

# Клеточно-молекулярные аспекты иммунологической совместимости имплантатов с наноструктурным кальций-фосфатным покрытием

Хлусов И.А.<sup>1</sup>, Сурменова М.А.<sup>1</sup>, Сурменев Р.А.<sup>1</sup>, Рязанцева Н.В.<sup>2</sup>,  
Савельева О.Е.<sup>2</sup>, Иванова А.А.<sup>1</sup>, Прохоренко Т.С.<sup>2</sup>, Таширева Л.А.<sup>2</sup>,  
Дворниченко М.В.<sup>1</sup>, Пичугин В.Ф.<sup>1</sup>

## Cellular and molecular aspects of immunologic compatibility of implants with nanostructured calcium phosphate coating

*Khlyusov I.A., Surmeneva M.A., Surmenev R.A., Ryazantseva N.V., Savelieva O.Ye.,  
Ivanova A.A., Prokhorenko T.S., Tashireva L.A., Dvornichenko M.V., Pichugin V.F.*

<sup>1</sup> НОЦ «Биосовместимые материалы и биоинженерия» при Национальном исследовательском Томском политехническом университете, Сибирском государственном медицинском университете, Институте физики прочности и материаловедения СО РАМН, г. Томск

<sup>2</sup> НОЦ молекулярной медицины, Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Хлусов И.А., Сурменова М.А., Сурменев Р.А. и др.

Изучена реакция клеточной линии Jurkat tat на краткосрочный (24 ч) контакт *in vitro* с модельными композитными имплантатами, предназначенными для биоинженерии костной ткани. Титановые образцы были покрыты тонким наноструктурным кальций-фосфатным (CaP) слоем, сформированным методом высокочастотного магнетронного распыления. С помощью Т-критерия Вилкоксона выявлено увеличение числа Т-лимфобластов лейкозной линии, презентующих CD124-, CD25-, CD4-, CD8-, CD16/56-маркеры созревания и дифференцировки клеток. В случае CD8<sup>+</sup>-клеток различия достигали статистических величин (U-критерий Манна—Уитни) по сравнению с клетками, не контактировавшими с модельными имплантатами. Эффект имплантатов не был опосредован через секрецию цитокинов (IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и TNF $\alpha$ ). Не обнаружен рост числа апоптотических и некротических клеток. Введение кремния в состав CaP покрытий не оказывало существенного модулирующего действия на изученные показатели. Сделан вывод об отсутствии иммуноотоксичности исследованных покрытий в отношении Т-клеточного звена иммунитета. Усиление *in vitro* презентации CD8 Т-лимфобластами человека может быть обусловлено их прямым взаимодействием с искусственными CaP поверхностями.

**Ключевые слова:** клетки Jurkat, CD-маркеры, цитокины, *in vitro*, имплантаты, магнетронное покрытие.

Jurkat tat cell line reaction on short-term (24 h) *in vitro* contact with model composite implants designed for bone tissue bioengineering has been studied. The titanium samples was coated by thin nanostructured calcium phosphate (CaP) layer was formed by rf-magnetron sputtered deposition. An increase in the number of leukemic line T-lymphoblasts presented CD124, CD25, CD4, CD8, CD16/56 markers of cell maturation and differentiation has been revealed with the help of Wilcoxon T-test. In a case of CD8 positive cells the differences reached to statistic levels (Mann—Whitney U-test) as compared with cells had no contact with model implants. No implants effect was mediated by cytokines secretion (IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF $\alpha$ ). An elevation of apoptotic and necrotic cells number has been not revealed. Silicone incorporation into CaP composition had no essential modulating action on indices studied. A conclusion about an absence of immunotoxic effect of investigated coatings as regards to T-cell immunity has been made. *In vitro* acceleration of CD8 presentation by human T-lymphoblasts may be conditioned by their direct interaction with artificial CaP surfaces.

**Key words:** Jurkat cells, CD markers, cytokines, *in vitro*, implants, magnetron coating.

УДК 577.27:57.089.67+546.41'185-022.532

### Введение

По мнению исследователей в области биоинженерии тканей, именно на границе раздела искусственно-

го материала (имплантата) и биологических структур развиваются основные события, связанные с гистогенезом и жизнедеятельностью клеток, на основе обще-

биологических процессов пролиферации, коммитирования, дифференцировки, созревания и гибели [23, 30]. Одним из основных компонентов биосовместимости имплантатов, в том числе изделий для ортопедии и травматологии, является их иммунологическая совместимость [3].

