > IL-1ra (в 1,6 раза) > IL-13 (в 1,5 раза) > IL-10 (в 1,4 раза). Таким образом имело место значительное ( $p < 0,05$ ) превышение (Т-активатор+3D-матрикс > 3D-матрикс до 87 раз) концентраций всех остальных противовоспалительных биомолекул (таблица 8).

3. Во многом аналогичный, но менее значительный (максимум в 6 раз) стимулирующий эффект наблюдался для изменений в содержании гемо- и ангиопоэтинов, в основном, по сравнению с 2D-активационной моделью (таблица 9).

Следуя классификации van den Broek et al. (2014), секретлируемые биологически активные вещества в 3D-активационной культуре МНК можно расположить в следующем порядке:

- высокие (более 1 нг/мл) концентрации медиаторов (**IL-1b; TNF-a; IL-8; IP-10; IL-17; IL-6; MIP-1b; MCP-1; IL-1ra; IL-10; IFN-g; IL-13**);

- средние (0,1-1 нг/мл) концентрации медиаторов (**IL-2; IL-15; IL-9; MIP-1a; G-CSF; GM-CSF; VEGF**);

- низкие (1-100 пг/мл) концентрации медиаторов (**IL-12; IL-4; Eotaxin; IL-7**).

Таблица 7 - Концентрация (пг/мл) провоспалительных цитокинов и хемокинов, секретируемых мононуклеарными клетками крови человека в различных условиях 48-ч культивирования *in vitro*, Me[Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>], n=6

Изучаемые показатели/ группы	Гомеостатическая модель культивирования		Активационная модель культивирования	
	2D-культура клеток	3D-культура клеток	2D-культура клеток	3D-культура клеток
	1	2	3	4
<b>IL-1b</b>	10,11 [6,59;22,3]	485 [68,9;1253] <b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,05</b>	490 [485; 610] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	5901 [4904;10232] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
<b>IL-2</b>	18,21 [12,22; 43,2]	79,10[72,97;156] <b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,05</b>	45,30 [43,20;56,44] p <sub>1-3</sub> >0,05	160 [141; 604] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> p <sub>2-4</sub> >0,05
<b>TNF-a</b>	103 [75,7; 109]	163[91,29; 280] p <sub>1-2</sub> >0,05	856 [753; 919] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	7391 [6143; 10174] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
<b>IL-12(p70)</b>	13,45 [12,08;15,30]	14,44[7,23; 28,91] p <sub>1-2</sub> >0,05	47,49 [36,61; 55,71] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	51,86 [43,19; 59,61] p <sub>3-4</sub> >0,05 <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
<b>IL-15</b>	21,13 [9,64; 23,04]	74,39 [31,66; 127] <b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,05</b>	82,50 [74,01;102] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	120 [108; 129] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> p <sub>2-4</sub> >0,05
<b>IL-17</b>	49,50 [38,07; 60,79]	134 [83,15; 319] <b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,05</b>	730 [707; 780] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	1847 [1693; 2034] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
<b>IL-9</b>	22,28 [16,20; 24,24]	79,11 [42,09;107] <b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,05</b>	459 [435; 475] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	577 [574; 637] p <sub>3-4</sub> >0,05 <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
<b>IL-6</b>	93,44 [59,81; 153]	5352 [560; 16201] <b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,05</b>	3055 [2279;3056] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	12787 [10403; 19674] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
<b>MIP-1a</b>	8,07 [6,78; 9,19]	915 [54,43; 1170] <b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,05</b>	264 [258; 471] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	939 [698; 1031] p <sub>3-4</sub> <0,05 p <sub>2-4</sub> >0,05

<b>МIP-1b</b>	91,80 [84,48; 112]	1933 [321; 6533] <b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,05</b>	20392 [17382; 21232] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	21683 [18680; 27594] p <sub>3-4</sub> >0,05 <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
<b>МCP-1 (MCAF)</b>	55,56[35,39; 58,85]	864 [471; 1679] <b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,05</b>	1030 [928; 1245] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	1138 [1003; 1445] p <sub>3-4</sub> >0,05 p <sub>2-4</sub> >0,05
<b>IL-8</b>	3825[2799; 9247]	19532 [10101;29077] <b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,05</b>	23943 [23432;29394] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	21787 [20643;27256] p <sub>3-4</sub> >0,05 p <sub>2-4</sub> >0,05
<b>IP-10</b>	3092[2871; 3547]	2935 [943; 5739] p <sub>1-2</sub> >0,05	51136 [50235; 60493] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	37453 [23433; 45281] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
<b>IFN-g</b>	291 [230; 310]	375[299; 506] p <sub>1-2</sub> >0,05	1281 [1140; 1763] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	6964 [6629; 7746] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>

Таблица 8 - Концентрация (пг/мл) противовоспалительных цитокинов, секретируемых мононуклеарными клетками крови человека в различных условиях 48-ч культивирования *in vitro*, Me[Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>], n=6

Изучаемые показатели/ группы	Гомеостатическая модель культивирования		Активационная модель культивирования	
	2D-культура клеток	3D-культура клеток	2D-культура клеток	3D-культура клеток
	1	2	3	4
<b>IL-1ra</b>	456 [344; 458]	1562 [991; 2086] <b>p<sub>1-2</sub>&lt;0,05</b>	2900 [2789; 3000] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	4567 [4536; 4900] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
<b>IL-4</b>	6,36 [5,04; 8,16]	8,05 [6,67; 11,99] p <sub>1-2</sub> >0,05	9,03 [9,03;9,34] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	14,79 [13,74; 18,28] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
<b>IL-10</b>	15,53 [14,20; 19,61]	22,97 [18,41; 36,10] p <sub>1-2</sub> >0,05	774 [681; 849] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	1048 [1004; 1160] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>
<b>IL-13</b>	16,74 [15,19; 20,67]	20,67 [17,47; 45,74] p <sub>1-2</sub> >0,05	1230 [1006; 1240] <b>p<sub>1-3</sub>&lt;0,05</b>	1793[1698; 2291] <b>p<sub>3-4</sub>&lt;0,05</b> <b>p<sub>2-4</sub>&lt;0,05</b>

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, в первую очередь, в отношении факторов с противовоспалительным действием.

Таблица 9 - Концентрация (пг/мл) гемопоэтинов, ангиопоэтинови факторов роста, секретируемых мононуклеарными клетками крови человека в различных условиях 48-ч культивирования *in vitro*, Me[Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>], n=6

Изучаемые показатели/ группы	Гомеостатическая модель культивирования		Активационная модель культивирования	
	2D-культура клеток	3D-культура клеток	2D-культура клеток	3D-культура клеток
	1	2	3	4
<b>Eotaxin</b>	17,34 [13,10; 18,33]	23,63 [14,41;43,34] p <sub>1-2</sub> >0,05	22,86 [22,52;23,70] p <sub>1-3</sub> <0,05	54,20 [48,36; 64,74] p <sub>3-4</sub> <0,05 p <sub>2-4</sub> >0,05
<b>G-CSF</b>	23,20 [20,90; 32,30]	967 [421; 2993] p <sub>1-2</sub> <0,05	286 [284; 292] p <sub>1-3</sub> <0,05	811 [648; 3499] p <sub>3-4</sub> <0,05 p <sub>2-4</sub> >0,05
<b>GM-CSF</b>	118 [75,99; 121]	141 [123; 175] p <sub>1-2</sub> <0,05	182 [152;194] p <sub>1-3</sub> <0,05	411 [327; 513] p <sub>3-4</sub> <0,05 p <sub>2-4</sub> <0,05
<b>VEGF</b>	69,20 [64,60; 85,78]	59,84 [31,32; 151] p <sub>1-2</sub> >0,05	245 [198; 267] p <sub>1-3</sub> <0,05	367 [341; 410] p <sub>3-4</sub> <0,05 p <sub>2-4</sub> <0,05
<b>IL-7</b>	22,18 [18,66; 23,54]	12,94 [7,93; 28,56] p <sub>1-2</sub> >0,05	7,03 [4,88;17,19] p <sub>1-3</sub> <0,05	21,23 [15,24; 28,70] p <sub>3-4</sub> >0,05 p <sub>2-4</sub> >0,05

#### 3.4. Оценка относительной экспрессии генов дифференцировки и пролиферации в культурах мононуклеарных клеток крови в условиях сокультивирования с трехмерным матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани

T-лимфоциты в составе неприлипающей фракции МНК крови человека после 48-ч *in vitro* контакта с 3D-матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани (3D-гомеостатическая модель), показали 1-2-кратное увеличение экспрессии генов и дифференцировки (*Gfi1*, *hnRNPLL*, *U2f114*) и пролиферации (*ki-67*), не достигавшей, однако, статистических различий с

соответствующими показателями 2D-гомеокультуры МНК (таблица 10). При этом в гомеостатической модели не удалось обнаружить транскрипцию *hTERT*, гена теломеразной обратной транскриптазы, регулирующего процессы клеточного деления (таблица 10). Поддержание теломерной активности необходимо для сохранения пролиферативных ответов Т-клеток (Patrick M. S., 2019).

*Gfi1* (независимый от фактора роста 1 транскрипционный репрессор) участвует в дифференцировке и активации субпопуляций зрелых периферических Т-клеток. Помимо того, важен для правильного функционирования и развития CD4 Т-клеток (Pargmann D. et al., 2007). Пик экспрессии наблюдается в клетках во время бета-отбора (Yücel R. et al., 2004).

*U2af114* кодирует РНК-связывающий белок, который функционирует как фактор сплайсинга пре-мРНК, участвует в регуляции альтернативного сплайсинга пре-мРНК. Действует как антагонист *Gfi1*, активируя пропуск экзона при сплайсинге во время активации Т-клеток (Yurova K. A. et al., 2016).

*hnRNPLL* - основной регулятор индуцированного активацией альтернативного сплайсинга в Т-клетках. В частности, он изменяет сплайсинг рецептора CD45, необходимого для развития и активации Т-клеток (Oberdoerffer S., 2008).

Аналогичное слабое влияние 3D-матрикса на экспрессию генов дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов (*Gfi1*, *hnRNPLL*, *U2af114*) имело место в присутствии активирующего комплекса (антител к CD2CD3CD28 антигенам) (3D-активационная модель; таблица 10). В тоже время, двукратно ( $p < 0,05$ ) возрастал уровень транскрипции РНК генов *hTERT* и *ki-67*, ответственных за пролиферативный потенциал и активацию Т-клеток (Gu J. et al., 2002; Soares A. et al., 2010). *ki-67* широко используется в качестве маркера для оценки пролиферации клеток, так как он обнаруживается только в ядре пролиферирующих клеток (Richards-Taylor S. et al., 2016).

Таким образом, структурный неиммуногенный 3D-матрикс, имитирующий минеральное вещество регенерирующей костной ткани, проявляет эпигеномное воздействие только на гены-регуляторы пролиферации и только после стимуляции Т-клеток гуморальным активатором, симулирующим сигналинг АПК. Полученные данные подтверждают нашу гипотезу, что используемые образцы с КФ рельефным покрытием являются раздражителем, действующим в физиологическом диапазоне.

Таблица 10 - Уровни относительной экспрессии генов дифференцировки и пролиферации Т-клеток человека в различных условиях 48-ч культивирования *in vitro*

Тестируемый ген	Маркировка	3D-гомеостатическая модель	3D-активационная модель
Маркеры клеточной дифференцировки и созревания			
<i>Gfi1</i>	Э H0	<b>1,240</b> 0,361	<b>1,070</b> 0,438
<i>hnRNPLL</i>	Э H0	<b>1,090</b> 0,500	<b>1,278</b> 0,056
<i>U2af114</i>	Э H0	<b>1,274</b> 0,543	<b>0,936</b> 0,694
Маркеры клеточной пролиферации			
<i>ki-67</i>	Э H0	<b>2,353</b> 0,426	<b>2,226*</b> 0,010
<i>hTERT</i>	Э H0	0	<b>2,219*</b> 0,024

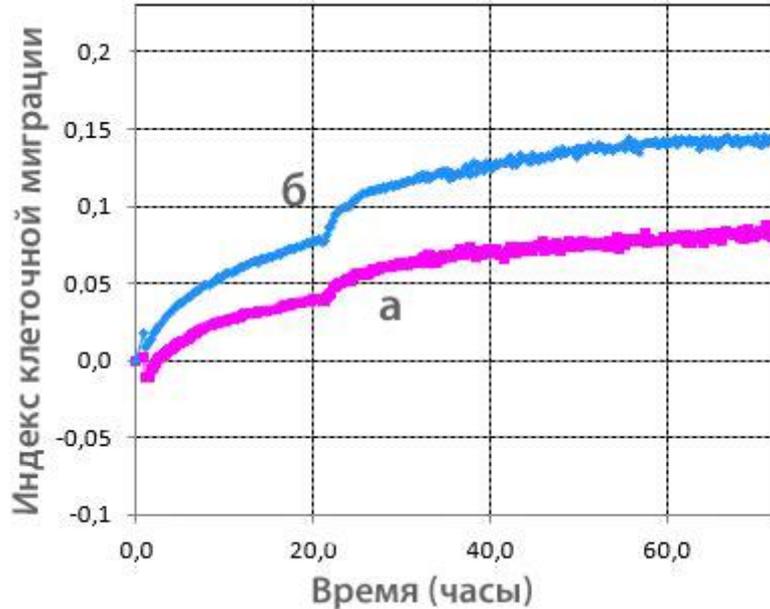
Примечание: Э – кратность (разы) экспрессии относительно референсного гена *RPLPO* получены при помощи оценки стандартной ошибки (SE) с помощью алгоритма Тейлора; H0 – значение нулевой гипотезы ( $p < 0,05$ , Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test); значения рассчитаны по 6 измерениям.

### 3.5. Исследование динамики инвазивной активности культур мононуклеарных клеток крови человека

Большинство клеток в культурах МНК, полученных из периферической крови здоровых доноров, на 99,5 [98,5; 99,8]% имели иммунофенотип CD3<sup>+</sup>, что соответствует иммунофенотипу Т-клеток. Согласно данным RTCA мониторинга миграции МНК в реальном времени (рисунок 5), клетки крови в течение 72 ч способны постепенно проникать через микропоры (8 мкм диаметром), по-видимому, под действием сил тяжести и поверхностного натяжения. Как следствие, индекс клеточной миграции возрастал с 0 до 0,1 условной единицы (рисунок 5а).

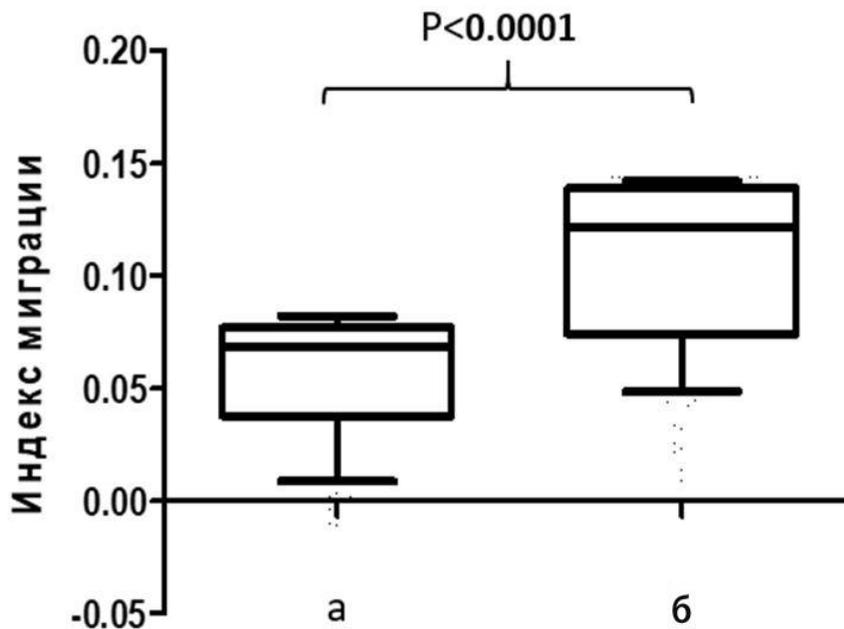
Актиновый цитоскелет лимфоцитов считается центральным медиатором формирования и созревания иммунологического синапса, его сигнальной и цитолитической активности (Wurzer H. et al, 2019). В этом плане интересными являются результаты, представленные на рисунке 5б. МНК, стимулированные Т-клеточным активатором, интенсивнее осуществляют инвазию через

микропористую мембрану на протяжении всего периода наблюдений ( $T < 0,05$ ). К окончанию эксперимента (72-ч наблюдения) индекс миграции (МИ) в 1,5 раза превышал соответствующее значение в гомеостатической культуре (рисунки 13-14).



**Рисунок 13.** Изменения импеданса системы RTCA, отражающей индекс миграции МНК через микропористую мембрану в направлении к бесклеточной питательной среде в течение 72 часов: а) спонтанная инвазия клеток; 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<sup>+</sup> лейкоцитов, что позволяет им активнее проникать через микропористую мембрану, имитирующую стенку кровеносных сосудов.



**Рисунок 14.** Значения индекса миграции (Me; Q1-Q3) через микропористую мембрану в направлении к бесклеточной питательной среде через 72 ч RTCA мониторинга: а) спонтанная инвазия МНК; б) миграция клеток, стимулированных MACSiBead™ Т-клеточным активатором.

## РЕЗЮМЕ

3D-матрицы с КФ покрытием, имитирующие минеральное вещество регенерирующей костной ткани, являются структурным раздражителем, запускающим физиологические механизмы адаптации культуры МНК через механизмы гиперактивации и последующей гибели неприлипающей части популяции (преимущественно, Т-лимфоцитов). Установлена синергичность описанных эффектов в условиях 48-ч *in vitro* культивирования МНК, стимулированных как гуморальным Т-клеточным активатором, так и структурным раздражителем (3D-активационная модель клеточного культивирования). В основе гиперактивации/гибели части клеток культуры МНК лежит выраженное синергичное стимулирующее влияние Т-активатора и 3D-раздражителя на секрецию сети цитокинов/хемокинов, в первую очередь, факторов с про- и противовоспалительным действием.

При этом 3D-матрикс способен модулировать (усиливать/ослаблять) иммуногенные свойства Т-клеточного активатора, моделирующего сигналинг АПК. Однако, структурный неиммуногенный 3D-матрикс, имитирующий минеральное вещество регенерирующей костной ткани, проявляет эпигеномное

воздействие только на гены-регуляторы пролиферации, но не дифференцировки Т-клеток и только после стимуляции Т-клеток гуморальным активатором, симулирующим сигналинг АПК.

В связи с этим, общей субклеточной мишенью для использованных раздражителей может быть клеточный цитоскелет, поскольку активатор Т-клеток, симулирующий сигналинг АПК, способствует активизации процессов миграции МНК через микропористую мембрану, имитирующую стенку кровеносных сосудов.

В плане интерпретации полученных данных, экспериментальное *in vitro* 3D-моделирование эффектов и кооперации Т-лимфоцитов, сигналов АПК на границе раздела клетки/поверхность регенерирующей кости приводит к новым фундаментальным знаниям в области физиологии ремоделирования костной ткани. 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 (двумерной стационарной) культуре *in vitro*.

#### ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Каскады реакций, направленные на устранение изменений констант гомеостаза в ответ на раздражители, запрограммировано запускают иммунный ответ и реализуются клетками иммунной системы (Хаитов Р.М., 2009; Ярилин А.А., 2010; Bel S., Hooper L.V., 2015; Harris N., 2015). Имунокомпетентные клетки крови, в частности, и иммунная система, в целом, принимают непосредственное участие в процессах как физиологического, так и репаративного остеогенеза, что, в конечном итоге, приводит к регенерации/ремоделированию костной ткани и приживлению имплантата. 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). В связи с этим, в последние годы сформировалась новая концепция, получившая название "остеоиммунология" (Arron J.R., Choi Y., 2000; Greenblatt M.B., Shim J.H. 2013). Однако, значительно возросшая публикационная активность в области исследования клеточно-молекулярных механизмов воспаления в костной ткани, индуцированных иммунокомпетентными клетками (Humbert P. et al., 2019) связана, преимущественно, с *in vitro* исследованиями в стационарной 2D-культуре клеток.

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

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

В связи с вышесказанным, 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). Помимо биологических и химических сигналов (таких, как факторы роста, гормоны и химические вещества), важными регуляторами, влияющими на поведение клеток, являются физические факторы, включающие, например, топографию и твердость/эластичность поверхности, с которой контактируют клетки (Nikkhah M. et al., 2012; Kim H.N. et al., 2013; Dalby M.J. et al., 2014). Клетки существуют в сложных отношениях с ЭЦМ в качестве основного компонента микроокружения. ЭЦМ различных тканей, таких как кость (Mehlhorn A.T. et al., 2006), хрящ (Kisiday J. et al., 2002) или кровеносные сосуды (Damsky C.H. et al., 1992) состоит из структурно-функциональных паттернов в микро- и наномасштабе.