Ответ организма «хозяина» на искусственный материал основан на каскаде событий, характерных для воспаления, развитие которого, в частности, сопровождается активацией и хомингом иммунокомпетентных клеток в зону имплантации, продукцией про- и противовоспалительных медиаторов. Таким образом, исход имплантации (приживание или отторжение имплантата) опосредован через прямое взаимодействие клеток с искусственной поверхностью и секреторную активность резидентных (стромальных и паренхиматозных) и иммунокомпетентных клеток. При негативном развитии событий происходит резорбция костной ткани вокруг имплантата [23], что приводит к его расшатыванию, присоединению инфекционных агентов и неизбежному удалению [33].

Ведущая роль в этих событиях принадлежит иммунокомпетентным клеткам (макрофагам, дендритным клеткам, Т- и В-лимфоцитам), а также различным цитокинам, включая интерлейкины (IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -2, -4, -6, -8, -10, -12, -15) и фактор некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) [23, 28, 29]. При этом Т-лимфоциты являются «дирижерами» интенсивности воспалительных [7] и регенеративных процессов [1]. Концентрацию растворимого рецептора IL-2 [28] рассматривают в качестве индикатора иммунореактивности организма к имплантатам. Цитокины активируют внутриклеточные пути реализации апоптоза [13, 20, 21], способного привести к отторжению имплантируемого изделия.

В последние годы активно разрабатываются имплантаты для биоинженерии костной ткани, несущие биосовместимые покрытия, в том числе сформированные методом высокочастотного магнетронного распыления [37, 38] или микродугового оксидирования [36]. Рассматриваются различные аспекты влияния их физико-химических свойств на процессы остеоинтеграции [16—18]. Однако остаются неосвещенными вопросы потенциальной иммунотоксичности имплантатов. Оценка иммунотоксичности является одним из первых шагов в определении иммунологической совместимости медицинских изделий [6].

Изучение иммунотоксичности включает в том числе структурно-функциональные изменения одного или более компонентов иммунной системы, например маркеров клеточных мембран и цитокинового профиля Т-лимфоцитов [6]. Большинство иммунологических реакций, известных на данный момент, связаны с добавками или материалами, входящими в состав имплантатов. *In vitro* реакция мононуклеарных лейкоцитов, включая цитокиновый профиль, различается в зависимости от состава искусственных материалов [24].

В связи с этим целью исследования являлось изучение реакции Т-клеток линии Jurkat на прямой контакт *in vitro* с модельными композитными имплантатами, предназначенными для биоинженерии костной ткани, несущими тонкие наноструктурные кальций-фосфатные покрытия, сформированные методом высокочастотного магнетронного распыления на титановой подложке.

## Материал и методы

В качестве источника модельного минерального матрикса кости применяли пластины из титана ВТ1.0 (10 × 10 мм, толщина 1 мм), несущие двусторонние гладкие (показатель шероховатости Ra менее 1 мкм) тонкие (толщина менее 1 мкм) кальций-фосфатные CaP покрытия.

Покрытия формировали посредством высокочастотного (вч) магнетронного распыления CaP [34, 35] или кремнийсодержащего CaP электрода-мишени [11]. Мишень для магнетронного распыления (диаметр 220 мм, толщина 10 мм) была приготовлена по керамической технологии: прессование нанопорошка при давлении 70 МПа, затем отжиг полученной пресс-формы при температуре 1 100 °С в течение 1 ч на воздухе. Нанопорошок гидроксилатапата Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> (диаметр частиц 10—40 нм) и порошок кремнийзамещенного гидроксилатапата (Si-ГАП) с содержанием кремния 1,4 весового процента (0,5 моль кремния, формула Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>5,5</sub>(Si)<sub>0,5</sub>(OH)<sub>1,5</sub>) для изготовления электрода-мишени получали механохимическим способом, как описано ранее [19]. В отличие от исходного порошка материал мишени представлял собой двухфазную CaP керамику на основе стабилизированного кремнием кристаллического ГАП и трикальцийфосфата.

Исследования морфологии и элементного состава полученных покрытий проводились с использованием сканирующего электронного микроскопа (СЭМ)

Quanta 200 ESEM FEG фирмы FEI со встроенной приставкой энергодисперсионного рентгеновского анализа (EDX). Согласно EDX-спектрам покрытия состоят из кальция, фосфора и кислорода. В состав магнетронных покрытий, полученных при распылении электрода-мишени из Si-ГАП, входит кремний.

Анализ молекулярных связей в покрытиях осуществлялся с использованием метода Фурье инфракрасной (ИК) спектроскопии. Спектры оптического поглощения получены на приборе Bruker Vertex 70 в диапазоне 400—4 000 см<sup>-1</sup>. На ИК-спектрах покрытий, напыленных вч-магнетронным распылением, присутствуют полосы поглощения, обусловленные колебаниями связей Р—О фосфатного тетраэдра в структуре апатита, в области деформационных колебаний — при частотах 473 и 560 см<sup>-1</sup>, и валентных колебаний этих связей при 950 и 1 024 см<sup>-1</sup>. Кроме того, имеются также полосы поглощения, характерные для колебания связей С—О. Полоса при 510 см<sup>-1</sup> на спектре поглощения покрытий с замещением  $x = 0,5$  отвечает деформационным колебаниям связей Si—О.

Согласно картам распределения элементов (mapping) покрытие однородно, морфология поверхности определяется рельефом подложки.

Для оценки клеточно-молекулярных реакций на модельные имплантаты применяли культуру клеток человека линии Jurkat tat (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург), стандартизованную до  $2,0 \cdot 10^6$  жизнеспособных мононуклеаров на 1 мл питательной среды. Жизнеспособность клеток в тесте с 0,4%-м трипановым синим составила 90%.

Клетки ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», г. Новосибирск), 10% инактивированной (56 °С в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров («Биолот», г. Санкт-Петербург) и 0,3 мг/мл L-глутамина («Биолот», г. Санкт-Петербург). В среду помещали пластины с кальций-фосфатными покрытиями, культивировали во флаконах в течение 24 ч при температуре 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>.

После инкубации клеточную взвесь центрифугировали при 500g в течение 15 мин. Затем клетки использовали для оценки показателей апоптоза, некроза и презентации мембранных антигенов. Надосадочную жидкость использовали для определения концентрации цитокинов.

Исследуемые клетки в количестве  $1 \cdot 10^6$  переносили в объеме 1 мл в пробирки для проточного цитофлуориметра, отмывали 1 мл охлажденного фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (рН 7,2), ресуспендировали на вортексе, затем центрифугировали в течение 3 мин. Далее осадок ресуспендировали в аннексиновом буфере, содержащем меченный флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) аннексин V и пропидий йодид, инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре.

Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США) с аргоновым лазером на основе определения четырех параметров: малого углового светорассеяния (FSC), характеризующего размер клетки, бокового светорассеяния (SSC), характеризующего цитоплазматические и мембранные особенности клетки, а также зеленой (FITC — E<sub>emis</sub> = 530 нм) и оранжевой (пропидий йодид — E<sub>emis</sub> = 590 нм) флуоресценции.

Проводился гейтинг исследуемой популяции клеток в координатах FSC (ось абсцисс) и SSC (ось ординат). Апоптотические клетки идентифицировали по окрашиванию аннексином V, но не пропидий йодидом, некротизированные лимфоциты воспринимали оба красителя. Использовали автоматическое программное обеспечение и методы сбора и анализа данных с высоким разрешением (1 024 канала).

Регистрацию количества клеток, несущих на своей поверхности CD124, CD25, CD4, CD8, CD16/56, проводили методом, основанным на взаимодействии соответствующих моноклональных антител (МКАТ) в соответствии с инструкцией производителя МКАТ.

После культивирования клетки в количестве  $1 \cdot 10^6$  отмывали фосфатным буфером (рН 7,2) и окрашивали стандартными моноклональными антителами к маркерам клеточной дифференцировки (CD124, CD25, CD4, CD8, CD16/56), меченными фикоэритрином (PE) (R&D, США) в объеме 10 мкл.

После 30 мин инкубации клетки подвергали анализу на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США). Оценивали параметры оранжевой (PE — E<sub>emis</sub> = 585 нм) флуоресценции в гейте изучаемых клеток, определяли количество клеток, презентующих изучаемые антигенные детерминанты.

Для определения концентрации ИЛ-1β, -2, -4, -6, -8, -10 и TNF-α в супернатантах (надосадочной жидкости) клеток использовался твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» анализ (ИФА). Процедура

ру выполнения ИФА проводили по инструкции, предлагаемой производителем тест-систем («Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург). Измерение оптической плотности проводили с помощью планшетного фотометра Multiscan EX (ThermoLabSystems, Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрацию (пг/мл) цитокинов вычисляли по калибровочным кривым.