Недавние исследования показали, что топографические характеристики материала, такие как размер, форма и геометрия, оказывают значительное контактное влияние на адгезию, миграцию, функциональное состояние и дифференциацию многих клеток (Lee J. et al., 2013; Abagnale G. et al., 2015; Song X. et al., 2018; Wang J. et al., 2018). С другой стороны, продукты биodeградации КФ материалов, преимущественно, ионы кальция и неорганического фосфора, способны оказывать выраженный дистантный регуляторный эффект на культивируемые клетки (Шаркеев Ю.П. и др., 2014).

Лейкоциты крови являются одними из первых клеток, мигрирующих в участок физиологической и, в большей степени, репаративной регенерации костной ткани (Loin F. et al., 2016; Schell H. et al., 2017). При этом, в случае растянутой во времени на 3-10 лет (Риггз Б.Л., Мелтон III Л. Дж. 2000) физиологической мозаичной регенерации кости в оптимальных условиях жизнедеятельности организма, иммунокомпетентные клетки (прежде всего, Т-лимфоциты) малоактивны (Гольдберг Е.Д. и др., 1996). Для исследования закономерностей функционирования МНК в подобных условиях была разработана *in vitro* 3D-гомеостатическая модель сокультивирования иммунных клеток с

искусственным ЭЦМ, имитирующим в трехмерном масштабе минеральное вещество костной ткани.

При репаративной регенерации включаются механизмы адаптации к экстремальному раздражителю, вызвавшему повреждение, что активизирует локальное микроокружение костного мозга, которое, посредством гуморальных факторов, способствует усиленной инфильтрации тканей клетками крови (Гольдберг Е.Д. и др., 1996). Такую физиологическую ситуацию мы экспериментально моделировали с помощью молекулярно-биологического подхода, названного "активационной" моделью и основанного на антиген-независимой активации Т-лимфоцитов, достигаемой добавлением в *in vitro* культуру МНК Т-клеточного активатора (T-cell activation/expansion kit human), содержащего частицы с лигандами к CD2CD3CD28 антигенам, которые симулируют процесс стимуляции Т-клеток антиген-презентирующими клетками (АПК). Для костной ткани применялась комбинация гуморального сигнала АПК с 3D-матриксом, имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани.

#### **4.1 Поведение МНК крови человека в 2D-гомеостатической культуре *in vitro***

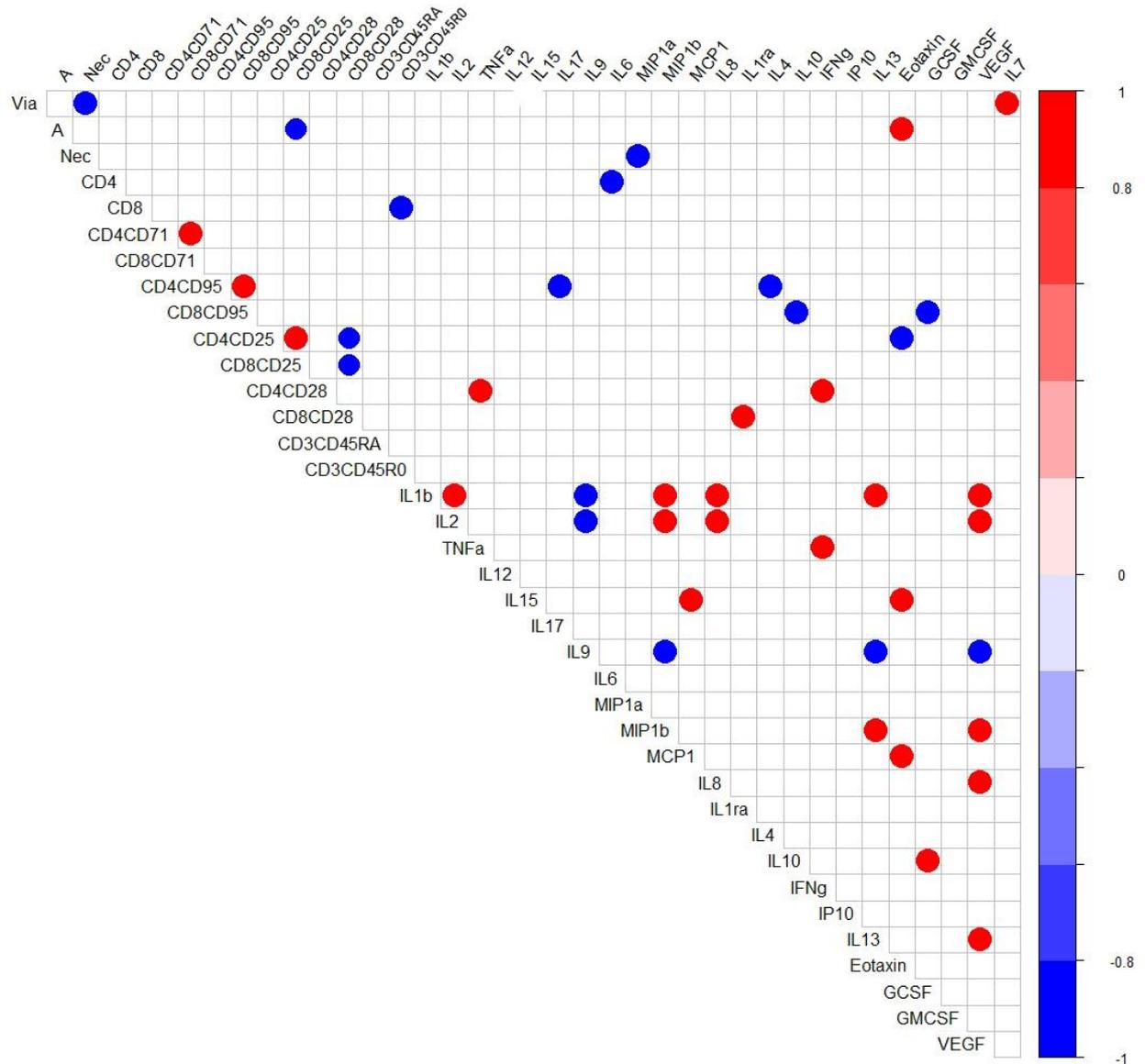
Гомеостатическая регуляция числа иммунных клеток является важным биологическим принципом. Механизмы поддержания и восстановления гомеостаза в иммунной системе включают взаимодействия между АПК, регуляторными Т-клетками и цитокинами. Метаболический статус наивных CD45RA<sup>+</sup> Т-клеток значительно отличается от их активированных аналогов. Так, наивные Т-клетки поддерживают состояние покоя посредством вовлечения внутриклеточных сигнальных путей и внешних сигналов (Hua X., Thompson C.B., 2001), что приводит к эффективному использованию доступных источников энергии (Fox C.J. et al., 2005). По сути, непримированные антигеном наивные лимфоциты поддерживают катаболическое состояние с ограничением секреторной активности (Jones R.G., Thompson C.B., 2007).

Действительно, в обычных условиях 48-ч стационарного *in vitro* культивирования на пластиковой поверхности культуральной посуды 2D-гомеостатическая культура неприлипающих МНК крови человека более чем на 98 % состояла из CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Клеточная культура сохраняла хорошую

жизнеспособность (таблица 5), на 55 % была представлена CD45RA<sup>+</sup> наивными (не активированными антигеном) CD4<sup>+</sup> (67 %) и CD8<sup>+</sup> (22 %) Т-клетками, которые экспрессировали CD28 молекулу дифференцировки, способствующую их длительному выживанию (таблица 6). Секреторная активность поддерживалась, в основном, на низком уровне (1-100 пг/мл) для большинства цитокинов. Всплеск выделения хемокинов IP-10 и IL-8 (таблица 7) мог быть обусловлен необходимостью клеточной миграции (рисунок 13) для заселения площади лунок культуральной посуды.

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. Согласно рисунку 15, обнаружены 42 сильные ( $r > 0,8$ ) корреляции, из которых 17 - отрицательные и 25 - положительные.

Корреляционный анализ данных позволил установить, что в гомеостатической 2D-модели (культивирование МНК на пластиковой поверхности культурального планшета) клеточные реакции можно отобразить в виде слабо связанных друг с другом 5 кластеров (рисунки 16-19), которые свидетельствуют о разобщенности жизнедеятельности клеточной культуры.



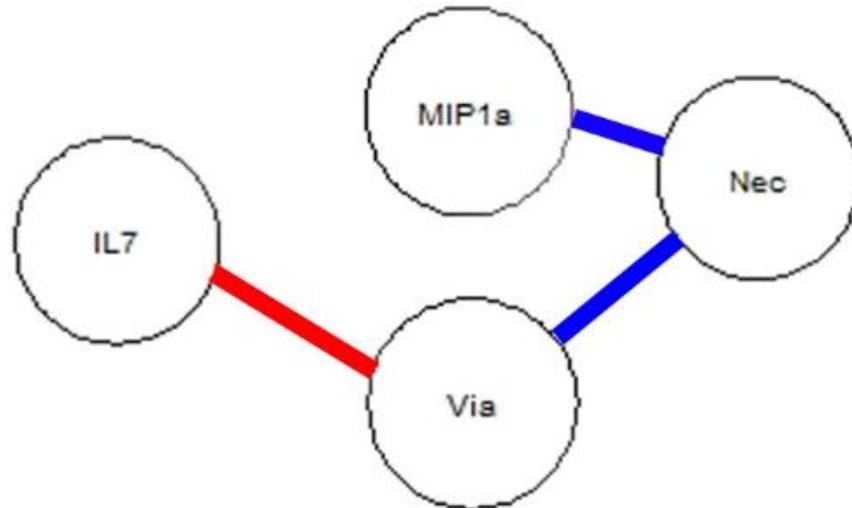
**Рисунок 15.** Корреляционные взаимосвязи исследуемых клеточно-молекулярных показателей культуры МНК в гомеостатической 2D-модели.

Красным цветом отмечены сильные положительные корреляции, синим цветом – отрицательные с коэффициентом корреляции не ниже 0,8 ( $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ).

Корреляционный кластер № 1 (рисунок 16) демонстрирует логичную сильную отрицательную взаимосвязь между количеством живых (Via) и мертвых, некротически измененных клеток (Nec). Достаточно неожиданной является негативная связь концентрации в культуре хемокина MIP1a (CCL3), фактора хемотаксиса, инвазии, и доли погибших клеток. Конечно, лимфоциты способны секретировать данный хемокин (Maurer M., von Stebut E., 2004) и реагировать на него (Menten P. et al., 2002), возможно, по ауто- и/или паракринному механизму. В качестве интерпретации полученного результата можно предположить, что

молекулярные сигналы, необходимые для реализации потенциала клеточного цитоскелета, поддерживают жизнеспособность МНК в культуре *in vitro*.

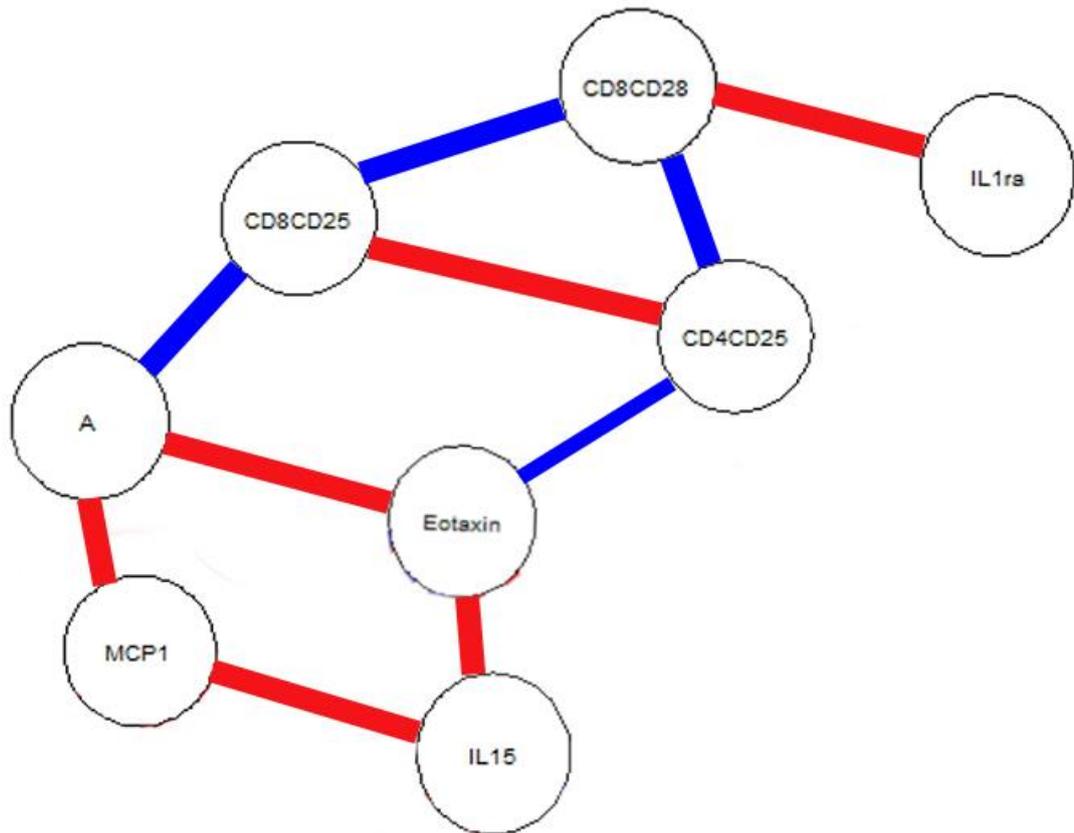
В свою очередь, прямая корреляция клеточной выживаемости с секрецией IL-7 соответствует известной физиологической роли данного лимфопоэтина и главного комплекса гистосовместимости для жизнедеятельности CD3<sup>+</sup>CD45 RA<sup>+</sup> (таблица 6) наивных Т-лимфоцитов (Unsinger J. et al., 2010; Ribeiro D. et al., 2018).



**Рисунок 16.** Схема корреляционных связей в гомеостатической 2D-модели (корреляционный кластер № 1) культуры МНК крови человека. Красным выделены положительные, синим – отрицательные корреляции. Представлены значения  $r > 0,8$ .

Сигналы IL-7 не индуцируют пролиферацию, но позволяют клеткам длительно выживать в состоянии покоя (Surh C. D. et al., 2006). IL-7 относится к семейству цитокинов типа I, которые разделяют  $\gamma$ -цепь общего рецептора цитокинов ( $\gamma_c$ ) в качестве ключевого рецепторного компонента. Помимо наивных Т-клеток, IL-7 регулирует фоновую пролиферацию и выживаемость CD4<sup>+</sup> клеток, тогда как для CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов важны как IL-7, так и IL-15 (Le Saout C. et al., 2017).

В комплексе с другими гуморальными сигналами (IL-1ra, Eotaxin, MCP-1) IL-15 принимает опосредованное участие в регуляции жизнеспособности и межклеточной кооперации CD25 и CD28 фракций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток (рисунок 17; корреляционный кластер 2).



**Рисунок 17.** Схема корреляционных связей в гомеостатической 2D-модели (корреляционный кластер № 2) культуры МНК крови человека. Красным выделены положительные, синим – отрицательные корреляции. Представлены значения  $r > 0,8$ .

Сложность и многогранность клеточных эффектов цитокиновой и хемокиновой сети может отчасти объяснить парадокс, что, в отличие от MIP-1a (рисунок 16), хемотаксические молекулы Eotaxin и MCP-1 способствуют в гомеостатической 2D-культуре клеточной смерти путем апоптоза МНК, но не CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, несущих CD25 рецептор к IL-2 (рисунок 17).

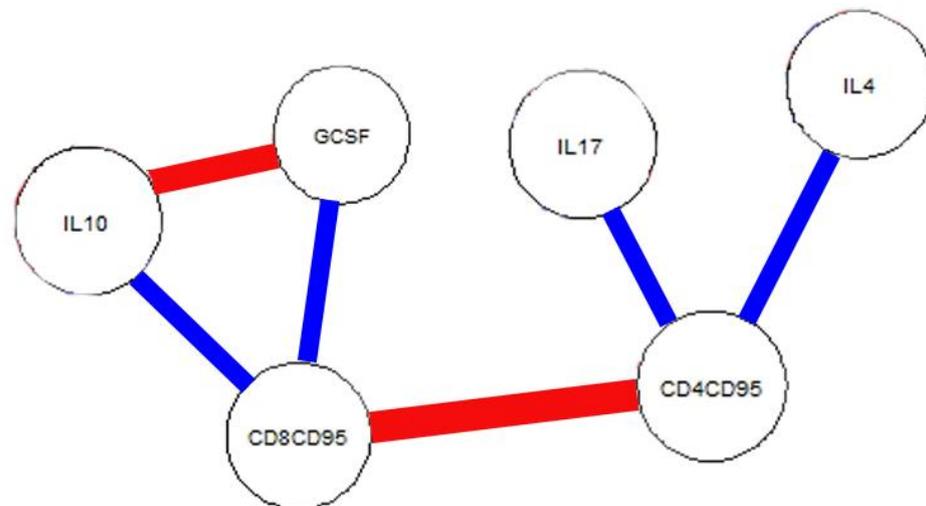
Плейотропный IL-15, лиганд  $\gamma$ -цепи рецептора IL-2, является важным цитокином природного и адаптивного иммунитета (Симбирцев А.С. 2018; Lodolce J.P. et al., 2002), а также прямым ингибитором апоптоза лимфоцитов (Malamut G. et al., 2010). Тем не менее, согласно рисунку 17, цитокин в гомеостатических условиях может выступать триггером секреции проапоптотических хемокинов. В то же время, низкие (1-100 пг/мл) уровни секреции Eotaxin, MCP-1 и IL-15 (таблицы 7,9) обеспечивают и незначительную долю (1-2 %) клеточной смерти путем апоптоза в культуре (таблица 5).

Противоречивость эффектов IL-15 обнаружена и в отношении CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В частности, Т.Уајіма и др. (2006) показано, что антиген-специфические

клетки  $CD8^+$  подвергались меньшей гибели во время фазы супрессии иммунного ответа при воздействии повышенных уровней IL-15 (Yajima T. et al., 2006). Это противоречит данным группы F.Melchionda и др. (2005), согласно которым введение rhIL-15 приводило к усилению апоптоза  $CD8^+$  Т-клеток во время фазы супрессии (Melchionda F. et al., 2005)

По-видимому, в стандартной клеточной культуре (гомеостатическая 2D-модель) IL-15 (Т-клеточный фактор роста) (Steel J.C. et al., 2012) способен поддерживать выживаемость и обеспечивать клоновую селекцию  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток, несущих CD25 рецептор к IL-2.

Корреляционный кластер №3, представленный на рисунке 18, включал сильные корреляционные взаимосвязи между цитокинами и факторами роста, секретируемыми МНК в гомеостатической 2D-культуре, и экспрессией CD95 антигена.



**Рисунок 18.** Схема корреляционных связей в гомеостатической 2D-модели (корреляционный кластер № 3) культуры МНК крови человека. Красным выделены положительные, синим – отрицательные корреляции. Сила корреляционных взаимосвязей в пределах значений  $r > 0,8$  выделена шириной линии, соединяющей показатели.

CD95 (FAS/APO-1) известен своей проапоптотической (в клетках, имеющих домен смерти в FAS рецепторе) и антиапоптотической активностью, непосредственно связанной с активацией Т-клеток (Paulsen M., Janssen O., 2011), которая реализуется в зависимости от сигналов, приходящих в клетку. В кластере

№3 выделяются два связанных подкластера, обусловленных клеточно-молекулярной активностью CD8CD95<sup>+</sup> или CD4CD95<sup>+</sup> Т-клеток (рисунок 18).

CD8CD95<sup>+</sup> Т-лимфоциты негативно регулируются в стандартной 2D-культуре концентрациями IL-10 и G-CSF, в то время как CD4CD95<sup>+</sup> Т-клетки - уровнями IL-4 и IL-17 (рисунок 18). IL-10 проявляет антиапоптотические (Cohen S. V.A. et al., 1997) и противовоспалительные (Oral H.V. et al., 2006) свойства, но в отношении CD8 имеет противоречивые эффекты. Так, IL-10 необходим для оптимальной работы CD8 эффекторов и клеток памяти (Foulds, K.E. et al., 2006). В то же время, CD8<sup>+</sup> Т-клетки, примированные в присутствии IL-10, демонстрировали снижение вторичных ответов (Kang S. S., Allen P. M., 2005).

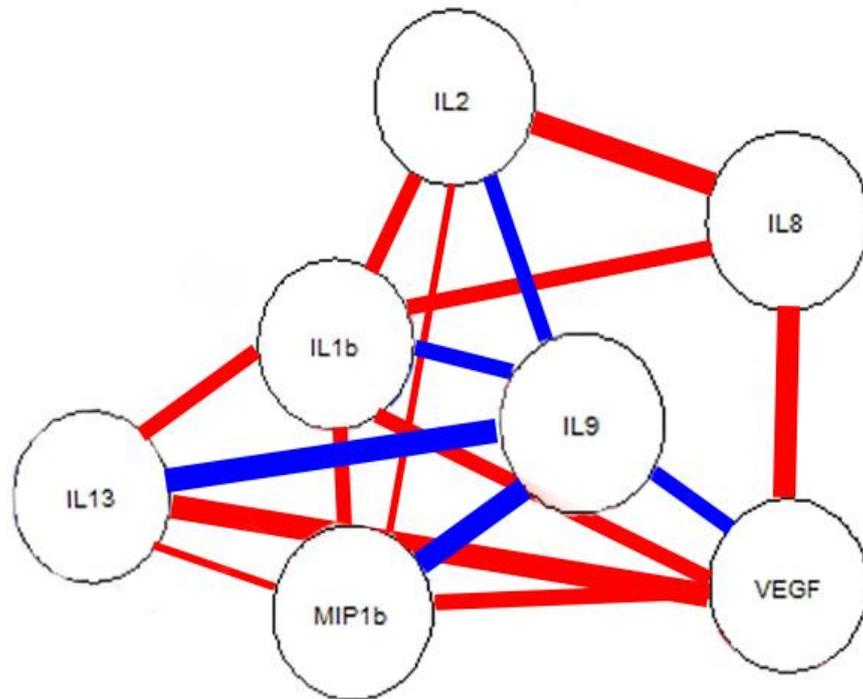
IL-17 продуцируется, главным образом, CD4<sup>+</sup> активированными Т-клетками и клетками памяти, экспрессируется и секретируется Т-хелперами 1-го типа (Th1) (Tsokos G., 2020). IL-4 реципрокно Th1 клеткам индуцирует дифференцировку наивных CD4<sup>+</sup> Т-хелперов в клетки 2-го типа (Th2) и поддерживает их пролиферацию (Симбирцев А.С., 2018).

Вероятно, низкие (1-100 пг/мл) концентрации анализируемых факторов (IL-4, IL-10, IL-17, G-CSF) в 2D-культуре МНК (таблица 7-9) поддерживают на незначительном уровне долю активированных/апоптотических CD8 (1-2 %) и CD4 (10-12 %) Т-клеток (таблица 6).

Корреляционный кластер № 4 (рисунок не показан) включал в себя сильные ( $r > 0,8$ ;  $p < 0,05$ ) положительные корреляции между Т-клетками с иммунофенотипом CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, содержанием TNF-а и IFN-g. CD28 является костимулятором активации Т-лимфоцитов и может приводить к секреции провоспалительных цитокинов, в частности, TNF-а (Tyagi A.M. et al., 2011). Наша интерпретация корреляционных связей основана на результатах, согласно которым высокий процент (76,38 %) CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-клеток в гомеостатической 2D-культуре (таблица 6) сопровождался средней секрецией (0,1-1 нг/мл; таблица 7) молекул TNF-а (103 пг/мл) и IFN-g (291 пг/мл) с синергичным провоспалительным эффектом (Del M. et al., 1998; Salim T. et al., 2016; Mehta N. N. et al., 2017).

Корреляционный кластер №5 включает в себя корреляционную матрицу между воспалительными интерлейкинами, хемокинами (IL-8, (C-X-C мотив) лиганд 8, CXCL8; MIP-1b) и фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) (рисунок 19). Она отражает цитокиновую сеть, помогающую клеточной культуре

реагировать на раздражители, воссоздавать свое микроокружение и выживать в условиях *ex vivo*.



**Рисунок 19.** Схема корреляционных связей в гомеостатической 2D-модели (корреляционный кластер № 5) культуры МНК крови человека. Красным выделены положительные, синим – отрицательные корреляции. Сила корреляционных взаимосвязей при  $r > 0,8$  выделена шириной линии, соединяющей показатели.

С точки зрения концентрации в гомеостатической 2D-культуре МНК крови человека, превалирующим является IL-8 (3825 пг/мл) с высоким (более 1 нг/мл) уровнем секреции согласно классификации van den Broek et al. (2014). С точки зрения числа корреляционных связей - IL-1b (6 связей; рисунок 19). Секреция IL-8 может активироваться при свертывании крови в процессе манипуляций с клетками крови *ex vivo* (Симбирцев А.С., 2018). С другой стороны, присутствие IL-8 необходимо для нормальной жизнедеятельности и хемотаксиса Т-клеток (Wong H. R. et al., 2011). MIP-1b (CCL-4; 91,8 пг/мл в культуре согласно таблице 7) также способствует миграции Т-лимфоцитов и их взаимодействию с дендритными клетками (Симбирцев А.С., 2018). Полученные результаты позволяют предполагать данные хемокины в качестве основных активаторов фоновой инвазии Т-лимфоцитов через модельную стенку кровеносного сосуда (рисунок 13), что

подразумевает также их миграцию при освоении МНК пространства культуральной посуды при стандартном культивировании на пластике.

IL-1b относится к суперсемейству интерлейкина-1, одного из белков острой фазы воспаления и главного участника провоспалительных процессов. IL-2 инициирует Th1-зависимый клеточный иммунитет, IL-9 и IL-13 являются цитокинами гуморального иммунного ответа (Симбирцев А.С., 2018).

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. Развивается молекулярная кооперация Т-лимфоцитов на основе эволюционно заложенных физиологических механизмов. Центральное место среди них занимает цитокиновая сеть, способствующая гибкой реализации вариантов воспалительной реактивности и адаптации клеток иммунной системы (Черешнев В.А., Гусев Е.Ю., 2001).

В последние годы все больше уделяется внимание хемокинам, которые принимают активное участие в кооперации клеток врожденного и приобретенного иммунитета (Фрейдлин И.С., 2011). В этом плане 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*.

Однако, в основном низкие уровни секреции других сигнальных молекул (таблицы 7-9) сохраняют определенную разобщенность клеточных компартментов (рисунки 16-19), что характерно для иммунокомпетентных и кроветворных клеток в организме в оптимальных условиях его существования (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.

## 4.2 Поведение МНК крови человека в 2D-активационной культуре *in vitro*

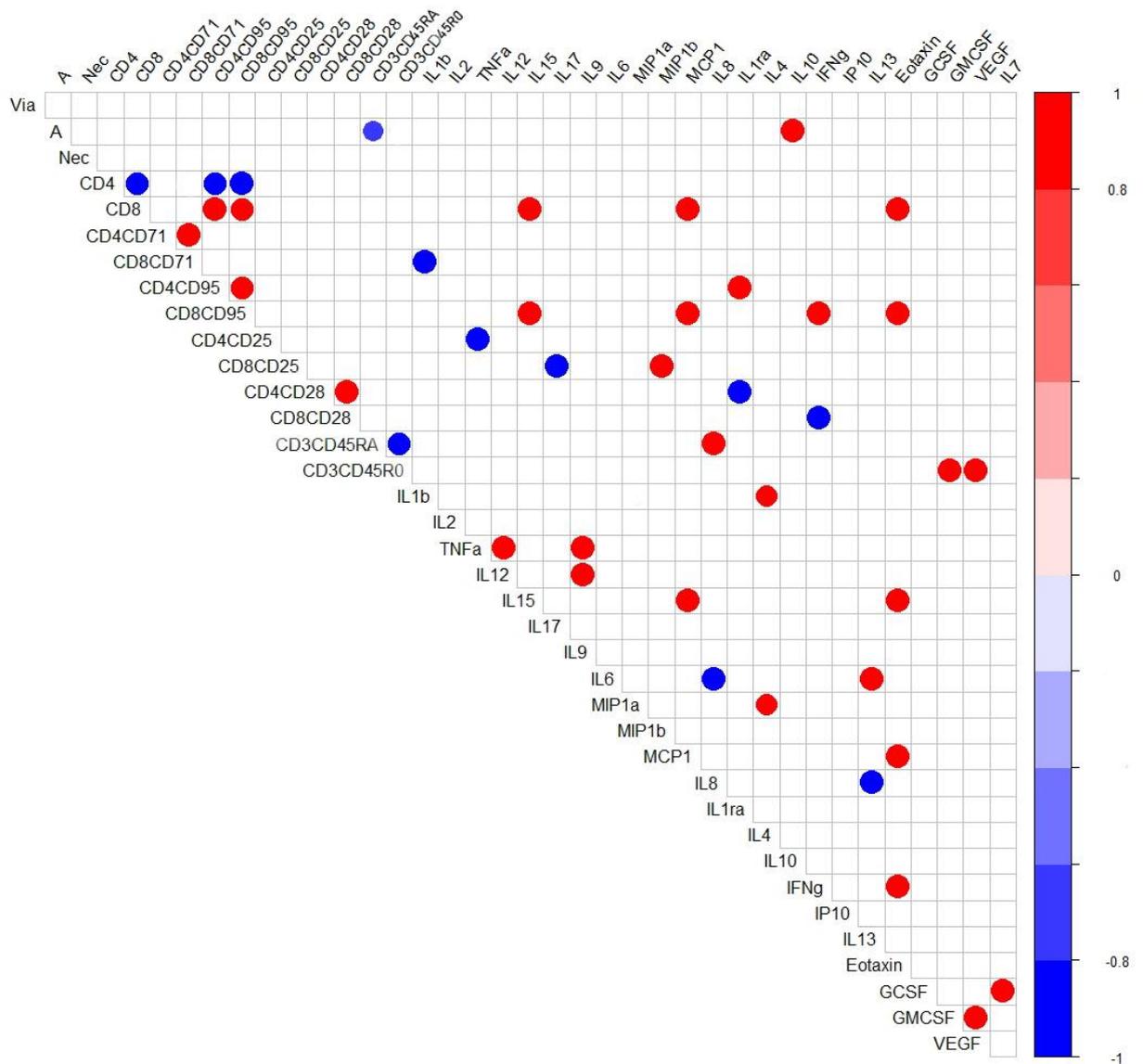
Стимуляция Т-лимфоцитов *in vitro* широко применяется для усиления их экспансии и изучения функций. Антитела, специфичные для комплекса TCR-CD3, обеспечивают исходный сигнал активации, но пролиферация Т-клеток зависит от костимулирующего сигнала, обычно предоставляемого через молекулу CD28 (Frauwirth K.A., Thompson C.B., 2002). В связи с этим, активационная модель 2D-культивирования клеток в стандартной культуре на пластиковой поверхности культуральных планшетов достигалась, согласно (Юрова К.А. и др., 2015), путем добавления анти-биотинных MACSiBead™ частиц T-Cell Activation/Expansion Kit human (частицы с лигандами к CD2, CD3 и CD28) к исследуемым клеткам. Данная модель отражает процесс антиген-независимой стимуляции МНК, в первую очередь, Т-лимфоцитов, имитирующей сигналы АПК.

При введении в культуру МНК частиц активирующего комплекса (гуморального активатора) ОКК статистически значимо возрастало до 182 % при снижении (на 7 %) доли жизнеспособных МНК вследствие усиления их гибели путем апоптоза (на 0,9 %) и некроза (на 4,5 %) в сравнении с гомеостатической 2D-культурой (таблица 5). Наблюдаемое снижение жизнеспособности после активации антителами некоторые авторы связывают с гибелью не Т-клеток, а присутствующих в культуре остальных фракций моноклеарных клеток (Trickett A., Kwan Y. L., 2003). Однако, рост ОКК (т.е. экспансия клеточной культуры) позволил считать повышенную гибель части непрлипающих МНК как известный феномен "смерть клетки через гиперактивацию" (Massanella M. et al., 2010).

Об активации и усилении реактивности МНК в культуре *in vitro* свидетельствовали существенные изменения CD профиля Т-клеток (таблица 6) и повышение секреции (в единицы-десятки-сотни раз) практически всех тестируемых медиаторов (за исключением IL-2) по сравнению с гомеостатической 2D-моделью (таблица 7-9).

Согласно рисунку 12, в активационной 2D-культуре МНК обнаружены 43 сильные ( $r > 0,8$ ) корреляции, из которых 12 - отрицательные и 31 - положительные. Гуморальный Т-клеточный активатор, в сравнении с гомеостатической 2D-моделью (рисунок 20), вызывает в системе

перераспределение качественных клеточно-молекулярных взаимоотношений в пользу прямых связей показателей.

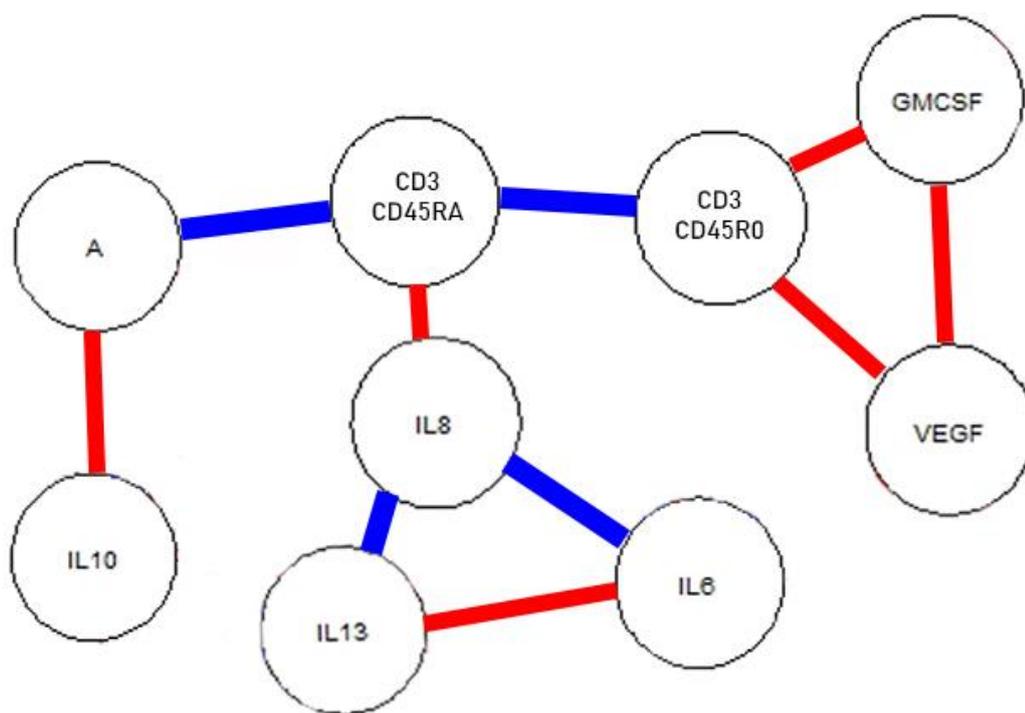


**Рисунок 20.** Корреляционные взаимосвязи исследуемых клеточно-молекулярных показателей культуры МНК в активационной 2D-модели.

Красным цветом отмечены сильные положительные корреляции, синим цветом – отрицательные с коэффициентом корреляции ( $r$ ) не ниже 0,8 ( $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ).

Интересен тот факт, что усиление процессов клеточной гибели путем апоптоза (таблица 5), индуцированное костимулирующим CD2CD3CD28 сигналом Т-клеточного регулятора, из всех цитокинов, хемокинов и ростовых факторов модулируется (прямая корреляция) только IL-10 (рисунок 21), концентрация которого возрастает в 50 раз (таблица 8). Его уровни соответствуют средним, но не высоким (близким к токсичным) концентрациям медиаторов (см. главу 3), поэтому

требуется биологическая интерпретация полученного результата. 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 действия IL-10 в культуре МНК является регуляция апоптоза активированных клонов.



**Рисунок 21.** Схема корреляционных связей в активационной 2D-модели (корреляционный кластер №1) культуры МНК крови человека. Красным выделены положительные, синим – отрицательные корреляции. Сила корреляционных взаимосвязей в пределах значений  $r > 0,8$  выделена шириной линии, соединяющей показатели.

Для некротических форм МНК в принципе не установлены сильные зависимости с молекулярными показателями активационной 2D-культуры, что предполагает эволюционно заложенные (эпи)генетические механизмы смерти части лимфоидной популяции в ответ на физиологические стимулы по примеру реакции на глюкокортикоидные гормоны (Тодосенко Н.М., 2018).

Действительно, в активированной культуре достоверно (на 3,5 %;  $p < 0,05$ ) возрастало число  $CD45CD3^+RA^+$  наивных (не активированных антигеном) Т-

клеток, которые, по-видимому, в отличие от CD45CD3<sup>+</sup>R0<sup>+</sup> форм, избегали стимуляции процессов апоптоза (отрицательные корреляции показателей при  $r > 0,8$ ; рисунок 20).

Наивные Т-клетки человека фенотипически и функционально неоднородны и могут выполнять различные функции в иммунных реакциях. Не секретировав основные Т-хелперные эффекторные цитокины (включая IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 и IL-22), CD45CD3<sup>+</sup>RA<sup>+</sup> формы экспрессируют высокие уровни хемокина IL-8 (Crespo J. et al., 2018), что в нашем исследовании отражается прямой корреляцией с высокой концентрацией провоспалительного хемокина в супернатантах (таблица 7, рисунок 21).

В свою очередь, выделение IL-8 ингибируется (рисунок 21) усилением (таблица 7) секреции противовоспалительного IL-13 (Foti M., Locati M., 2017), который продуцируется активированными CD8<sup>+</sup> Т-клетками, а также CD4<sup>+</sup> 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 плеiotропными, включая стимуляцию процессов пролиферации и выживания Т-клеток (Yang X.O. et al., 2007). Поэтому корреляционные взаимосвязи с IL-8 и IL-13 (рисунок 21) отражают молекулярные процессы участия наивных CD45CD3<sup>+</sup>RA<sup>+</sup> Т-клеток в регуляции воспалительных и иммунных реакций.

CD45CD3<sup>+</sup>R0<sup>+</sup> Т-клетки имели сильные прямые корреляции с ростовыми факторами гемопоеза и ангиопоеза (рисунок 21). Доля этих клеток не увеличивалась после воздействия Т-активатора, симулирующего сигналинг АПК (таблица 6), концентрации GM-CSF и VEGF росли до средних значений (0,1-1 нг/мл) согласно van den Broek et al. (2014). Логичным выглядит предположение, что CD45CD3<sup>+</sup>R0<sup>+</sup> клетки являются источником данных ростовых факторов в активационной 2D-культуре МНК.

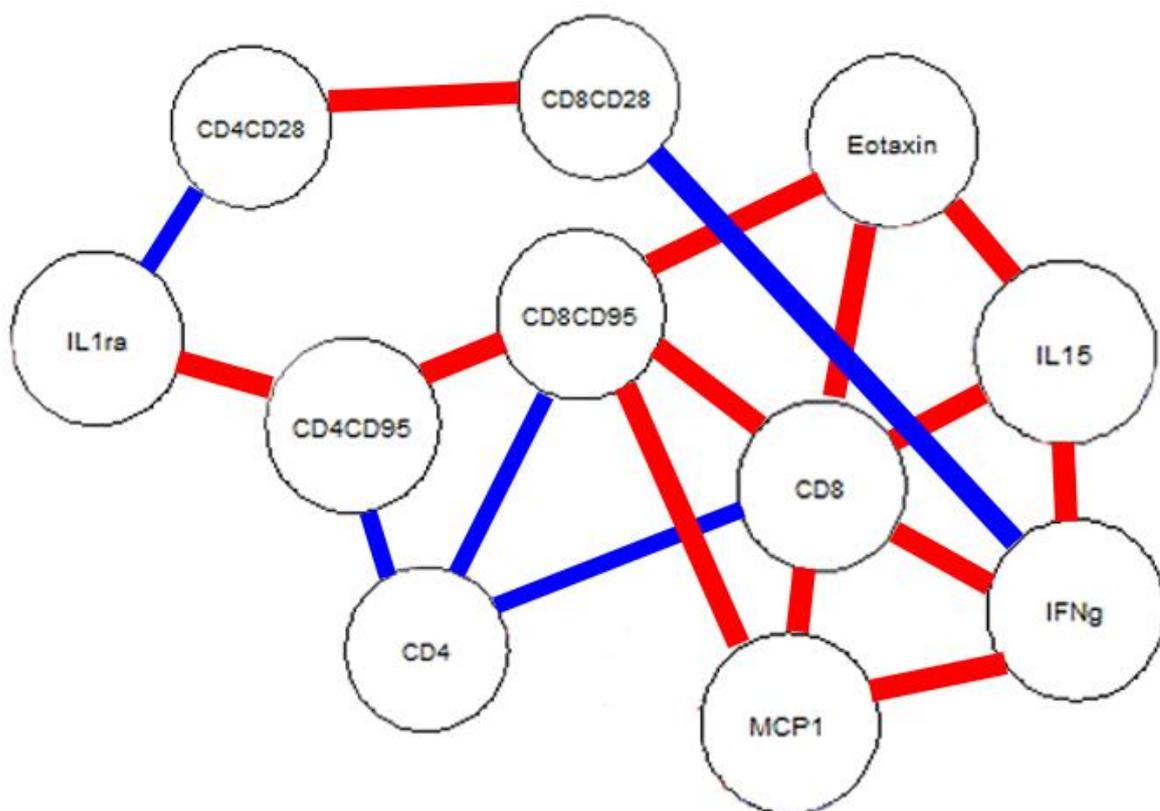
GM-CSF, VEGF и G-CSF, помимо основной функции, служат хемоаттрактантами (Bo L. et al., 2011), непосредственно вовлеченными в воспалительный процесс. Считается, что они играют роль провоспалительных цитокинов, продуцируемых в физиологическом состоянии, а также накапливающихся в поврежденных тканях (Krishnan K. et al., 2011; Sorgi C.A. et al.,

2012) и рекрутирующих нейтрофилы, лимфоциты и моноциты в очаг воспаления, где клетки поддерживают продуктивную фазу воспалительного ответа и регенерацию (Cheknev S. V. et al., 2014). Другими словами, наивные и зрелые Т-клетки уже в течение 48 часов после гуморального стимула, симулирующего сигналинг АПК, секретируют коктейль медиаторов с воспалительными, иммунорегуляторными и регенеративными свойствами.