При оценке полученных данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез, использующиеся в стандартных пакетах программ Statistica 6.0. Результаты выражали в виде медианы *Me*, 25%-го ( $Q_1$ ) и 75%-го ( $Q_3$ ) квартилей. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали непараметрические *U*-критерий Манна—Уитни ( $p_U$ ) и *T*-критерий Вилкоксона ( $p_T$ ). Различия считались статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Для экспериментов *in vitro* выбрали хорошо известную линию Т-лимфобластов человека Jurkat, выделенных из крови больного лейкозом мальчика, на поверхности которых обнаруживается трансмембранный рецептор сигнала клеточной смерти CD95 (Fas/APO-1). Рецепторы смерти других типов (APO-2

для лиганда TRAIL и TNFR-1 для цитокина TNF- $\alpha$ ) также активируют программу гибели клеток Jurkat в основном по механизму апоптоза [4]. Клетки экспрессируют Т-хелперный фенотип (CD4<sup>+</sup>) [39], продуцируют TNF- $\alpha$ , IL-2 [31] и IL-4 [22].

Результаты показали, что использованная линия Jurkat экспрессирует в большей степени CD4-маркер, рецепторы к IL-2 и IL-4 (табл. 1) с преимущественной секрецией IL-2 и IL-10 (табл. 2), что соответствует профилю Т-клеток [2]. По-видимому, IL-2-зависимые механизмы (сам цитокин и рецептор к нему на клетках) лежат в основе аутокринной регуляции линии Jurkat, приводящей, как известно, к усилению автономности опухолевых клонов, их пролиферативной активности и выживаемости [8, 10]. В меньшей степени отмечалась секреция провоспалительных цитокинов IL-1b, IL-6 и TNF- $\alpha$  (табл. 2).

Известно, что медицинские изделия способны запускать реакцию гиперчувствительности IV типа [23], связанную с бласттрансформацией сенсibilизированных Т-лимфоцитов с хелперным фенотипом и часто приводящую к продуктивному воспалению в тканях-мишенях с исходом в склероз. В связи с этим ГОСТ Р ИСО 10993-20-2009 [6] рекомендует изучение иммунотоксичности имплантатов как один из важных

Таблица 1

Молекулярные маркеры мембран и показатели клеточной смерти Т-клеток человека линии Jurkat после 24 ч культивирования с модельными имплантатами, несущими разновидности вч-магнетронного кальций-фосфатного покрытия на титановой подложке (*Me* ( $Q_1$ — $Q_3$ ))

Имплантат	Число погибших клеток, %		Количество клеток, несущих мембранные маркеры, %				
	Апоптоз	Некроз	CD124 (IL4-R)	CD25 (IL2-R)	CD4	CD8	CD16/56
Пластиковая поверхность культурального планшета (контроль) ( $n = 3$ )	2,8 (2,0—3,4)	0,52 (0,40—0,70)	3,76 (3,2—4,3)	6,19 (5,0—7,4)	3,36 (3,1—3,6)	1,54 (1,5—1,6)	1,22 (1,0—1,4)
Кальций-фосфатное вч-магнетронное покрытие ( $n = 5$ )	2,7 (1,5—2,9)	1,45 (1,2—1,7)	8,0 (7,0—11,7)	6,2 (6,1—12,5)	4,3 (2,6—5,3)	4,8 (4,6—10,2)* $p_U < 0,04$	2,2 (1,5—4,4)
Кальций-фосфатное кремнийсодержащее вч-магнетронное покрытие ( $n = 6$ )	2,25 (1,7—5,1)	0,95 (0,5—1,2)	8,1 (7,9—17,5) $p_U < 0,05$	6,95 (6,9—12,0)	5,7 (3,2—30,6)	9,1 (8,0—13,8) $p_U < 0,01$	5,55 (4,2—12,1)

Примечание. Здесь и в табл. 2 указаны статистически значимые различия с контролем:  $p_U$  — согласно *U*-критерию Манна—Уитни;  $p_T$  — согласно *T*-критерию Вилкоксона;  $n$  — число наблюдений.