Это соответствует литературным данным (Loi F. et al., 2016) и находит свое отражение в крупной корреляционной матрице №2 (рисунок 22). Она демонстрирует иммунную сеть (клеточно-молекулярное взаимодействие), формирующуюся после антиген-независимой стимуляции Т-клеточным активатором.

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 МНК, стимулированных Т-клеточным активатором, через модельную стенку кровеносных сосудов, на протяжении всего периода наблюдений (72 часа;  $p < 0,05$ ; рисунки 13-14).

Резюмируя вышесказанное по разделу 4.2, гуморальный Т-клеточный активатор (T-cell activation/expansion kit human), содержащий частицы с лигандами к CD2CD3CD28 антигенам и симулирующий процесс кооперации Т-клеток с АПК, реально активирует иммунокомпетентные клетки и создает локальное молекулярное микроокружение. Гуморальное микроокружение, посредством медиаторов хемотаксиса, способствует усилению клеточной миграции, которая приводит к инфильтрации тканей клетками крови. При этом клеточно-молекулярные кластеры в активационной культуре МНК укрупняются (рисунки 21,22), сигналинг между различными субпопуляциями Т-лимфоцитов усиливается.



**Рисунок 22.** Схема корреляционных связей в активационной 2D-модели (корреляционный кластер №2) культуры МНК крови человека. Красным выделены положительные, синим – отрицательные корреляции. Сила корреляционных взаимосвязей при  $r > 0,8$  выделена шириной линии, соединяющей показатели.

#### 4.3 Поведение МНК крови человека в 3D-гомеостатической культуре *in vitro*

Для экспериментального 3D-моделирования клеточных и гуморальных реакций иммунокомпетентных клеток крови были использованы образцы, несущие рельефное КФ покрытие с индексом шероховатости поверхности Ra (по ГОСТ 2789-73) в диапазоне 2-5 мкм. При таком индексе шероховатости линейный размер впадин в КФ поверхности соответствует блюдцеобразным углублениям (до 40 мкм) (Риггз Б.Л., Мелтон III Л. Дж. 2000), образуемым остеокластами в кости при ее регенерации. Как следствие, возникает возможность *in vitro* симулирования реакции МНК крови на контакт с минеральным матриксом кости в условиях ее ремоделирования.

Модельные 3D-образцы с КФ покрытием в гомеостатической культуре МНК способствовали статистически значимому уменьшению (на 17 %) клеточной жизнеспособности, обусловленному усилением апоптоза (на 0,7 %) и, в большей

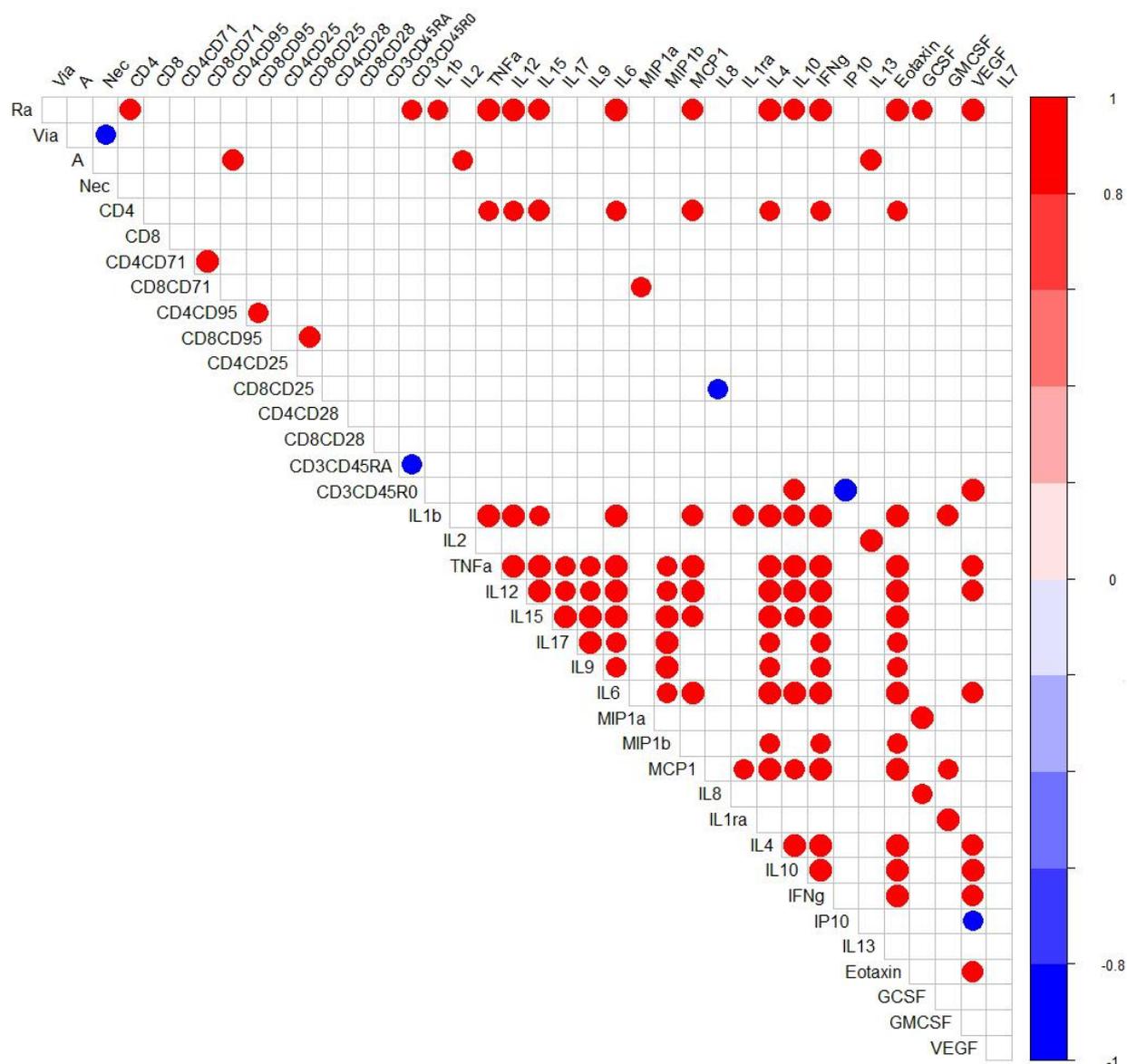
степени, некроза (на 16 %) в сравнении 2D-культурой. Согласно рисунку 23 и таблицы 7-9, апоптоз был связан с  $CD4CD95^+$  Т-клетками и обусловлен 4-кратным возрастанием концентрации IL-2 в сравнении с 2D-культурой клеток крови. IL-2 и IL-15, цитокины с общей  $\gamma$ -цепью (Oreskovic, Z. et al., 2019), секретируются  $CD4^+$  Т-клетками и моноцитами в ответ на активацию (Lin, J. X., Leonard, W. J. 2018).

ОКК (таблица 5), спектр антигенных детерминант (таблица 6) и экспрессия генов (таблица 10) при *in vitro* воздействии 3D-матрикса статистически значимо не менялись, но существенно возрастала секреция 13 биомолекул (таблицы 7-9). Таким образом, 3D-матрикса являются физиологическим раздражителем, запускающим механизмы секреторной гиперактивации и последующей гибели неприлипающей части популяции МНК (преимущественно, Т-лимфоцитов с хелперным фенотипом). Выявлена прямая сильная связь 14 показателей *in vitro* "гомеостаза" 3D-культуры МНК (в том числе, уровня IL-15) с индексом Ra (рисунок 23), отражающим особенности структуры КФ поверхности. Это подчеркивает роль 3D-матрикса как структурных раздражителей культуры МНК.

Несмотря на то, что IL-2 был первоначально обнаружен как фактор роста Т-клеток, он имеет ряд дополнительных функций, а именно дифференцировки Th1 (Liao W. et al., 2011), Th2 (Zhu J. et al. 2003; Cote-Sierra J. et al. 2004; Jeon K. W., 2013) и Th9 (Liao W. et al., 2014), и подавление дифференцировки Th17 субпопуляций Т-клеток (Laurence A. et al., 2007; Liao W. et al., 2011) и Т-хелперов фолликулов (Tfh) (Ballesteros-Tato A. et al., 2012; Johnston R. J. et al., 2012; Oestreich K. J. et al., 2012).

Однако, в дополнение к своей мощной пролиферативной активности в отношении Т-клеток *in vitro*, IL-2 может индуцировать вызванную активацией гибель (Spetz J., 2019)  $CD4^+$  Т-клеток, что важно для поддержания периферической толерантности *in vivo*. Это объясняет положительные корреляции между уровнем апоптоза и количеством  $CD4^+CD95^+$  Т-клеток. Помимо того, существенная роль IL-2 *in vivo* заключается в содействии развитию и поддержанию регуляторных Т (Treg) клеток, подавляющая активность которых жизненно важна для контроля патологических воспалительных реакций (Malek T.R. et al., 2002). Таким образом, сигналы IL-2 могут быть необходимы во время первичного ответа как для генерации оптимальной реакции  $CD4^+$  Т-клеток, так и для создания долгоживущих  $CD4^+$  Т-клеток памяти и субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Th9). Роль IL-15

сосредоточена на развитии и/или поддержании CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти (Lin J. X., Leonard W. J., 2018).



**Рисунок 23.** Корреляционные взаимосвязи исследуемых клеточно-молекулярных показателей культуры МНК в гомеостатической 3D модели.

Красным цветом отмечены сильные положительные корреляции, синим цветом – отрицательные с коэффициентом корреляции не ниже 0,8 ( $p < 0,05$ ;  $n=6$ ).

Согласно рисунку 23, 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 (рисунок 15). 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). Действительно, анализ корреляционной матрицы (рисунок 24) показал, что клеточные реакции МНК на 3D-матрицы можно отобразить в виде основного общего кластера, свидетельствующего о синхронизации функционирования культуры МНК.

Основными участниками межклеточной кооперации в ответ на 3D-раздражитель являются провоспалительные цитокины (прежде всего, белки острой фазы воспаления с увеличением концентраций в 57 раз (IL-6) и 48 раз (IL-1b)) и хемокины MIP-1a (113-кратный рост концентрации), MIP-1b (21-кратное увеличение), MCP-1 (16-кратный прирост), IL-8 (5-кратный подъем) (таблица 7, рисунок 24). 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.

MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  рассматриваются, главным образом, как хемоаттрактанты для моноцитов/ макрофагов и различных популяций лимфоцитов (Bhavsar I. et al., 2019). Однако MIP-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$  имеют дополнительные функции в иммунной системе. Они стимулируют пролиферацию Т-клеток и синтез IL-2, увеличивают цитолитическую способность Т- и NK-клеток (Loyher P.L. et al, 2020). Молекулы rhMIP-1 преимущественно рекрутируют специфические субпопуляции Т-клеток в ходе эволюции иммунного ответа. По данным литературы, CD4<sup>+</sup> Т-клетки способны мигрировать в ответ на rhMIP-1-бета, тогда как rhMIP-1-альфа индуцирует хемотаксис, преимущественно, CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (Xu H. et al., 2020). Действительно, увеличение содержания MIP-1a в супернатантах МНК крови человека (таблица 7) положительно коррелировало с изменением относительного числа клеток с CD8<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup> (рисунок 24), хотя сам процент пролиферирующих Т-супрессоров достоверно не изменялся (таблица 6).

Несмотря на то, что функции различных типов клеток, вовлеченных в воспалительную реакцию после перелома, хорошо известны и постоянно изучаются, динамика молекулярных механизмов, лежащих в основе различных фаз

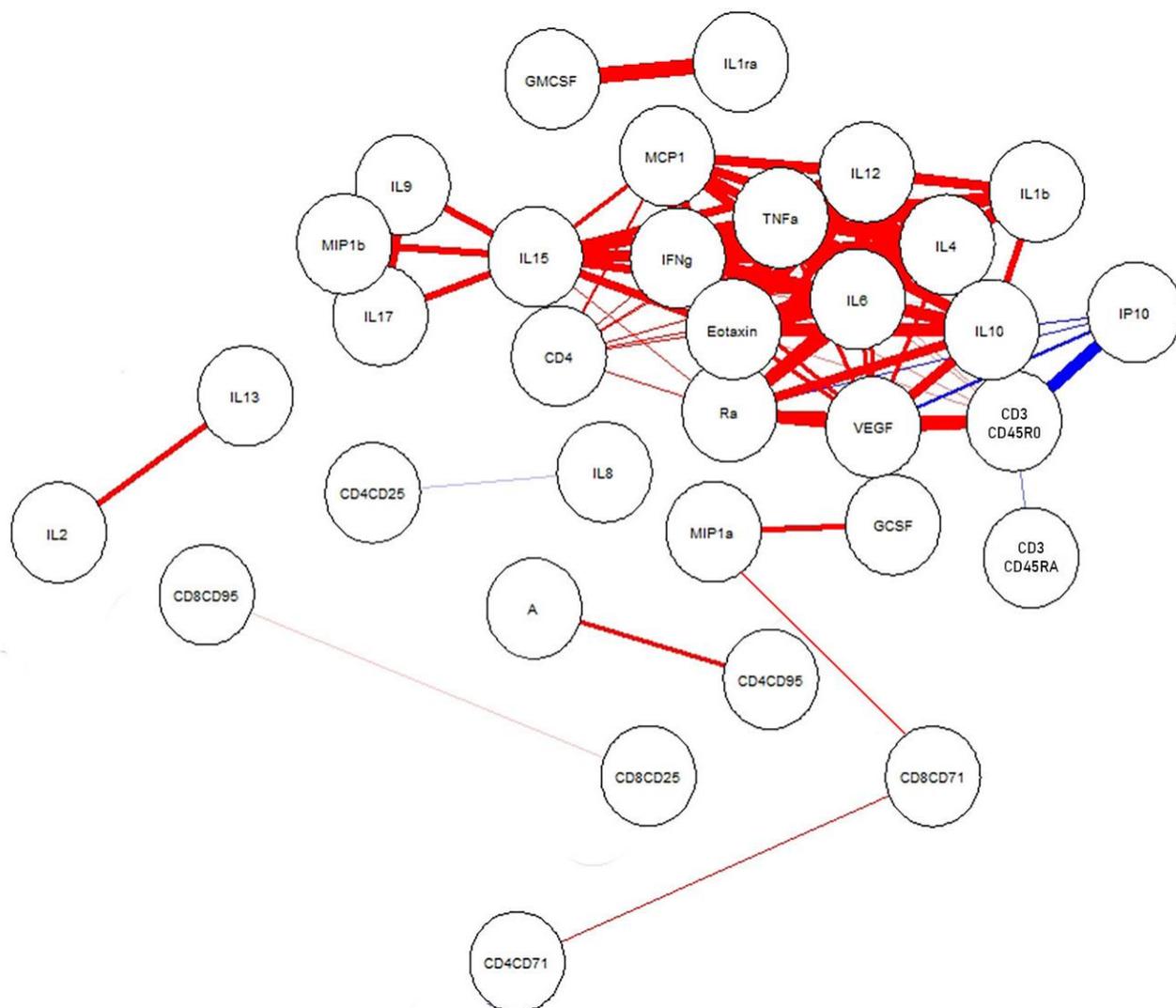
восстановления кости, до сих пор представляет собой дискуссионный вопрос, поскольку плохо поддается интерпретации.

В этом плане 3D-гомеостатическая *in vitro* модель регенерации костной ткани экспериментально доказывает следующий алгоритм событий, описанных ранее в разрозненном виде в научной литературе. При переломе кости развивается системная реакция, которая обусловлена выбросом в кровь IL-6 (рост в 57 раз, таблица 7), а также CXCL хемокинов, которые привлекают, прежде всего, нейтрофилы. Нейтрофилы обычно первыми прибывают на место перелома в ответ на острое повреждение (Förster Y. et al., 2016). Нейтрофилы индуцируют хемотаксис моноцитов и лимфоцитов посредством стимуляции (увеличение в 16 раз, таблица 7) секреции MCP-1 (Edderkaoui B., 2017). Моноциты и лимфоциты переключают провоспалительный ответ на регенераторную фазу посредством секреции ряда хемокинов, включая MCP-1, MIP-1b и MCP-3, которые, как известно, привлекают МСК. Стволовые клетки мигрируют к формирующейся в месте перелома костной мозоли и секретируют CXCL12. CXCL12, в свою очередь, связывается с CXCR4 и регулирует эффекты BMP-2 на остеогенез и заживление переломов (Edderkaoui B., 2017).

Немаловажную роль в кооперации субпопуляций Т-клеток может также играть достоверное повышение (в 3,5 раза) концентрации IL-9 в 3D культуре МНК (таблица 7). IL-9 обнаружен как фактор роста некоторых клонов Т-клеток в отсутствие антигенов или АПК (Uyttenhove C. et al., 1988; Schmitt E. et al., 2014). В настоящее время он распознается как сигнатурный цитокин для клеток Th9, дифференцировка которых индуцируется, когда наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки культивируются с IL-2, IL4, и TGF- $\beta$  (Schmitt E. et al., 2014) или, когда клетки Th2 культивируют с TGF- $\beta$  (Dardalhon V. et al., 2008; Veldhoen M. et al., 2008).

Резюмируя вышесказанное по разделу 4.3, структурный раздражитель через развитый рельеф КФ поверхности и выделение ионов кальция и фосфора в межклеточную жидкость, так же, как и гуморальный Т-клеточный активатор (T-cell activation/expansion kit human), активирует иммунокомпетентные клетки и создает локальное молекулярное микроокружение. Гуморальное микроокружение, посредством медиаторов хемотаксиса, способствует усилению клеточной миграции, которая способствует инфильтрации тканей лейкоцитами крови. При этом провоспалительный цитокиновый/хемокиновый сигналинг между

различными субпопуляциями Т-лимфоцитов усиливается в значительной большей степени при воздействии 3D-матрикса (рисунок 24), чем гуморального Т-клеточного активатора (рисунок 20).



**Рисунок 24.** Схема корреляционных связей в гомеостатической 3D модели. Красным выделены положительные корреляции, синим – отрицательные. Сила корреляционных взаимосвязей выделена шириной линии, соединяющей показатели. Коэффициент представленных на рисунке корреляций  $0,8 < r < 1$ .

#### 4.4. Поведение МНК крови человека в 3D-активационной культуре *in vitro*

Комбинация гуморального Т-клеточного активатора (активирующие антитела к CD2/CD3/CD28 комплексу), симулирующего сигналинг АПК, со структурным раздражителем (3D-матриksom), имитирующим минеральное вещество регенерирующей костной ткани, в определенной степени моделирует *in*

in vitro физиологическую ситуацию, складывающуюся при репаративной регенерации костной ткани.

Оба раздражителя имеют как сходные моменты влияния на культуру МНК крови (жизнеспособность, секреторная реакция), так и некоторые отличия, поскольку Т-клеточный активатор значительно усиливал экспрессию изучаемых антигенных детерминант Т-лимфоцитов (таблица 6). Тем не менее за некоторым исключением (число  $CD3CD8^+$  и  $CD3^+CD45RA^+$  клеток), in vitro комбинация двух раздражителей приводила к синергичному эффекту в отношении повышенной экспрессии *hTERT* гена-маркера клеточной пролиферации (таблица 10), усиленной секреции цитокинов и хемокинов (таблица 7) и снижения жизнеспособности МНК при высокой общей клеточности культуры (таблица 5). Данные показатели были интерпретированы как "смерть клеток через гиперактивацию".

По-видимому, этот процесс касается, в первую очередь, цитотоксических/супрессорных  $CD8^+$  и наивных  $CD45RA^+$  Т-клеток, доля которых снижается практически на 3-4 % ( $P < 0,05$ ) при комбинации двух раздражителей (таблица 6) на фоне повышения (относительно 3D-гомеокультуры МНК) презентации  $CD71$  маркера пролиферации и  $CD95$  маркера поздней активации/гибели клеток. Следует отметить также падение (на 3,5 % в сравнении с 3D-гомеокультурой клеток) процента  $CD4^+$  субпопуляции при одновременной повышенной экспрессии ими  $CD25$ ,  $CD28$  и  $CD71$  маркеров активации/пролиферации (таблица 6).

Уменьшение доли  $CD4^+$  и, особенно,  $CD8^+$  Т-клеток является, в нашем понимании, следствием усиления активационно-индуцированного апоптоза, в процессе которого наблюдается усиленная экспрессия молекулы  $CD95$  на активированных Т-клетках, и дальнейшее развитие запрограммированной клеточной гибели (Юрова К. А. и др., 2016; Кноринг Б. Е. и др., 2019; Krueger A. et al., 2003; Elmore S., 2007). Система  $CD95/CD95L$  способствует удалению активированных Т-клеток во время фазы терминации иммунного ответа (Jin Z., El-Deiry W.S., 2005; Hughes P.D. et al., 2008; Hutcheson J. et al., 2008; Weant A.E. et al., 2008). 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).

Согласно корреляционному анализу по Спирмену (рисунок 25), в активационной 3D-культуре МНК обнаружены 70 сильных ( $r > 0,8$ ) корреляций, из которых 35 - с отрицательным коэффициентом. Добавление Т-клеточного активатора к 3D-матриксу снижает общее число связей и способствует качественному перераспределению спектра в обратные корреляции в сравнении с 3D-гомеокультурой МНК. Степень взаимодействия иммунокомпетентных клеток с рельефом КФ поверхности снижается, о чем свидетельствует наличие всего двух (IL-13, IL-15), а не 14 корреляций показателей (IL-13, IL-15) с коэффициентом шероховатости Ra.

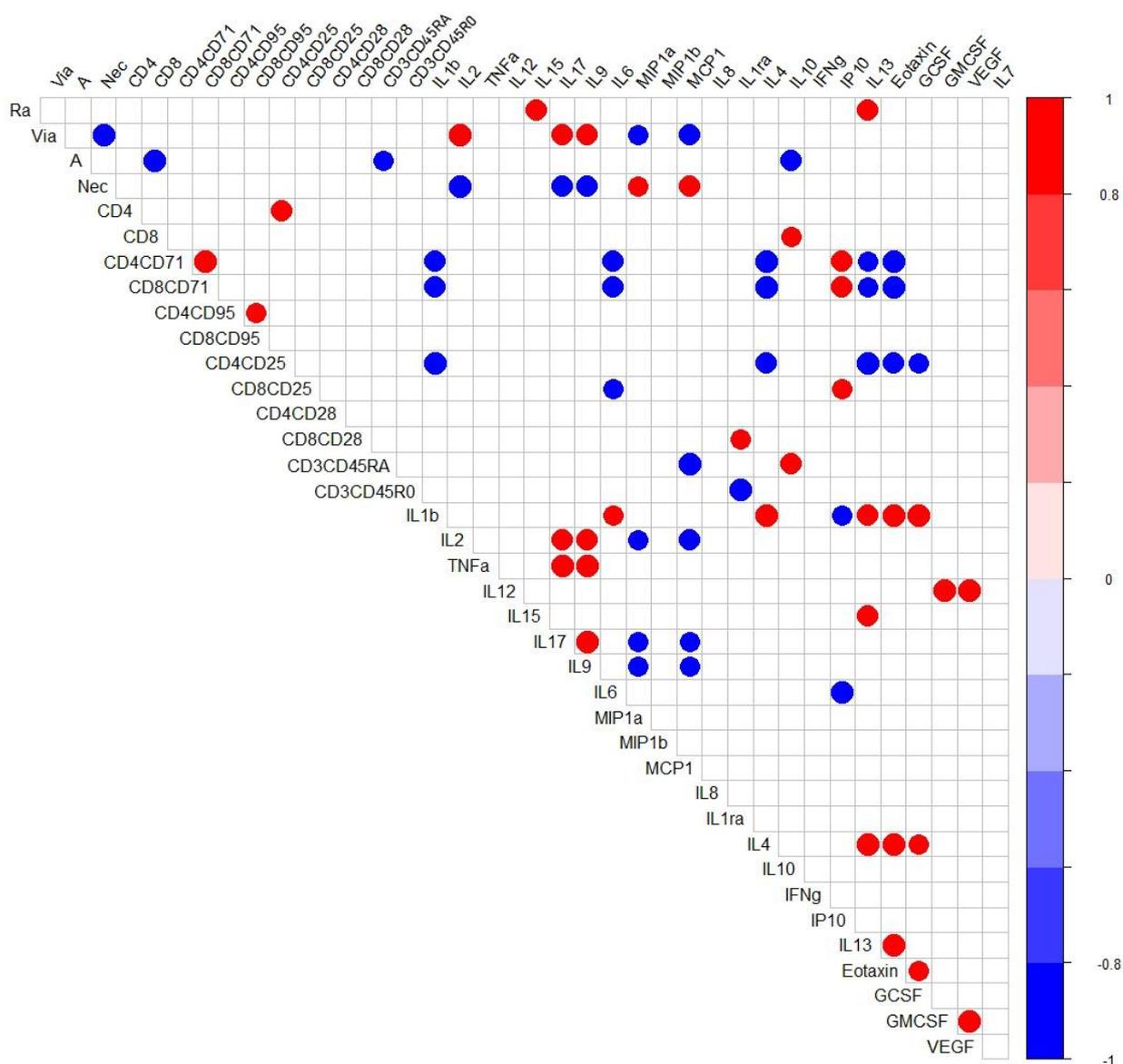
Согласно рисунку 25, помимо инвертирования клеточно-молекулярных связей параметров с прямых на обратные, отмечается их кластеризация на 3 субъединицы, что характерно для эффектов Т-активатора (рисунки 21,22), но не 3D-матрикса (рисунок 23).

По классификации van den Broek et al. (2014), секретируемые биологически активные вещества в 3D-активационной культуре МНК можно расположить в следующем порядке:

- высокие (более 1 нг/мл) концентрации медиаторов (**IL-1b; TNF-a; IL-17; IL-6; MIP-1b; MCP-1; IL-1ra; IL-10; IFN-g; IP-10; IL-13; IL-8**);

- средние (0,1-1 нг/мл) концентрации медиаторов (**IL-2; IL-15; IL-9; MIP-1a; G-CSF; GM-CSF; VEGF**);

- низкие (1-100 пг/мл) концентрации медиаторов (**IL-12; IL-4; Eotaxin; IL-7**).

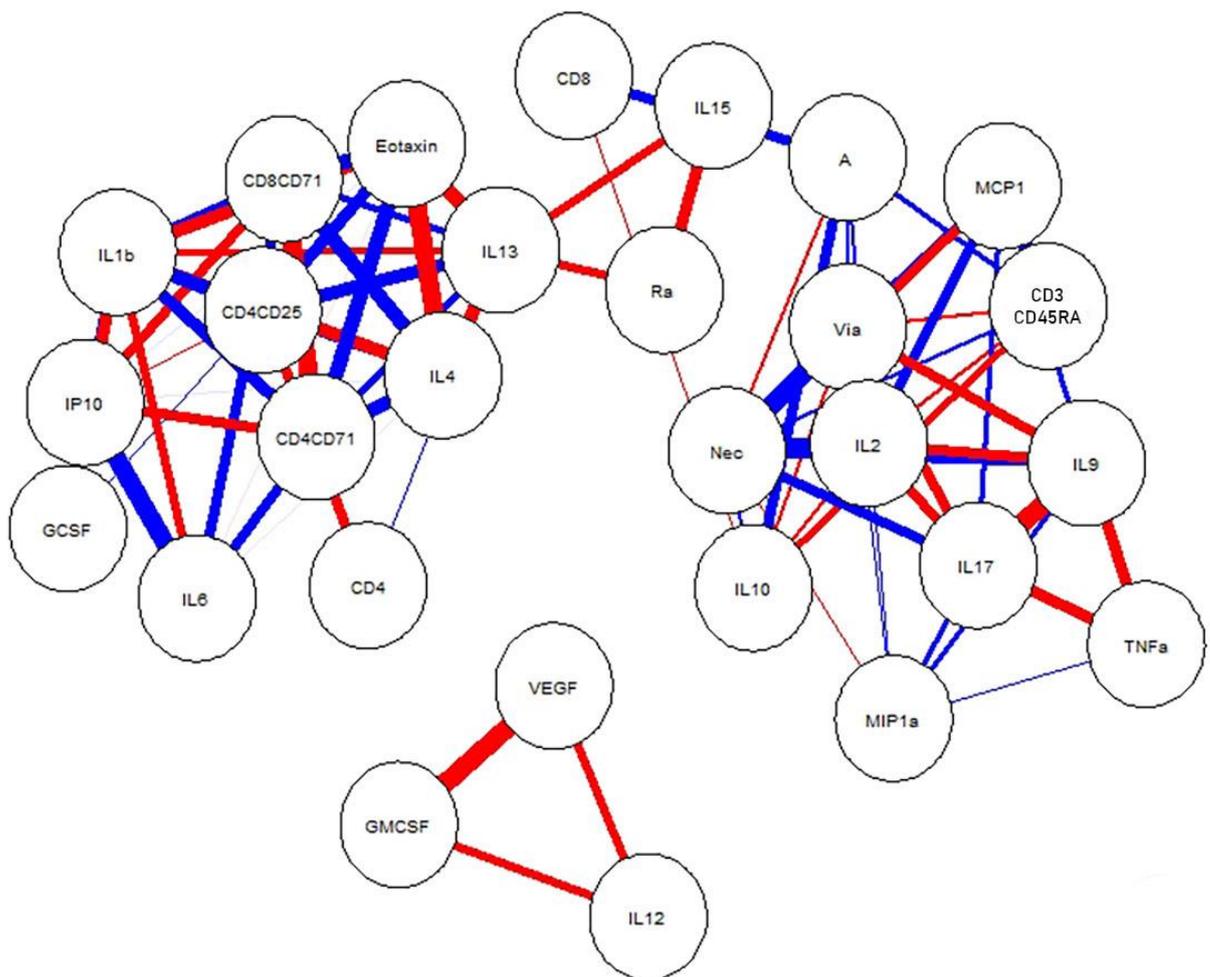


**Рисунок 25.** Корреляционные взаимосвязи исследуемых клеточно-молекулярных показателей культуры МНК в активационной 3D модели.

Красным цветом – положительные корреляции, синим цветом – отрицательные с коэффициентом корреляции не ниже 0,8 ( $p < 0,05$ ;  $n=6$ ).

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 изученных цитокинов/хемокинов. Особенно следует отметить высокие уровни факторов с противовоспалительным/регенераторным потенциалом (таблица 7). Об увеличении пролиферативного потенциала культуры свидетельствует увеличение экспрессии генов *ki-67* (Motamedi M. et al., 2016) и *hTERT* (таблица 10).

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 (рисунок 26). Соединяющим элементом двух крупных кластеров является трехчленная кооперация Ra/IL-13 (противовоспалительный цитокин)/IL-15 (провоспалительный цитокин), подчеркивающая роль поверхности структурного 3D-раздражителя в модулировании секреторной активности активационной культуры МНК крови.



**Рисунок 26.** Схема корреляционных связей в активационной 3D-модели. Красным выделены положительные корреляции, синим – отрицательные. Сила корреляционных взаимосвязей выделена шириной линии, соединяющей показатели. Коэффициент представленных на рисунке корреляций  $0,8 < r > 1$ .

Представленную на рисунке 26 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).

IP-10 (CXCL10) представляет собой плеiotропную молекулу, способную оказывать мощные биологические функции, в том числе стимулировать хемотаксическую активность  $CXCR3^+$  клеток, индуцировать апоптоз, регулировать рост и пролиферацию клеток. CXCL10 выполняет функции хемотаксического агента для  $CXCR3$ -позитивных клеток, включая макрофаги (клетки микроглии в ЦНС), дендритные клетки, NK-клетки и активированные Т-лимфоциты ( $CD4^+$  Т-клетки,  $CD8^+$  Т-клетки) в направлении воспаленных, инфицированных и/или опухолевых областей. Помимо того, он может активировать Th1 клетки (Enderlin M. et al., 2009; Liu M. et al., 2011). По данным литературы, продукция IP-10 и его пролиферативные/антипролиферативные эффекты зависят от притока ионов кальция в клетку (Liu M. et al., 2011).

IL-15, как и IL-7, является членом суперсемейства IL-2 и обладает многими общими с ним активностями. IL-15 индуцирует экспрессию IL-8 Т-клетками и моноцитами, а также активирует секрецию моноцитами MCP-1 и MIP-1 $\beta$ , облегчая рекрутирование фагоцитов, обеспечивая создание провоспалительного микроокружения (Good M. et al., 2017). Кроме того, он увеличивает количество клеток-предшественников остеокластов в культуре (Lorenzo J., 2016).

IL-4 и IL-13 являются родственными противовоспалительными цитокинами с ангиогенными и остеогенными свойствами (Yuan Y. et al., 2016; Zheng Z. W. et al., 2018). Более того, средние и высокие уровни провоспалительных цитокинов, участвующие в межклеточной кооперации в активационной 3D-культуре МНК крови человека (рисунок 18), также способны индуцировать регенераторные ангиогенные и/или остеогенные эффекты. Это относится к IL-1b (Ding J. et al., 2009), IL-6 и IL-17 (Huang Q. et al., 2016; Loi F. et al., 2016), IL-2 (Yuan Y. et al., 2016; Yuan Y. et al., 2019), IL-9 (He J. et al., 2019).

Таким образом, 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. Полученные результаты свидетельствуют в пользу практического потенциала применения гуморального Т-клеточного активатора при нарушении/замедлении сроков физиологического/репаративного ремоделирования ЭЦМ кости.

Еще одним физиологическим механизмом позитивного действия Т-клеточного активатора является стимулирование инвазии МНК крови при *in vitro* моделировании клеточной миграции через модельную стенку кровеносных сосудов (рисунки 13-14). Лейкоцитарная инфильтрация тканей является условием своевременного переключения воспалительных/регенераторных процессов в очаге воспаления, необходимого для своевременной и полной регенерации костной ткани (Loi F. et al., 2016). В связи с этим, общей субклеточной мишенью для использованных раздражителей (Т-активатор; 3D-матрикс с рельефным КФ покрытием) может быть клеточный цитоскелет, поскольку активатор Т-клеток, симулирующий сигналинг АПК, способствует активизации процессов миграции МНК через микропористую мембрану, имитирующую стенку кровеносных сосудов. Как активатор, так и матрикс моделируют *in vitro* «очаг воспаления», являясь структурно-функциональными раздражителями секреции воспалительных молекул, способствующих перестройке цитоскелета МНК для усиления миграционной активности.

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). Реорганизация актина важна для функции Т-клеток, так как ингибиторы полимеризации актина препятствуют взаимодействиям Т-клеток / АПК и устраняют проксимальные сигналы TCR (Jordan M. S. et al., 2009). Конъюгация Т-клеток и АПК приводит к морфологическим изменениям, поскольку стимулированная Т-клетка округляется и накапливает нитевидный актин (F-актин). Считается, что эти изменения зависят от TCR-индуцированного увеличения текучести плазматической мембраны и снижения подвижности клеток. Прекращение подвижности связано с TCR и  $Ca^{2+}$ -зависимым фосфорилированием и дезактивацией моторного белка миозина; однако, сигнальный путь, связывающий TCR с этим событием, еще не был полностью определен (Jacobelli J. et al., 2004). Текучесть плазматических мембран частично повышается за счет TCR- и Vav1-

зависимого транзитного дефосфорилирования белков ERM (эзрина, радиксина и мезина), что приводит к потере их способности связывать плазматическую мембрану с актиновым цитоскелетом (Faure S. et al., 2004). Передача сигналов  $Ca^{2+}$  и активация интегрин ниже TCR приводят к дополнительным модификациям актин-ассоциированных белков, которые могут играть роль в изменении жесткости плазматической мембраны (Burkhardt J. K. et al., 2008). Результаты теста на инвазию МНК (рисунки 13-14) подсказывают как изменение сборки цитоскелета, так и текучести цитоплазматической мембраны, при воздействии [CD2-/CD3-/CD28-] Т-клеточного активатора.

### **Заключение**

Полученные количественные данные (см. Главу 3) согласуются с корреляционным (качественным) анализом молекулярных путей кооперации клеток крови в ответ на структурно-функциональные раздражители (Глава 4). 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*.

Иммунокомпетентные клетки крови человека демонстрируют различные паттерны структурно-функциональной активности в различных условиях их 48-ч *in vitro* культивирования (таблица 11).

Таблица 11 – Реакции иммунокомпетентных в использованных *in vitro* моделях культивирования

2D-гомеостатическая модель (А)	2D-активационная модель (В)
<p>Высокая жизнеспособность клеточной культуры. Низкая секреторная активность. Низкая миграционная активность культуры. Разобщение клеточной культуры на относительно независимые структурно-функциональные кластеры.</p>	<p>Увеличение клеточной массы, смерть клеток через гиперактивацию. Активация экспрессии CD маркеров дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов. Средне-высокая секреторная активность клеточной культуры в отношении про- и противовоспалительных/регенераторных цитокинов/хемокинов. Усиление инвазивной способности МНК крови. Консолидация клеточно-молекулярной активности Т-клеток с укрупнением корреляционных кластеров при сохранении общего числа взаимосвязей.</p>
3D-гомеостатическая модель (Б)	3D-активационная модель (Г)
<p>Смерть клеток через гиперактивацию. Стабильность иммунофенотипа Т-клеток и экспрессии генов дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов относительно модели (А). Средне-высокий секреторный сигналинг МНК в отношении провоспалительных медиаторов. Стрессорное (неспецифическое) воздействие на Т-клетки с синхронизацией их функционирования по типу “неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем” (Браун А.Д., Моженок Т.П., 1987)</p>	<p>Смерть клеток через гиперактивацию. Усиление презентации CD антигенов дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов. Высокая и средняя секреторная активность культуры МНК. Повышение экспрессии генов пролиферации при сохранении стабильности экспрессии генов дифференцировки и созревания Т-клеток. Поляризация Т-клеток на секрецию про- или противовоспалительных (регенераторных) или ангио-/гематогенных молекул, что лежит в основе кластеризации клеточно-молекулярных эффектов культуры МНК. Соединяющим элементом синергичности действия раздражителей можно предполагать трехчленную кооперацию Ра/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<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альтернативный сплайсинг молекулы CD45 в механизмах молекулярно-генетического контроля дифференцировки Т-клеток / К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова, Н.А. Сохоневич, и др. // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т.9, №2. – С. 186-193.
2. Апоптоз лимфоцитов и иммунный ответ у больных лекарственно-устойчивым фиброзно-кавернозным туберкулезом с различной распространенностью деструктивных изменений в легких / Б. Е. Кноринг, Н. И. Давыдова, А. О. Аветисян, и др. // Медицинская иммунология. – 2019. – Т. 21. – №. 6.
3. Бабаева, А.Г. Лимфоциты как регуляторы пролиферации и дифференцировки клеток нелимфоидных органов // А.Г. Бабаева / Вестник АМН СССР. – 1990. – №2. – С. 43-45.
4. Биоконпозиты на основе кальцийфосфатных покрытий, наноструктурных и ультрамелкозернистых биоинертных металлов, их биосовместимость и биодegradация / Ю.П. Шаркеев, С.Г. Псахье, Е.В. Легостаева, и др. – Томск. : Издательский Дом Томского государственного университета, 2014. – 596 с.
5. Браун, А.Д. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы / А.Д. Браун, Т.П. Моженок, А.Б. Каулин. – Л. : Наука, 1987. – 232 с.
6. Динамическая теория регуляции кроветворения / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.В. Жданов и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1999. – 127 (5). – С. 484-494.
7. Железникова Г. Ф. Регуляторные Т-лимфоциты в иммунном ответе на инфекцию / Г. Ф. Железникова // Журнал инфектологии. – 2014. – Т. 3, №. 1. – С. 6-13.
8. Поведение имплантатов в костной ткани в различные сроки согласно МРТ-исследованию [Электронный ресурс] / Н.В. Загородний, А.В. Королев, А.А. Ахпашев и др. // Режим доступа:  
<http://www.lechenie-sustavov.ru/patient/articles/povedenie-implantatov-v-kostnoj-tkani-v-razlichnye-sroki-soglasno-mrt-issledovaniyu/>
9. Закономерности структурной организации систем жизнеобеспечения в норме и при развитии патологического процесса / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.В.