Таблица 2

Концентрация цитокинов в супернатантах клеточных культур линии Jurkat после 24 ч культивирования с модельными имплантатами, несущими разновидности вч-магнетронного кальций-фосфатного покрытия на титановой подложке, пг/мл (*Me* ( $Q_1$ — $Q_3$ ))

Имплантат	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	TNF- $\alpha$
Пластиковая поверхность культурально-	4,16	11,11	1,69	7,05	2,34	12,95	4,31

го планшета (контроль) ( $n = 3$ )	(3,90—4,38)	(11,06—11,13)	(1,49—1,92)	(6,86—7,54)	(2,26—2,52)	(12,45—13,41)	(4,08—4,58)
Кальций-фосфатное вч-магнетронное покрытие ( $n = 6$ )	4,09 (4,02—4,47)	9,76 (9,72—9,78)	1,73 (1,51—1,76)	7,1 (6,75—7,76)	2,65 (2,61—2,74)* $p_U < 0,03$	13,86 (12,35—17,35)	4,5 (4,01—4,66)
Кальций-фосфатное кремнийсодержащее вч-магнетронное покрытие ( $n = 9$ )	4,08 (3,9—4,61)	10,62 (9,72—11,09)	1,96 (1,64—2,22)	6,89 (6,85—7,29)	2,79 (2,65—2,94)* $p_U < 0,02$	16,01 (13,93—17,18)	4,53 (4,44—4,71)

этапов изучения их биосовместимости и специфической активности. Линия Т-лимфобластов Jurkat интересна в плане исследования токсичности модельных имплантатов на границе кроветворной и иммунной систем, во многом определяющей реакцию системы крови на искусственный материал.

В настоящее время активно изучаются тонкие (толщина менее 1 мкм) наноструктурные покрытия, полученные методом вч-магнетронного напыления. Они рассматриваются как один из перспективных (по сочетанию биомеханических и биомедицинских параметров) ионоплазменных способов модификации поверхностных свойств биомедицинских изделий [37], в том числе для биоинженерии костной ткани [15, 16, 18].

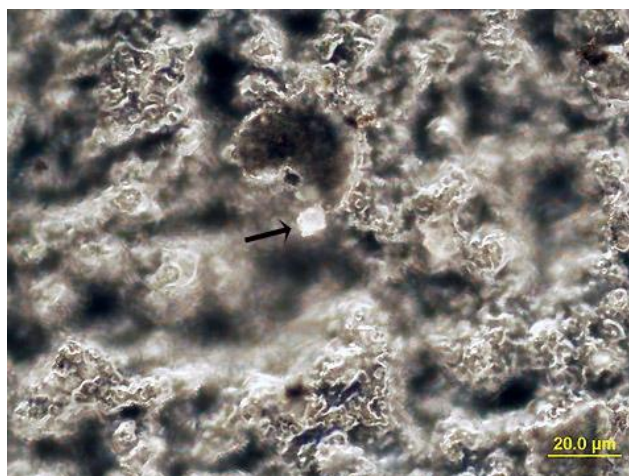
С помощью тонких лабораторных методик удалось установить, что тонкий CaP слой на титане не изменяет показатели клеточной смерти путем апоптоза или некроза (табл. 1) в выбранной клеточной системе *in vitro*. Отсутствие цитотоксичности у подобных покрытий выявлено ранее [15] в тесте с 0,4%-м трипановым синим (методикой, рекомендованной международным стандартом ISO 10993-5). Полученные данные свидетельствуют о хорошей воспроизводимости технологии нанесения вч-магнетронных покрытий с точки зрения их биосовместимости *in vitro*.

В то же время с помощью Т-критерия Вилкоксона удалось установить, что при контакте с CaP поверхностью в популяции лейкозных лимфобластов несколько повышалось ( $p_T < 0,04$ ) в сравнении с контрольной культурой Jurkat содержание клеток, презентующих изученные мембранные CD-антигены. Экспрессия антигенных детерминант является показателем созревания и (или) дифференцировки гемопоэтических клеток [9].

Полученный факт может свидетельствовать если не в пользу дифференцировки, то мягкого усиления иммунофенотипического созревания лейкозных Т-лимфобластов при кратковременном контакте с вч-магнетронными CaP покрытиями. При этом трехкратные различия в числе клеток, презентующих CD8-маркер, достигали статистически значимых величин по U-критерию Манна—Уитни (см. табл. 1) и сопровожда-

лись двукратным снижением ( $p_U < 0,01$ ) исходного соотношения CD4 и CD8 (хелперного и супрессорного фенотипа) Т-лимфобластов линии Jurkat.