- Удут, и др. – Томск.: Национальный исследовательский Томский государственный университет, 1996. – 304 с.
10. Каюкова, Е.В. Особенности иммунного ответа у больных раком шейки матки / Е.В. Каюкова, Т.Е. Белокриницкая // Современные проблемы науки и образования. – 2020. - №1. – С. 52.
  11. Коршунов, Д. А. Современные достижения и проблемы в исследовании культур клеток / Д.А. Коршунов, И.В. Кондакова // Успехи современной биологии. – 2016. – Т. 136, №4. – С. 347-361.
  12. Кремер Н. Ш. Практикум по высшей математике для экономистов / Н. Ш. Кремер // Учебное пособие для вузов. – 2004.
  13. Остеогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток костного мозга *in situ*: роль физико-химических свойств искусственных поверхностей / И.А. Хлусов, А.В. Карлов, А. В., Ю.П. Шаркеев, и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2005. – №3. – С. 164-173.
  14. Риггз, Б.Л. Остеопороз: этиология, диагностика, лечение / Б.Л. Риггз, Л.Дж. Мелтон III. – СПб. : ЗАО «Издательство БИНОМ», «Невский диалект», 2000. – 560 с.
  15. Симбирцев, А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека // А.С. Симбирцев. – СПб : Фолиант, 2018. – 512 с.
  16. Тишевская, Н.В. Роль Т-лимфоцитов в гормональной регуляции морфогенетических процессов / Н.В. Тишевская, Н.М. Геворкян, Н.И. Козлова // Успехи современной биологии. – 2015. - Т. 135, №2. – С. 189-202.
  17. Тодосенко, Н.М. Реакции Т-лимфоцитов больных ревматоидным артритом на глюкокортикоиды *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.03.03/ Тодосенко Наталья Михайловна. – Санкт-Петербург, 2018. – 24 с
  18. Фрейдлин, И.С. Взаимосвязи врожденного и приобретенного иммунитета при инфекциях (ревизия классических догм) // И.С. Фрейдлин / Инфекция и иммунитет. – 2011. – Т. 1, №3. – С. 199-206.
  19. Хаитов, Р.М. Аллергология и иммунология: нац. рук. // Р.М. Хаитов / ГЭОТАР-Медиа. – 2009.
  20. Цитокиноопосредованная регуляция экспрессии генов *Gfil* и *U2afll4* активированными Т-клетками с разным дифференцировочным статусом *in*

- vitro / К. А. Юрова, Н. А. Сохоневич, О. Г. Хазиахматова и др. // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62. – № 2. – С. 180-186.
21. Черешнев, В.А. Иммунология воспаления: роль цитокинов / В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, №3. – С. 361-368.
22. Ярилин А.А. Иммунология: учебник // А.А. Яриллин / ГЭОТАР-Медиа: М. – 2010. – С. 752.
23. 3D bioprinting for engineering complex tissues // С. Mandrycky, Z. Wang, K. Kim, et al. // Biotechnology advances. – 2016. – V. 34, №4. – P. 422-434.
24. A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis / T. Moss, F. Langlois, T. Gagnon-Kugler et al. // Cellular and molecular life sciences. – 2007. – V. 64, №1. – P. 29-49.
25. A human memory T cell subset with stem cell-like properties / L. Gattinoni, E. Lugli, Y. Ji, et al. // Nature medicine. – 2011. – V. 17, №10. – P. 1290-1297.
26. A single class II myosin modulates T cell motility and stopping, but not synapse formation / J. Jacobelli, S.A. Chmura, D.B. Buxton, et al. // Nature immunology. – 2004. – V. 5, №5. – P. 531-548.
27. Actin cytoskeleton straddling the immunological synapse between cytotoxic lymphocytes and cancer cells / H. Wurzer, C. Hoffmann, A. Al Absi, et al. // Cells. – 2019. – V. 8, №5. – P. 463.
28. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility / L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes, et al. // Physiological reviews. – 2014. – V. 94, №1. – P. 235-263.
29. Activation of the integrated stress response during T helper cell differentiation / S. Scheu, D.B. Stetson, R.L. Reinhardt, et al. // Nature immunology. – 2006. – V. 7, №6. – P. 644-651.
30. Activation-induced inhibition of interleukin 6-mediated T cell survival and signal transducer and activator of transcription 1 signaling / T.K. Teague, B.C. Schaefer, D. Hildeman, et al. // The Journal of experimental medicine. – 2000. – V. 191, №6. – P. 915-926.
31. Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool / F. Melchionda, T.J. Fry, M.J. Milliron, et al. // The Journal of clinical investigation. – 2005. – V. 115, №5. – P. 1177-1187.

32. Advances in surfaces and osseointegration in implantology. Biomimetic surfaces / M. Albertini, M. Fernandez-Yague, P. Lázaro, et al. // *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal*. – 2015. – V. 20, №3. – P. e316.
33. Anderson, P. Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation // P. Anderson / *Immunology*. – 2010. – V. 10, №1. – P. 24-35.
34. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential / M. Gunzer, A. Schäfer, S. Borgmann, et al // *Immunity*. – 2000. – V. 13, №. 3. – P. 323-332.
35. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes / M. L. Dustin, S. K. Bromley, Z. Kan, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – V. 94, №. 8. – P. 3909-3913
36. Antiviral CD4 and CD8 T–cell memory: differences in the size of the response and activation requirements / J.K. Whitmire, K. Murali-Krishna, J. Altman, et al. // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. – 2000. – V. 355, №1395. – P. 373-379.
37. Antoniu, S.A. Pitracinra, a dual IL-4/IL-13 antagonist for the potential treatment of asthma and eczema // S.A. Antoniu / *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*. – 2010. – V. 11, №11. – P. 1286-1294.
38. Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8+ T cell contraction / A. E. Weant, R. D. Michalek, I. U. Khan, et al. // *Immunity*. – 2008. – V.28, №. 2. – P. 218-230.
39. Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity / P. D. Hughes, G. T. Belz, K. A. Fortner, et al. // *Immunity*. – 2008. – V.28, №. 2. – P. 197-205.
40. Applications of calcium phosphate nanoparticles in porous hard tissue engineering scaffolds / Z. Wang, Z. Tang, F. Qing, et al. // *Nano*. – 2012. – V. 7, №04. – P. 1230004.
41. Arron, J.R. Bone versus immune system / J.R. Arron, Y. Choi // *Nature*. – 2000. – V. 408, №6812. – P. 535-536.
42. Artificial 3d culture systems for t cell expansion / E. Perez del Rio, M. Martinez Miguel, J. Veciana, et al. // *ACS omega*. – 2018. – V. 3, №5. – P. 5273-5280.

43. Aspects of intradermal immunization with different adjuvants: The role of dendritic cells and Th1/Th2 response / Z. Oreskovic, K. Nechvatalova, J. Krejci, et al. // *PloS one*. – 2019. – V. 14, №2. – P. e0211896.
44. Bahmad Jr., F. Histopathology of ossicular grafts and implants in chronic otitis media / F. Bahmad Jr., S.N. Merchant // *Annals of Otolaryngology & Rhinology*. – 2007. – V. 116, №3. – P. 181-191.
45. Bee, S.L. Characterization of chicken bone waste-derived hydroxyapatite and its functionality on chitosan membrane for guided bone regeneration / S.L. Bee, Z.A. Hamid // *Composites Part B: Engineering*. – 2019. – V. 163. – P. 562-573.
46. Bel, S. Immunology: A bacterial nudge to T-cell function / S. Bel, L.V. Hooper // *Nature*. – 2015. V. 526, №7573. – P. 328-330.
47. Bioactive and biodegradable nanocomposites and hybrid biomaterials for bone regeneration / B.A. Allo, D.O. Costa, S.J. Dixon, et al. // *Journal of functional biomaterials*. – 2012. – V. 3, №2. – P. 432-463.
48. Biocompatible dialysis solutions preserve peritoneal mesothelial cell and vessel wall integrity. A case-control study on human biopsies / G. del Peso, J.A. Jiménez-Heffernan, R. Selgas, et al. // *Peritoneal Dialysis International*. – 2016. – V. 36, №2. – P. 129-134.
49. Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications / S. Agarwal, J. Curtin, B. Duffy, et al. // *Materials Science and Engineering*. – 2016. – V. 68. – P. 948-963.
50. Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration / D. Tang, R.S. Tare, L.Y. Yang, et al. // *Biomaterials*. – 2016. – V. 83. – P. 363-382.
51. Biological response to peri-implantitis treatment / I. Bhavsar, C.S. Miller, J.L. Ebersole, et al. // *Journal of Periodontal Research*. – 2019. – V. 54, №6. – P. 720-728.
52. Biomaterials in orthopaedics / M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, et al. // *Journal of the royal society interface*. – 2008. – V. 5, №27. – P. 1137-1158.
53. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine / B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, et al. // *Elsevier*. – 2004. – P. 851.

54. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies / M.A. Fernandez-Yague, S.A. Abbah, L. McNamara, et al. // *Advanced drug delivery reviews*. – 2015. – V. 84. – P. 1-29.
55. Bioprocess Development for the Cultivation of Human T- lymphocytes / U. Hilbert, N. Jelinek, S. Schmidt, et al. // *Engineering in life sciences*. – 2001. – V. 1, №. 1. – P. 20-23.
56. Birgersdotter, A. Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems / A. Birgersdotter, R. Sandberg, I. Ernberg // *In Seminars in cancer biology*. Academic Press. – 2005. – V. 15, №5. – P. 405-412.
57. Bohnenkamp H. Bioprocess development for the cultivation of human T-lymphocytes in a clinical scale / H. Bohnenkamp, U. Hilbert, T. Noll // *Cytotechnology*. – 2002. – V. 38, №. 1-3. – P. 135-145.
58. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous  $\alpha$ -TCP and  $\beta$ -TCP / H. Yuan, J.D. De Bruijn, Y. Li, et al. // *Journal of materials science: materials in medicine*. – 2001. – V. 12, №1. – P. 7-13.
59. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing / H. Lin, J. Sohn, H. Shen, et al. // *Biomaterials*. – 2019. – V. 203. – P. 96-110.
60. Boomer, J.S. An enigmatic tail of CD28 signaling / J.S. Boomer, J.M. Green // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2010. – V. 2, №8. – P. a002436.
61. Boursalian, T.E. Survival of naive CD4 T cells: roles of restricting versus selecting MHC class II and cytokine milieu / T. E. Boursalian, K. Bottomly // *The Journal of Immunology*. – 1999. – V. 162, №7. – P. 3795-3801.
62. Burkhardt, J.K. The actin cytoskeleton in T cell activation / J.K. Burkhardt, E. Carrizosa, M.H. Shaffer // *Annu. Rev. Immunol.* – 2008. – V. 26. – P. 233-259.
63. Bystander stimulation of activated CD4<sup>+</sup> T cells of unrelated specificity following a booster vaccination with tetanus toxoid / G. Di Genova, N. Savelyeva, A. Suchacki, et al. // *European journal of immunology*. – 2010. – V. 40, №4. – P. 976-985.
64. Calcium phosphate- based coatings on titanium and its alloys / R. Narayanan, S.K. Seshadri, T.Y. Kwon, et al. // *Journal of Biomedical Materials Research Part B:*

- Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2008. – V. 85, №1. – P. 279-299.
65. CCR2 defines in vivo development and homing of IL-23-driven GM-CSF-producing Th17 cells / E.E. Kara, D.R. McKenzie, C.R. Bastow, et al. // *Nature communications*. – 2015. – V. 6, №1. – P. 1-17.
66. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2R $\beta$ -deficient mice: implications for the nonredundant function of IL-2 / T.R. Malek, A. Yu, V. Vincek, et al. // *Immunity*. – 2002. – V. 17, №2. – P. 167-178.
67. CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART / M. Massanella, E. Negredo, N. Pérez-Álvarez, et al. // *Aids*. – 2010. – V. 24, №7. – P. 959-968.
68. CD4<sup>+</sup> T cells: differentiation and functions / R.V. Luckheeram, R. Zhou, A.D. Verma, et al. // *Clinical and developmental immunology*. – 2012. – V. 2012. – P. 12.
69. CD8<sup>+</sup> T cells are involved in early inflammation before macrophages in a rat adipose tissue engineering chamber model / Y. Yuan, H. Li, Y. Liao, et al. // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. – 2019. – V. 13, №9. – P. 1499-1506.
70. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance / F. Sallusto, J. Geginat, A. Lanzavecchia, et al. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2004. – V. 22. – P. 745-763.
71. Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies / S.C. Baker, N. Atkin, P.A. Gunning, et al. // *Biomaterials*. – 2006. – V. 27, №16. – P. 3136-3146.
72. Characterization of IL-7 and IL-7R in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: Comment on the article by Pickens et al. / F. Moret, V. Badot, B. Lauwerys, et al. // *Arthritis & Rheumatism*. – 2011. – V. 64, №2. – P. 594.
73. Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its biocompatibility with osteoblasts / P. Shi, M. Liu, F. Fan, et al. // *Materials Science and Engineering: C*. – 2018. – V. 90. – P. 706-712.

74. Chen, L. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition / L. Chen, D.B. Flies // *Nature Reviews Immunology*. – 2013. – V.13, №4. – P. 227-242.
75. Chen, Q.Z. 45S5 Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering / Q.Z. Chen, I.D. Thompson, A.R. Boccaccini // *Biomaterials*. – 2006. – V. 27, №11. – P. 2414-2425.
76. Cheroutre, H. CD4 CTL: living up to the challenge / H. Cheroutre, M.M. Husain // *Seminars in immunology*. Academic Press. – 2013. – V. 25, №4. – P. 273-281.
77. Clonal deletion and the fate of autoreactive thymocytes that survive negative selection / L.A. Pobezinsky, G.S. Angelov, X. Tai, et al. // *Nature immunology*. – 2012. – V. 13, №6. – P. 569-578.
78. Combined deficiency of p50 and cRel in CD4+ T cells reveals an essential requirement for nuclear factor  $\kappa$ B in regulating mature T cell survival and in vivo function / Y. Zheng, M. Vig, J. Lyons, et al. // *The Journal of experimental medicine*. – 2003. – V. 197, №7. – P. 861-874.
79. Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity / J. Hutcheson, J. C. Scatizzi, A. M. Siddiqui et al. // *Immunity*. – 2008. – V.28, №. 2. – P. 206-217.
80. Concept of Hematopoietic and Stromal Niches for Cell-Based Diagnostics and Regenerative Medicine (a Review) / I.A. Khlusov, L.S. Litvinova, M.Y. Khlusova, et al. // *Current Pharmaceutical Design*. – 2018. – V. 24, №26. – P. 3034-3054.
81. Content-dependent osteogenic response of nanohydroxyapatite: an in vitro and in vivo assessment within collagen-based scaffolds / G.M. Cunniffe, C.M. Curtin, E.M. Thompson, et al. // *ACS applied materials & interfaces*. – 2016. – V. 8, №36. – P. 23477-23488.
82. Coyle. et al. Anti-ICOS antibodies and their use in treatment of oncology, transplantation and autoimmune disease: пат. 9193789 США. – 2015
83. Cupedo, T. Application of tissue engineering to the immune system: development of artificial lymph nodes / T. Cupedo, A.D. Stroock, M.C. Coles // *Frontiers in immunology*. – 2012. – V. 3. – P. 343.
84. Curtis, A.S.G. Control of cell behavior: topological factors / A.S.G. Curtis, M. Varde // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1964. – V. 33, №1. – P. 15-26.

85. Curtis, A.S.G. Topographical control of cells / A.S.G. Curtis, C. Wilkinson // *Biomaterials*. – 1997. – V. 18, №24. – P. 1573-1583.
86. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications / M. Liu, S. Guo, J. M. Hibbert, et al. // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2011. – V. 22, №. 3. – P. 121-130.
87. Cytokine-mediated regulation of expression of Gfi1 and U2afll4 genes activated by T-cells with different differentiation status in vitro / K.A. Yurova, N.A. Sokhonevich, O.G. Khaziakhmatova, et al. // *Biomeditsinskaya khimiya*. – 2016. – V. 62, №2. – P. 180-186.
88. Daidzein prevents the increase in CD4+ CD28null T cells and B lymphopoiesis in ovariectomized mice: a key mechanism for anti-osteoclastogenic effect / A.M. Tyagi, K. Srivastava, K. Sharan, et al. // *PloS one*. – 2011. – V. 6, №6. – P. e21216.
89. Dalby, M.J. Harnessing nanotopography and integrin–matrix interactions to influence stem cell fate / M.J. Dalby, N. Gadegaard, R.O.C. Oreffo // *Nature materials*. – 2014. – V. 14, №6. – P. 558-569.
90. Damsky, C.H. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo / C.H. Damsky, M.L. Fitzgerald, S.J. Fisher // *The Journal of clinical investigation*. – 1992. – V. 89, №1. – P. 210-222.
91. Delivering nucleic- acid based nanomedicines on biomaterial scaffolds for orthopedic tissue repair: challenges, progress and future perspectives / R.M. Raftery, D.P. Walsh, I.M. Castaño, et al. // *Advanced Materials*. – 2016. – V. 28, №27. – P. 5447-5469.
92. Dellatore, S.M. Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion / S.M. Dellatore, A.S. Garcia, W.M. Miller // *Current opinion in biotechnology*. – 2008. – V. 19, №5. – P. 534-540.
93. Delves, P.J. Encyclopedia of immunology / P.J. Delves, I.M. Roitt // *Academic Press*. – 1998. – P. 3072.
94. Design for Additive Manufacturing: Trends, opportunities, considerations, and constraints // M.K. Thompson, G. Moroni, T. Vaneker, et al. // *CIRP annals*. – 2016. – V. 65, №2. – P. 737-760.

95. Development of an accurate and proactive immunomodulatory strategy to improve bone substitute material-mediated osteogenesis and angiogenesis / Z.W. Zheng, Y.H. Chen, D.Y. Wu, et al. // *Theranostics*. – 2018. – V. 8, №19. – P. 5482.
96. Devreotes, P. Signaling networks that regulate cell migration / P. Devreotes A. R. Horwitz // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2015. – V. 7. №. 8. – P. a005959.
97. Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue / A.T. Mehlhorn, P. Niemeyer, S. Kaiser, et al. // *Tissue Engineering*. – 2006. – V. 12, №10. – P. 2853-2862.
98. Differential impact of the transcriptional repressor Gfi1 on mature CD4+ and CD8+ T lymphocyte function / D. Pargmann, R. Yücel, C. Kosan, et al. // *European journal of immunology*. – 2007. – V. 37, №12. – P. 3551-3563.
99. Differential response of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, dermal fibroblasts, and keratinocytes to burn wound exudates: potential role of skin-specific chemokine CCL27 / L.J. van den Broek, K.L. Kroeze, T. Waaijman, et al. // *Tissue Engineering Part A*. – 2014. – V. 20, №1-2. – P. 197-209.
100. Directing stem cell fate on hydrogel substrates by controlling cell geometry, matrix mechanics and adhesion ligand composition / J. Lee, A.A. Abdeen, D. Zhang, et al. // *Biomaterials*. – 2013. – V. 34, №33. – P. 8140-8148.
101. Distinct temporal patterns of T cell receptor signaling during positive versus negative selection in situ / H.J. Melichar, J.O. Ross, P. Herzmark, et al. // *Science signaling*. – 2013. – V. 6, №297. – P. ra92-ra92.
102. Generating long-lived CD8+ T- cell memory: Insights from epigenetic programs / P. Dogra H. E. Ghoneim, H. A. Abdelsamed, et al. // *European journal of immunology*. – 2016. – V. 46, № 7. – C. 1548-1562.
103. Dorozhkin, S.V. Calcium orthophosphates: applications in nature, biology, and medicine // S.V. Dorozhkin / CRC Press. – 2012.
104. Durable interactions of T cells with T cell receptor stimuli in the absence of a stable immunological synapse / V. Mayya, E. Judokusumo, E.A. Shah, et al. // *Cell reports*. – 2018. – V. 22, №2. – P. 340-349.

105. Duraccio, D. Biomaterials for dental implants: current and future trends / D. Duraccio, F. Mussano, M.G. Faga // *Journal of Materials Science*. – 2015. – V. 50, №14. – P. 4779-4812.
106. Dustin M. L. Signaling takes shape in the immune system / M. L. Dustin, A. C. Chan // *Cell*. – 2000. – V. 103, №. 2. – P. 283-294.
107. Dustin, M.L. The cellular context of T cell signaling // M.L. Dustin / *Immunity*. – 2009. – V. 30, №4. – P. 482-492.
108. Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA) / M.R. Moniri, A. Young, K. Reinheimer, et al. // *Cytotechnology*. – 2015. – V. 67, №2. – P. 379-386.
109. Edderkaoui, B. Potential role of chemokines in fracture repair // B. Edderkaoui / *Frontiers in endocrinology*. – 2017. – V. 8. – P. 39.
110. Edilova, M.I. TRAF1 signaling in human health and disease / M.I. Edilova, A.A. Abdul-Sater, T.H. Watts // *Frontiers in immunology*. – 2018. – V. 9. – P. 2969.
111. Effect of phase composition on protein adsorption and osteoinduction of porous calcium phosphate ceramics in mice / J. Wang, Y. Chen, X. Zhu, et al. // *Journal of biomedical materials research Part A*. – 2014. – V. 102, №12. – P. 4234-4243.
112. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes / N. Manjunath, P. Shankar, J. Wan, et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 2001. – V. 108, №6. – P. 871-878.
113. Efficiency of lamellipodia protrusion is determined by the extent of cytosolic actin assembly / G. Dimchev, A. Steffen, F. Kage, et al. // *Molecular biology of the cell*. – 2017. – V. 28, №10. – P. 1311-1325.
114. Eisenbarth, S. C. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function / S. C Eisenbarth // *Nature Reviews Immunology*. – 2019. – V.19. №. 2. – P. 89-103.
115. El-Ali, J. Cells on chips / J. El-Ali, P.K. Sorger, K.F. Jensen // *Nature*. – 2006. – V. 442, № 7101. – P. 403-411.
116. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death / S. Elmore // *Toxicologic pathology*. – 2007. – V. 35, №. 4. – P. 495-516.

117. Engineering microscale topographies to control the cell–substrate interface / M. Nikkhah, F. Edalat, S. Manoucheri, et al. // *Biomaterials*. – 2012. – V. 33, №21. – P. 5230-5246.
118. ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell–APC conjugation / S. Faure, L.I. Salazar-Fontana, M. Semichon, et al. // *Nature immunology*. – 2004. – V. 5, №3. – P. 272-279.
119. Ermis, M. Micro and Nanofabrication methods to control cell-substrate interactions and cell behavior: A review from the tissue engineering perspective / M. Ermis, E. Antmen, V. Hasirci // *Bioactive materials*. – 2018. – V. 3, №3. – P. 355-369.
120. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells / J.N. Blattman, R. Antia, D.J. Sourdive, et al. // *The Journal of experimental medicine*. – 2002. – V. 195, №5. – P. 657-664.
121. Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods / N.A. Barakat, M.S. Khil, A.M. Omran, et al. // *Journal of materials processing technology*. – 2009. – V. 209, №7. – P. 3408-3415.
122. Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphate nanoceramics / Y. Hong, H. Fan, B. Li, et al. // *Materials Science and Engineering: R: Reports*. – 2010. – V. 70, №3-6. – P. 225-242.
123. Fine tuning and efficient T cell activation with stimulatory aCD3 nanoarrays / J. Matic, J. Deeg, A. Scheffold, et al. // *Nano letters*. – 2013. – V. 13, №11. – P. 5090-5097.
124. Floros, T. Anticancer cytokines: biology and clinical effects of interferon- $\alpha$ 2, interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12 / T. Floros, A.A. Tarhini // *Seminars in oncology*. – 2015. – V. 42, №4. – P. 539-548.
125. Formation and properties of bioactive surface layers on titanium / S.V. Gnedenkov, Y.P. Scharkeev, S.L. Sinebryukhov, et al. // *Inorganic Materials: Applied Research*. – 2011. – V. 2, №5. – P. 474-481.
126. Foti, M. Cytokine Effector Functions in Tissues / M. Foti, M. Locati // *Academic Press*. – 2017.

127. Foulds, K.E. IL-10 is required for optimal CD8 T cell memory following *Listeria monocytogenes* infection / K.E. Foulds, M.J. Rotte, R.A. Seder // *The Journal of Immunology*. – 2006. – V. 177, №4. – P. 2565-2574.
128. Fox, C.J. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response / C.J. Fox, P.S. Hammerman, C.B. Thompson // *Nature Reviews Immunology*. – 2005. – V. 5, №11. – P. 844-852.
129. Frauwirth, K.A. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation / K.A. Frauwirth, C.B. Thompson // *The Journal of clinical investigation*. – 2002. – V. 109, №3. – P. 295-299.
130. Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates / S. Sarkar, V. Kalia, W.N. Haining, et al. // *The Journal of experimental medicine*. – 2008. – V. 205, №3. – P. 625-640.
131. García-Gareta, E. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration / E. García-Gareta, M.J. Coathup, G.W. Blunn // *Bone*. – 2015. – V. 81. – P. 112-121.
132. Geiger, B. Environmental sensing through focal adhesions / B. Geiger, J.P. Spatz, A.D. Bershadsky // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2009. – V. 10, №1. – P. 21-33.
133. Gérard, C. Modeling the dynamics of Let-7-coupled gene regulatory networks linking cell proliferation to malignant transformation / C. Gérard, F. Lemaigre, D. Gonze // *Frontiers in physiology*. – 2019. – V. 10. – P. 848.
134. Gfi1: green fluorescent protein knock-in mutant reveals differential expression and autoregulation of the growth factor independence 1 (Gfi1) gene during lymphocyte development / R. Yücel, C. Kosan, F. Heyd // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279, №39. – P. 40906-40917.
135. GM-CSF priming drives bone marrow-derived macrophages to a pro-inflammatory pattern and downmodulates PGE 2 in response to TLR2 ligands / C.A. Sorgi, S. Rose, D. Carlos, et al. // *PloS one*. – 2012. – V. 7, №7. – P. e40523.
136. Good M. Neonatal Pulmonary Host Defense / M. Good, J. K. Kolls, K. M. G. Empey // *Fetal and Neonatal Physiology*. – Elsevier, 2017. – P 1262-1293. e12.
137. Granneman, S. Building ribosomes: even more expensive than expected? / S. Granneman, D. Tollervey // *Current biology*. – 2007. – V. 17, №11. – P. R415-R417.

138. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis / L. Bo, F. Wang, J. Zhu, et al. // *Critical care*. – 2011. – V. 15, №1. – P. R58.
139. Greenblatt, M.B. Osteoimmunology: a brief introduction / M.B. Greenblatt, J.H. Shim // *Immune network*. – 2013. – V. 13, №4. – P. 111-115.
140. Grier, W.K. The influence of pore size and stiffness on tenocyte bioactivity and transcriptomic stability in collagen-GAG scaffolds / W.K. Grier, E.M. Iyoha, B.A. Harley, B.A. // *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. – 2017. – V. 65. – P. 295-305.
141. Harris, N. Immunology: Chronic effects of acute infections // N. Harris / *Nature*. – 2015. – V. 526, № 7574. – P. 509-510.
142. Healing of subcapital femoral osteotomies fixed with self-reinforced poly-L-lactide screws: an experimental long-term study in sheep / K. Jukkala-Partio, O. Laitinen, J. Vasenius, et al. // *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. – 2002. – V. 122, №6. – P. 360-364.
143. Hench, L.L. The story of Bioglass® // L.L. Hench / *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006. – V. 17, №11. – P. 967-978.
144. Histological and three-dimensional evaluation of osseointegration to nanostructured calcium phosphate-coated implants / R. Jimbo, P.G. Coelho, S. Vandeweghe, et al. // *Acta biomaterialia*. – 2011. – V. 7, №12. – P. 4229-4234.
145. Homeostasis of memory T cells / C.D. Surh, O. Boyman, J.F. Purton, et al. // *Immunological reviews*. – 2006. – V. 211, №1. – P. 154-163.
146. Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells / O. Boyman, S. Létourneau, C. Krieg, et al. // *European journal of immunology*. – 2009. – V. 39, №8. – P. 2088-2094.
147. hTERT promoter induces tumor-specific Bax gene expression and cell killing in syngenic mouse tumor model and prevents systemic toxicity / J. Gu, M. Andreeff, J.A. Roth, et al. // *Gene Therapy*. – 2002. – V. 9, №1. – P. 30-37.
148. Hua, X. Quiescent T cells: actively maintaining inactivity / X. Hua, C.B. Thompson // *Nature immunology*. – 2001. – V. 2, №12. – P. 1097-1098.
149. Human memory CD8 T cell effector potential is epigenetically preserved during in vivo homeostasis / H.A. Abdelsamed, A. Moustaki, Y. Fan, et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2017. – V. 214, №6. – P. 1593-1606.

150. Human naïve T cells express functional CXCL8 and promote tumorigenesis / J. Crespo, K. Wu, W. Li, et al. // *The Journal of Immunology*. – 2018. – V. 201, №2. – P. 814-820.
151. Human T cell differentiation negatively regulates telomerase expression resulting in reduced activation-induced proliferation and survival / M.S. Patrick, N.L. Cheng, J. Kim, et al. // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – V. 10. – P. 1993.
152. Hutmacher, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage // D.W. Hutmacher / *Biomaterials*. – 2000. – V.21, №24. – P. 2529-2543.
153. Hydrogels based on cellulose and chitin: fabrication, properties, and applications / X. Shen, J.L. Shamshina, P. Berton, et al. // *Green Chemistry*. – 2016. – V. 18, №1. – P. 53-75.
154. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28 / A. Hutloff, A.M. Dittrich, K.C. Beier, et al. // *Nature*. – 1999. – V. 397, №6716. – P. 263-266.
155. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6 / Y.S. Choi, R. Kageyama, D. Eto, et al. // *Immunity*. – 2011. – V. 34, №6. – P. 932-946.
156. ICOS: ICOS-ligand interaction is required for type 2 innate lymphoid cell function, homeostasis, and induction of airway hyperreactivity / H. Maazi, N. Patel, I. Sankaranarayanan, et al. // *Immunity*. – 2015. – V. 42, №3. – P. 538-551.
157. Identification of CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T cells as potential regulatory cells in an experimental murine model of graft-versus-host skin disease (GVHD) / F. Miyagawa, N. Okiyama, V. Villarroel, et al. // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2013. – V. 133, №11. – P. 2538-2545.
158. Identification of immune effectors essential to the control of primary and secondary intranasal infection with *Brucella melitensis* in mice / D.H. Mambres, A. Machelart, G. Potemberg, et al. // *The Journal of Immunology*. – 2016. – V. 196, №9. – P. 3780-3793.
159. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  synergism may provide a link between psoriasis and inflammatory atherogenesis / N.N. Mehta, H.L. Teague, W.R. Swindell, et al. // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7, №1. – P. 1-11.

160. IL-15 regulates CD8<sup>+</sup> T cell contraction during primary infection / T. Yajima, K. Yoshihara, K. Nakazato, et al. // *The Journal of Immunology*. – 2006. – V. 176, №1. – P. 507-515.
161. IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis / G. Malamut, R. El Machhour, N. Montcuquet, et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 2010. – V. 120, №6. – P. 2131-2143.
162. IL-15R $\alpha$  recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells / S. Dubois, J. Mariner, T.A. Waldmann, et al. // *Immunity*. – 2002. – V. 17, №5. – P. 537-547.
163. IL-17 Promotes Angiogenic Factors IL-6, IL-8, and Vegf Production via Stat1 in Lung Adenocarcinoma / Q. Huang, L. Duan, X. Qian, et al. // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6. – P. 36551.
164. IL-2-and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets / S. Létourneau, C. Krieg, G. Pantaleo, et al. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2009. – V. 123, №4. – P. 758-762.
165. IL-4 inhibits TGF- $\beta$ -induced Foxp3<sup>+</sup> T cells and, together with TGF- $\beta$ , generates IL-9<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> effector T cells / V. Dardalhon, A. Awasthi, H. Kwon, et al. // *Nature immunology*. – 2008. – V. 9, №. 12. – P. 1347-1355.
166. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells / J.C. Rathmell, E.A. Farkash, W. Gao, et al. // *The Journal of Immunology*. – 2001. – V. 167, №12. – P. 6869-6876.
167. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis / J. Unsinger, M. McGlynn, K.R. Kasten, et al. // *The Journal of immunology*. – 2010. – V. 184, №7. – P. 3768-3779.
168. IL-7-dependent STAT1 activation limits homeostatic CD4<sup>+</sup> T cell expansion / C. Le Saout, M.A. Luckey, A.V. Villarino, et al. // *JCI insight*. – 2017. – V. 2, №22.
169. Immune modulation by transplanted calcium phosphate biomaterials and human mesenchymal stromal cells in bone regeneration / P. Humbert, M.  . Brennan, N. Davison, et al. // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – V. 10. – P. 663.

170. Immunological characterization of the early human fracture hematoma / P. Hoff, T. Gaber, C. Strehl, et al. // *Immunologic research*. – 2016. – V. 64, №5-6. – P. 1195-1206.
171. Impaired upregulation of the costimulatory molecules, CD27 and CD28, on CD4+ T cells from HIV patients receiving ART is associated with poor proliferative responses / S. Tanaskovic, P. Price, M.A. French, et al. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2017. – V. 33, №2. – P. 101-109.
172. Implant biomaterials: A comprehensive review / M. Saini, Y. Singh, P. Arora, et al. // *World Journal of Clinical Cases: WJCC*. – 2015. – V. 3, №1. – P. 52.
173. Implant placement post extraction in esthetic single tooth sites: when immediate, when early, when late? / D. Buser, V. Chappuis, U.C. Belser, et al. // *Periodontology 2000*. – 2017. – V. 73, №1. – P. 84-102.
174. Implant surface design regulates mesenchymal stem cell differentiation and maturation / B.D. Boyan, A. Cheng, R. Olivares-Navarrete, et al. // *Advances in dental research*. – 2016. – V. 28, №1. – P. 10-17.
175. Improvement of the bone-pin interface strength in osteoporotic bone with use of hydroxyapatite-coated tapered external-fixation pins: a prospective, randomized clinical study of wrist fractures / A. Moroni, C. Faldini, S. Marchetti, et al. // *JBJS*. – 2001. – V. 83, №5. – P. 717-721.
176. Improving osteoblast response in vitro by a nanostructured thin film with titanium carbide and titanium oxides clustered around graphitic carbon / G. Longo, C.A. Ioannidu, A. Scotto d'Abusco, et al. // *PLoS One*. – 2016. – V. 11, №3. – P. e0152566.
177. Inflammation, fracture and bone repair / F. Loi, L.A. Córdova, J. Pajarinen, et al. // *Bone*. – 2016. – V. 86. – P. 119-130.
178. Integrin-assisted T-cell activation on nanostructured hydrogels / J. Guasch, C.A. Muth, J. Diemer, et al. // *Nano Letters*. – 2017. – V. 17, №10. – P. 6110-6116.
179. Interaction between a 3D collagen matrix used for periodontal soft tissue regeneration and T-lymphocytes: An in vitro pilot study / D. Rusu, M. Boariu, S.I. Stratul, et al. // *Experimental and therapeutic medicine*. – 2019. – V. 17, №2. – P. 990-996.

180. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) are necessary in the early stages of induction of CD4 and CD8 cytotoxic T cells by *Mycobacterium leprae* heat shock protein (hsp) 65 kD./ M. Del, C. Sasiain, S. De La Barrera, et al. // *Clinical and Experimental Immunology*. – 1998. – V. 114, №2. – P. 196.
181. Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis / S.H. Lee, J. ye Kwon, S.Y. Kim, et al. // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7, №1. – P. 1-9.
182. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells / J.T. Tan, B. Ernst, W.C. Kieper // *The Journal of experimental medicine*. – 2002. – V. 195, №12. – P. 1523-1532.
183. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells / T.C. Becker, E.J. Wherry, D. Boone, et al. // *The Journal of experimental medicine*. – 2002. – V. 195, №12. – P. 1541-1548.
184. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation / J. Cote-Sierra, G. Foucras, L. Guo // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – V. 101, №11. – P. 3880-3885.
185. Interleukin- 10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl- 2 / S.B.A. Cohen, J.B. Crawley, M.C. Kahan, et al. // *Immunology*. – 1997. – V. 92, №1. – P. 1-5.
186. Interleukin- 10- secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans / M. Grazia Roncarolo, S. Gregori, M. Battaglia, et al. // *Immunological reviews*. – 2006. – V. 212, №1. – P. 28-50.
187. Interleukin-15 modulates adipose tissue by altering mitochondrial mass and activity / N.G. Barra, R. Palanivel, E. Denou, et al. // *PloS one*. – 2014. – V. 9, №12. – P. e114799.
188. Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation / A. Ballesteros-Tato, B. León, B.A. Graf, et al. // *Immunity*. – 2012. – V. 36, №5. – P. 847-856.
189. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation / A. Laurence, C.M. Tato, T.S. Davidson, et al. // *Immunity*. – 2007. – V. 26, №3. – P. 371-381.

190. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo / K.S. Schluns, W.C. Kieper, S.C. Jameson, et al. // *Nature immunology*. – 2000. – V. 1, №5. – P. 426-432.
191. Interleukin-9 promotes tumorigenesis through augmenting angiogenesis in non-small cell lung cancer / J. He, L. Wang, C. Zhang, et al. // *International immunopharmacology*. – 2019. – V.75. – P. 105766.
192. Investigation on the in vitro cytocompatibility of Mg-Zn-Y-Nd-Zr alloys as degradable orthopaedic implant materials / X. Song, L. Chang, J. Wang, et al. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2018. – V. 29, №4. – P. 44.
193. Issuree, P.D. Heritable gene regulation in the CD4: CD8 T cell lineage choice / P.D. Issuree, C.P. Ng, D.R. Littman // *Frontiers in immunology*. – 2017. – V. 8. – P. 291.
194. Jeffers, J.R.T. Ceramic-on-ceramic bearings in hip arthroplasty: state of the art and the future / J.R.T. Jeffers, W.L. Walter // *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. – 2012. – V. 94, №6. – P. 735-745.
195. Jeon, K.W. (Ed.). *International review of cell and molecular biology* // K.W. Jeon/. Academic Press. – 2013.
196. Jin Z. Overview of cell death signaling pathways / Z. Jin, W. S. El-Deiry // *Cancer biology & therapy*. – 2005. – V.4, №. 2. – P. 147-171.
197. Jones, R.G. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation / R.G. Jones, C.B. Thompson // *Immunity*. – 2007. – V. 27, №12. – P. 173-178.
198. Kalita, S.J. Nanocrystalline hydroxyapatite bioceramic using microwave radiation: Synthesis and characterization / S.J. Kalita, S. Verma // *Materials Science and Engineering : C*. – 2010. – V. 30, №2. – P. 295-303.
199. Kang, S.S. Priming in the presence of IL-10 results in direct enhancement of CD8+ T cell primary responses and inhibition of secondary responses / S.S. Kang, P.M. Allen // *The Journal of Immunology*. – 2005. – V. 174, №9. – P. 5382-5389.
200. Kavurma, M.M. Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression / M.M. Kavurma, L.M. Khachigian // *Cell Death & Differentiation*. – 2003. – V. 10, №1. – P. 36-44.

201. Kawabe, T. Foreign antigen-independent memory-phenotype CD4<sup>+</sup> T cells: a new player in innate immunity? / T. Kawabe, J. Zhu, A. Sher // *Nature Reviews Immunology*. – 2018. – V. 18, №3. – P. 1.
202. Knight, E. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue- like structures to be created in vitro / E. Knight, S. Przyborski // *Journal of anatomy*. – 2015. – V. 227, №6. – P. 746-756.
203. Krishnan, K. Intestinal growth factors: potential use in the treatment of inflammatory bowel disease and their role in mucosal healing / K. Krishnan, B. Arnone, A. Buchman // *Inflammatory bowel diseases*. – 2011. – V. 17, №1. – P. 410-422.
204. Krummel M. F. T cell migration, search strategies and mechanisms / Krummel M. F., Bartumeus F., Gérard A. // *Nature Reviews Immunology*. – 2016. – V.16, №. 3. – C. 193.
205. Krummel, M.F. Modes and mechanisms of T cell motility: roles for confinement and Myosin-IIA / M.F. Krummel, R.S. Friedman, J. Jacobelli // *Current opinion in cell biology*. – 2014. – V. 30. – P. 9-16.
206. Lämmermann, T. The multiple faces of leukocyte interstitial migration / T. Lämmermann, R.N. Germain // *In Seminars in immunopathology*. Springer Berlin Heidelberg. – 2014. – V. 36, №2. – P. 227-251.
207. LeGeros, R.Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials // R.Z. LeGeros / *Chemical reviews*. – 2008. – V. 108, №11. – P. 4742-4753.
208. Li, Q. *Biomaterials for Implants and Scaffolds* / Q. Li, Y.W. Mai (ed.) – Berlin, Germany: Springer, 2017. – P. 195-235.
209. Li, R. An investigation of bioactive glass powders by sol- gel processing / R. Li, A.E. Clark, L.L. Hench // *Journal of Applied Biomaterials*. – 1991. – V. 2, №4. – P. 231-239.
210. Li, Y. The horizon of materiobiology: a perspective on material-guided cell behaviors and tissue engineering / Y. Li, Y. Xiao, C. Liu // *Chemical reviews*. – 2017. – V. 117, №5. – P. 4376-4421.
211. Liao, W. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation / W. Liao, J.X. Lin, W.J. Leonard // *Current opinion in immunology*. – 2011. – V. 23, №5. – P. 598-604.

212. Liew, F.Y. The role of innate cytokines in inflammatory response // F.Y. Liew / *Immunology letters*. – 2003. – V. 85, №2. – P. 131-134.
213. Lin, J.X. The common cytokine receptor  $\gamma$  chain family of cytokines / J.X. Lin, W.J. Leonard // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2018. – V. 10, №9. – P. a028449.
214. Littman D.R. How thymocytes achieve their fate // D.R. Littman / *The Journal of Immunology*. – 2016. – V. 196, №5. – P. 1983-1984.
215. Lorenzo, J. The effects of immune cell products (cytokines and hematopoietic cell growth factors) on bone cells // J. Lorenzo / *In Osteoimmunology*. Academic Press. – 2016. – P. 143-167.
216. Ma, P.X. Biomimetic materials for tissue engineering // P.X. Ma / *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2008. – V. 60, №2. – P. 184-198.
217. Marine organisms as a source of natural matrix for bone tissue engineering / V. Lalzawmliana, A. Anand, P. Mukherjee, et al. // *Ceramics International*. – 2019. – V. 45, №2. – P. 1469-1481.
218. Marrack, P. Control of T cell viability/ P. Marrack, J. Kappler // *Annu. Rev. Immunol.* – 2004. – V. 22. – P. 765-787.
219. Mattila, P.K. Filopodia: molecular architecture and cellular functions / P.K. Mattila, P. Lappalainen // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2008. – V. 9, №6. – P. 446-454.
220. Mature T lymphocyte apoptosis—immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment / M. Lenardo, F.K.M. Chan, F. Hornung, et al. // *Annual review of immunology*. – 1999. – V. 17, №1. – P. 221-253.
221. Maurer, M. Macrophage inflammatory protein-1 / M. Maurer, E. Von Stebut // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2004. – V. 36, №10. – P. 1882-1886.
222. Mechanochemical synthesis of nanosized functional materials with the apatite-type structure / M. V. Chaikina, N. F. Uvarov, A. S. Ulihin, et al. // *Problems of Materials Science*. – 2008. – V. 54, №. 2. – P. 219-232.
223. Mempel, T. R. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases / T. R. Mempel, S. E. Henrickson, U. H. Von Andrian // *Nature*. – 2004. – V. 427, №. 6970. – P. 154-159.

224. Menten, P. Macrophage inflammatory protein-1 / P. Menten, A. Wuyts, J. Van Damme // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2002. – V. 13, №6. – P. 455-481.
225. Micro-/nano-scales direct cell behavior on biomaterial surfaces / S. Wang, J. Li, Z. Zhou, et al. // *Molecules*. – 2019. – V. 24, №1. – P. 75.
226. Microdialysis sampling from wound fluids enables quantitative assessment of cytokines, proteins, and metabolites reveals bone defect-specific molecular profiles / Y. Förster, J.R. Schmidt, D.K. Wissenbach, et al. // *PloS one*. – 2016. – V. 11, №7. – P. e0159580.
227. Mishra, A. Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer / A. Mishra, L. Sullivan, M.A. Caligiuri // *Clinical Cancer Research*. – 2014. – V. 20, №8. – P. 2044-2050.
228. Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications / P. Roach, D. Eglin, K. Rohde, et al. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2007. – V. 18, №7. – P. 1263-1277.
229. Molecular structures of transcribing RNA polymerase I / L. Tafur, Y. Sadian, N.A. Hoffmann, et al. // *Molecular cell*. – 2016. – V. 64, №6. – P. 1135-1143.
230. Motamedi M. Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers / M. Motamedi, L. Xu, S. Elahi // *Journal of immunological methods*. – 2016. – V.437. – P. 43-52.
231. Mueller, D.L. T cells: a proliferation of costimulatory molecules // D.L. Mueller / *Current Biology*. – 2000. – V. 10, №6. – P. R227-R230.
232. Murine lymph node- derived stromal cells effectively support survival but induce no activation/proliferation of peripheral resting T cells in vitro / Y.W. Zhou, S. Aritake, A. Tri Endharti, et al. // *Immunology*. – 2003. – V. 109, №4. – P. 496-503.
233. Murr, L.E. Strategies for creating living, additively manufactured, open-cellular metal and alloy implants by promoting osseointegration, osteoinduction and vascularization: An overview // L.E. Murr / *Journal of Materials Science & Technology*. – 2019. – V. 35, №2. – P. 231-241.

234. Nanoscale electrical potential and roughness of a calcium phosphate surface promotes the osteogenic phenotype of stromal cells / I.A. Khlusov, Y. Dekhtyar, Y.P. Sharkeev, et al. // *Materials*. – 2018. – V. 11, №6. – P. 978.
235. Nanotechnology for cell–substrate interactions / N.J. Sniadecki, R.A. Desai, S.A. Ruiz, et al. // *Annals of biomedical engineering*. – 2006. – V. 34, №1. – P. 59-74.
236. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine / H.N. Kim, A. Jiao, N.S. Hwang, et al. // *Advanced drug delivery reviews*. – 2013. – V. 65, №4. – P. 536-558.
237. Nepola, J.V. External fixation / In C.A. Rockwood, D.P. Green, R.W. Buzkholz (Eds.), et al. - Philadelphia : Lippincott-Raven, 1996. – V. 1. – P. 229-304.
238. Niinomi, M. Metallic biomaterials // M. Niinomi / *Journal of Artificial Organs*. – 2008. – V. 11, №3. – P. 105.
239. Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation / A. Soares, L. Govender, J. Hughes, et al. // *Immunological methods*. – 2010. – V. 362, №1-2. – P. 43-50.
240. Nuclear Factor- $\kappa$ B: central regulator in ocular surface inflammation and diseases / W. Lan, A. Petznick, S. Heryati, et al. // *The ocular surface*. – 2012. – V. 10, №3. – P. 137-148.
241. O'brien, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering // F.J. O'brien / *Materials today*. – 2011. – V. 14, №3. – P. 88-95.
242. Oestreich, K.J. Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in T H 1 cells to regulate flexibility with a T FH-like gene profile / K.J. Oestreich, S.E. Mohn, A.S. Weinmann // *Nature immunology*. – 2012. – V. 13, №4. – P. 405.
243. Okazaki, Y. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro / Y. Okazaki, E. Gotoh // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26, №1. – P. 11-21.
244. Ong, J.L. Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: a review / J.L. Ong, D.C. Chan // *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*. – 2000. – V. 28, №5&6.

245. Opferman, J.T. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development / J.T. Opferman, A. Kothari // *Cell Death & Differentiation*. – 2018. – V. 25, №1. – P. 37-45.
246. Opferman, J.T. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system / J.T., Opferman, S.J. Korsmeyer // *Nature immunology*. – 2003. – V. 4, №5. – P. 410-415.
247. Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression / W. Liao, R. Spolski, P. Li, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – V.111, №9. – P. 3508-3513.
248. Optimization and validation of a robust human T-cell culture method for monitoring phenotypic and polyfunctional antigen-specific CD4 and CD8 T-cell responses / Y. Lin, H. F Gallardo, G. Y. Ku, et al. // *Cytherapy*. – 2009. – V. 11, №. 7. – C. 912-922.
249. Paulsen, M. Pro-and anti-apoptotic CD95 signaling in T cells / M. Paulsen, O. Janssen // *Cell Communication and Signaling*. – 2011. – V. 9, №1. – P. 1-9.
250. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review / B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, et al. // *International journal of polymer science*. – 2011. – V. 2011.
251. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death / M.C. Wei, W.X. Zong, E.H.Y. Cheng, et al. // *Science*. – 2001. – V. 292, №5517. – P. 727-730.
252. Processing and properties of magnesium alloy micro-tubes for biodegradable vascular stents / J. Wang, Y. Zhou, Z. Yang, et al. // *Materials Science and Engineering: C*. – 2018. – V. 90. – P. 504-513.
253. Production of the growth factors GM-CSF, G-CSF, and VEGF by human peripheral blood cells induced with metal complexes of human serum  $\gamma$ -globulin formed with copper or zinc ions / S.B. Cheknev, M.A. Apresova, N.A. Moryakova, et al. // *Mediators of inflammation*. – 2014. – V. 2014.
254. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3'untranslated regions and fewer microRNA target sites / R. Sandberg, J.R. Neilson, A. Sarma, et al. // *Science*. – 2008. – V. 320, №5883. – P. 1643-1647.

255. Ratnayake, J.T. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends / J.T. Ratnayake, M. Mucalo, G.J. Dias // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2017. – V. 105, №5. – P. 1285-1299.
256. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review / A. Haider, S. Haider, S.S. Han, et al. // *Rsc Advances*. – 2017. – V. 7, №13. – P. 7442-7458.
257. Regulation of CD45 alternative splicing by heterogeneous ribonucleoprotein, hnRNPLL / S. Oberdoerffer, L.F. Moita, D. Neems, et al. // *Science*. – 2008. – V. 321, №5889. – P. 686-691.
258. Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15 / J.P. Lodolce, P.R. Burkett, R.M. Koka, et al. // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2002. – V. 13, №6. – P. 429-439.
259. Regulation of T cells and cytokines by the interleukin- 10 (IL- 10)- family cytokines IL- 19, IL- 20, IL- 22, IL- 24 and IL- 26 / H.B. Oral, S.V. Kotenko, M. Yilmaz, et al. // *European journal of immunology*. – 2006. – V. 36, №2. – P. 380-388.
260. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behavior / L. Ponsonnet, K. Reybier, N. Jaffrezic, et al. // *Materials Science and Engineering: C*. – 2003. – V. 23, №4. – P. 551-560.
261. Removal of AY99 from an aqueous solution using an emulsified liquid membrane. Application of Plackett-Burman Design / L. Bahloul, F. Ismail, M.E.H. Samar, et al. // *Energy Procedia*. – 2014. – V. 50. – P. 1008-1016.
262. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice / M.K. Kennedy, M. Glaccum, S.N. Brown, et al. // *The Journal of experimental medicine*. – 2000. – V. 191, №5. – P. 771-780.
263. Ridiandries, A. The role of CC-chemokines in the regulation of angiogenesis / A. Ridiandries, J. Tan, C.A. Bursill // *International journal of molecular sciences*. – 2016. – V. 17, №11. – P. 1856.
264. Rikitake, Y. Directional cell migration: regulation by small G proteins, Nectin-like molecule-5, and afadin / Y. Rikitake, Y. Takai // *International review of cell and molecular biology*. – Academic Press. – 2011. – V. 287. – P. 97-143.

265. Ripamonti, U. Osteoinductive hydroxyapatite-coated titanium implants / U. Ripamonti, L.C. Roden, L.F. Renton // *Biomaterials*. – 2012. – V. 33, №15. – P. 3813-3823.
266. Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Cancer / P.L. Loyher, M.P. Rodero, C. Combadière, et al. // *In Cancer Immunology*. Springer, Cham. – 2020. – P. 235-262.
267. Salim, T. Investigating the role of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  activation on the dynamics of iNOS gene expression in LPS stimulated macrophages / T. Salim, C.L. Serksen, E.E. May // *PloS one*. – 2016. – V.11, №6. – P. e0153289.
268. Sallusto F. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses / F. Sallusto, C. R Mackay, A. Lanzavecchia // *Annual review of immunology*. – 2000. – V. 18, №. 1. – P. 593-620.
269. Schmitt E. Th9 cells, new players in adaptive immunity / E. Schmitt, M. Klein, T. Bopp // *Trends in immunology*. – 2014. – V. 35, №. 2. – P. 61-68.
270. Seddon, B. TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells / B. Seddon, R. Zamoyska // *The Journal of Immunology*. – 2002. – V. 169, №6. – P. 2997-3005.
271. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair / J. Kisiday, M. Jin, B. Kurz, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – V. 99, №15. – P. 9996-10001.
272. Sepsis / H.R. Wong, J.E. Nowak, S.W. Standage, et al. // *Pediatric Critical Care*. – 2011. – P. 1413-1429.
273. Silva, S.L. Establishment and maintenance of the human naive CD4+ T-cell compartment / S.L. Silva, A.E. Sousa // *Frontiers in pediatrics*. – 2016. – V. 4. – P. 119.
274. Singer, A. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4-versus CD8-lineage choice / A. Singer, S. Adoro, J.H. Park // *Nature Reviews Immunology*. – 2008. – V. 8, №10. – P. 788-801.
275. Smith, I.O. Cell and biomolecule delivery for regenerative medicine / I.O. Smith, P.X. Ma // *Science and technology of advanced materials*. – P. 2010.
276. Smith-Garvin, J.E. T-cell activation / J.E. Smith-Garvin, G.A. Koretzky, M.S. Jordan // *Annual review of immunology*. – 2009. – V. 27. – P. 591-619.

277. Sorobetea, T. Immunity to gastrointestinal nematode infections / D. Sorobetea, M. Svensson-Frej, R. Grecis // *Mucosal Immunology*. – 2018. – V. 11, №2. – P. 304-315.
278. Spetz, J. T cells and regulated cell death: kill or be killed / J. Spetz, A.G. Presser, K.A. Sarosiek // *In International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press. – 2019. – V. 342. – P. 27-71.
279. Stable T cell–dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo / G. Shakhar, R. L. Lindquist, D. Skokos, et al. // *Nature immunology*. – 2005. – V. 6. №. 7. – P. 707-714.
280. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells / X.O. Yang, A.D. Panopoulos, A.R. Nurieva, et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – V. 282, №13. – P. 9358-9363.
281. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation / J. Zhu, J. Cote-Sierra, L. Guo, et al. // *Immunity*. – 2003. – V. 19, №5. – P. 739-748.
282. STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation / R.J. Johnston, Y.S. Choi, J.A. Diamond, et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2012. – V. 209, №2. – P. 243-250.
283. STAT5 is essential for IL-7–mediated viability, growth, and proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells / D. Ribeiro, A. Melão, R. van Boxtel, et al. // *Blood advances*. – 2018. – V. 2, №17. – P. 2199-2213.
284. Steel, J.C. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer / J.C. Steel, T.A. Waldmann, J.C. Morris // *Trends in pharmacological sciences*. – 2012. – V. 33, №1. – P. 35-41.
285. Suboptimal T-cell receptor signaling compromises protein translation, ribosome biogenesis, and proliferation of mouse CD8 T cells / T.C. Tan, J. Knight, T. Sbarrato, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – V. 114, №30. – P. E6117-E6126.
286. Sung, J.H. A micro cell culture analog ( $\mu$ CCA) with 3-D hydrogel culture of multiple cell lines to assess metabolism-dependent cytotoxicity of anti-cancer drugs / J.H. Sung, M.L. Shuler // *Lab on a Chip*. – 2009. – V. 9, №10. – P. 1385-1394.
287. Surface characteristics of dental implants: A review / F. Rupp, L. Liang, J. Geis-Gerstorfer, et al. // *Dental Materials*. – 2018. – V. 34, №1. – P. 40-57.

288. Surface functionalization of nanobiomaterials for application in stem cell culture, tissue engineering, and regenerative medicine / D. Rana, K. Ramasamy, M. Leena, et al. // *Biotechnology Progress*. – 2016. – V. 32, №3. – P. 554-567.
289. Surface topography enhances differentiation of mesenchymal stem cells towards osteogenic and adipogenic lineages / G. Abagnale, M. Steger, V.H. Nguyen, et al. // *Biomaterials*. – 2015. – V. 61. – P. 316-326.
290. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin / I.V. Yannas, E. Lee, D.P. Orgill, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1989. – V. 86, №3. – P. 933-937.
291. Synthesis of binary nanopatterns on hydrogels for initiating cellular responses / J. Guasch, J. Diemer, H. Riahinezhad, et al. // *Chemistry of Materials*. – 2016. – V. 28, №6. – P. 1806-1815.
292. T cell apoptosis and reactive oxygen species / D.A. Hildeman, T. Mitchell, J. Kappler, et al. // *The Journal of clinical investigation*, – 2003. – V. 111, №5. – P. 575-581.
293. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro / D. Leppert, E. Waubant, R. Galardy, et al. // *The Journal of Immunology*. – 1995. – V. 154, №9. – P. 4379-4389.
294. T lymphocyte migration: an action movie starring the actin and associated actors / L. Dupré, R. Houmadi, C. Tang, et al. // *Frontiers in immunology*. – 2015. – V.6. – P. 586.
295. Tamatani, T. AILIM/ICOS: a novel lymphocyte adhesion molecule / T. Tamatani, K. Tezuka, N. Hanzawa-Higuchi // *International immunology*. – 2000. – V. 12, №1. – P. 51-55.
296. Taniuchi, I. CD4 helper and CD8 cytotoxic T cell differentiation // I. Taniuchi / *Annual review of immunology*. – 2018. – V. 36. – P. 579-601.
297. TCR microclusters form spatially segregated domains and sequentially assemble in calcium-dependent kinetic steps / J. Yi, L. Balagopalan, T. Nguyen, et al. // *Nature communications*. – 2019. – V. 10, №1. – P. 1-13.
298. The assessment of Ki-67 as a prognostic marker in neuroendocrine tumours: a systematic review and meta-analysis / S. Richards-Taylor, S.M.

- Ewings, E. Jaynes, et al. // *Journal of clinical pathology*. – 2016. – V. 69, №7. – P. 612-618.
299. The concentration of the C- type lectin, mannan- binding protein, in human plasma increases during an acute phase response / S. Thiel, U. Holmskov, L. Hviid, et al. // *Clinical & Experimental Immunology*. – 1992. – V. 90, №1. – P. 31-35.
300. The effects of CCL3, CCL4, CCL19 and CCL21 as molecular adjuvants on the immune response to VAA DNA vaccine in flounder (*Paralichthys olivaceus*) // H. Xu, J. Xing, X. Tang, et al. // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2020. – V. 103. – P. 103492.
301. The Fas–FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations / L. Wang, J.K. Yang, V. Kabaleeswaran, et al. // *Nature structural & molecular biology*. – 2010. – V. 17, №11. – P. 1324.
302. The haematoma and its role in bone healing / H. Schell, G.N. Duda, A. Peters, et al. // *Journal of experimental orthopaedics*. – 2017. – V. 4, №1. – P. 5.
303. The influence of implant surface properties on cell adhesion and proliferation / V. Peššková, D. Kubies, H. Hulejova, et al. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2007. – V. 18, №3. – P. 465-473.
304. The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics / Z. Tang, X. Li., Y. Tan, et al. // *Regenerative biomaterials*. – 2018. – V. 5, №1. – P. 43-59.
305. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 / J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. – 2011. – V. 1813, №5. – P. 878-888.
306. The repair of segmental bone defects with porous bioglass: an experimental study in goat / S.K. Nandi, B. Kundu, S. Datta, et al. // *Research in veterinary science*. – 2009. – V. 86, №1. – P. 162-173.
307. The Role of Bim, a Proapoptotic BH3- Only Member of the Bcl- 2 Family, in Cell- Death Control / A. Strasser, H. Puthalakath, P. Bouillet, et al. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2000. – V. 917, №1. – P. 541-548.
308. The role of CD95 in the regulation of peripheral T- cell apoptosis / A. Krueger, S. C. Fas, S. Baumann et al. // *Immunological reviews*. – 2003. – V.193, №. 1. – P. 58-69.

309. The role of clonal anergy in the avoidance of autoimmunity: inactivation of autocrine growth without loss of effector function / E.N. Malvey, D.G. Telander, T.L. Vanasek, et al. // *Immunological reviews*. – 1998. – V. 165, №1. – P. 301-318.
310. The roles of exercise in bone remodeling and in prevention and treatment of osteoporosis / Y. Yuan, X. Chen, L. Zhang, et al. // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2016. – V. 122, №2. – P. 122-130.
311. The TNF receptor family member CD27 signals to Jun N- terminal kinase via Traf- 2 / L.A. Gravestien, D. Amsen, M. Boes, et al. // *European journal of immunology*. – 1998. V. 28, №7. – P. 2208-2216.
312. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens / D. M. Underhill, A. Ozinsky, A. M. Hajjar, et al. // *Nature*. – 1999. – V.401, №. 6755. – P. 811-815.
313. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation / R. Wang, C.P. Dillon, L.Z. Shi, et al. // *Immunity*. – 2011. – V. 35, №6. – P. 871-882.
314. Thirty years of experience with alumina-on-alumina bearings in total hip arthroplasty / D. Hannouche, A. Zaoui, F. Zadegan, et al. // *International orthopaedics*. – 2011. – V. 35, №2. – P. 207-213.
315. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – a review / M. Geetha, A.K. Singh, R. Asokamani, et al. // *Progress in materials science*. – 2009. – V. 54, №3. – P. 397-425.
316. TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells / J. Ding, O. Ghali, P. Lencel // *Life Sci*. – 2009. – V. 84, №15-16. – P. 499-504.
317. TNF- $\alpha$  and the IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 (IP-10/CXCL-10) delivered by parvoviral vectors act in synergy to induce antitumor effects in mouse glioblastoma / M. Enderlin, E. V. Kleinmann, S. Struyf, et al. // *Cancer gene therapy*. – 2009. – V.16, №. 2. – P. 149-160.
318. Tough, D.F. Turnover of naive-and memory-phenotype T cells / D.F. Tough, J. Sprent // *Journal of Experimental Medicine*. – 1994. – V. 179, №4. – P. 1127-1135.

319. Transforming growth factor- $\beta$ 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset / M. Veldhoen., C. Uyttenhove, J. Van Snick, et al. // *Nature immunology*. – 2008. – V. 9, №. 12. – P. 1341-1346.
320. Treatment of patients with metastatic cancer using a major histocompatibility complex class II-restricted T-cell receptor targeting the cancer germline antigen MAGE-A3 / Y.C. Lu, L.L. Parker, T. Lu, et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2017. – V. 35, №29. – P. 3322.
321. Trickett, A. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads / A. Trickett, Y.L. Kwan // *Journal of immunological methods*. – 2003. – V. 275, №1-2. – P. 251-255.
322. Tsokos, G. (Ed.). *Systemic Lupus Erythematosus: Basic, Applied and Clinical Aspects* // G. Tsokos / Academic Press. – 2020.
323. Uyttenhove, C. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity / C. Uyttenhove, R.J. Simpson, J. Van Snick // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1988. – V. 85, №18. – P. 6934-6938.
324. Vallet- Regí, M. Bioceramics: from bone regeneration to cancer nanomedicine / M. Vallet- Regí, E. Ruiz- Hernández // *Advanced Materials*. – 2011. – V. 23. №44. – P. 5177-5218.
325. Vallet-Regi, M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues / M. Vallet-Regi, J.M. González-Calbet // *Progress in solid state chemistry*. – 2004. – V. 32, №1-2. – P. 1-31.
326. Vivien, L. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo / L. Vivien, C. Benoist, D. Mathis // *International immunology*. – 2001. – V. 13, №6. – P. 763-768.
327. Wei, G. Nanostructured biomaterials for regeneration / G. Wei, P.X. Ma // *Advanced functional materials*. – 2008. – V. 18, №22. – P. 3568-3582.
328. Williams, D.F. On the mechanisms of biocompatibility // D.F. Williams / *Biomaterials*. – 2008. – V. 29, №20. – P. 2941-2953.
329. Zhou, H. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering / H. Zhou, J. Lee // *Acta biomaterialia*. – 2011. – V. 7, №7. – P. 2769-2781.