Известно прямое и опосредованное (через продукты биodeградации) влияние имплантатов на биологические системы [3, 23]. В представленных экспериментах нельзя исключить модулирующее действие вч-магнетронных CaP покрытий через прямой контакт с клетками Jurkat (рисунок). Например, ранее на подобных покрытиях обнаружено остеогенное созревание стромальных стволовых клеток человека [18].



Клетка линии Jurkat на образце с вч-магнетронным кальций-фосфатным покрытием. Оптическая микроскопия в отраженном свете,

темное поле, ув. 1 000. Стрелкой указано расположение клетки

В зависимости от физико-химических свойств (степень кристалличности и пористости, растворимость, шероховатость поверхности, элементный и фазовый состав и т.д.) [16, 26] образцы CaP материалов в разной степени способствуют биоинженерии костной ткани. Растворение искусственного CaP матрикса является важным компонентом усиления его остеогенных свойств [25]. В то же время, согласно ГОСТ Р ИСО 10993-18-2009 [5], при деградации медицинских изделий выделяются химически активные составные части, которые могут обладать побочным токсическим эффектом.

В связи с этим в состав покрытия ввели кремний, который, как известно, является естественным компонентом межклеточной жидкости [32], обладает не только биологической активностью, но и, в зависимости от концентрации, токсическим потенциалом [12], в значительной мере увеличивает растворимость вч-магнетронных CaP покрытий [11, 14, 27].

Вч-магнетронные CaP покрытия, содержащие кремний, в целом обладали эффектом на клетки Jurkat, схожим с поверхностями без добавления микроэлемента (см. табл. 1). Также повышалось ( $p_T < 0,04$ ) количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих изученные мембранные антигены, прежде всего CD8-маркер (в 6 раз,  $p_U < 0,01$ ). Однако уменьшение соотношения CD4/CD8 (медиана 0,55) не достигало статистических различий с исходным показателем (медиана 2,16) в контрольной культуре клеток Jurkat.

В линии Jurkat в присутствии имплантатов с кремнийсодержащим поверхностным слоем выявлен также статистически значимый рост (на 115%,  $p_U < 0,01$ ) числа клеток с мембранной экспрессией макромолекул CD124, являющихся рецептором для IL-4. В связи с этим следовало ожидать усиления секреторной активности Т-лимфоцитов, контактирующих с вч-магнетронным CaP покрытием.

При активации Т-клеток выделяется серия цитокинов, служащих химическими индикаторами мобилизации и медиации воспалительных и иммунных процессов. Они представляют собой активирующие и ингибиторные сигналы, регулирующие другие клетки иммунной и кровяной систем, соединительной ткани и ее производных. Таким образом, иммунный ответ служит инициатором воспаления, свертывания, фибринолиза [6], трансплантационного (противоопухолевого) иммунитета [2], репарации (лизиса) костной ткани [23].

Тем не менее в исследованиях вч-магнетронные CaP покрытия (с кремнием и без него) не оказывали заметного стимулирующего эффекта на секреторную способность культуры клеток линии Jurkat (табл. 2). Можно выделить только статистически значимое увеличение концентрации IL-8 (на 13—19%) для обоих типов искусственной поверхности и падение уровня IL-2 (на 12%) в случае «чистого» CaP покрытия. При воздействии различных раздражителей концентрации цитокинов в биологических средах могут повышаться в десятки раз [2]. В связи с этим выявленные измене-

ния нельзя считать выраженным отклонением от базального уровня секреции. Кроме того, испытанные покрытия не обладают, по-видимому, пирогенным эффектом, поскольку не меняют секрецию цитокинов IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$  (см. табл. 2), инициирующих процессы лихорадки [2].

## Заключение

Слабое влияние на секреторную способность Т-лимфоцитов линии Jurkat позволяет пренебрегать опосредованным (через деградацию покрытия и высвобождение цитокинов) иммуномодулирующим эффектом при краткосрочном культивировании клеток с модельными композитными имплантатами, несущими тонкие наноструктурные CaP покрытия, сформированные методом вч-магнетронного распыления на титановой подложке. Цитокины являются наиболее изученной группой биологически активных веществ, (эпигенетическое влияние которых на процессы и механизмы гибели, дифференцировки и созревания здоровых и лейкозных клеток считается доказанным и применяется в различных протоколах иммунобиотерапии [2, 9]. В данном сегменте иммунотоксических реакций вч-магнетронные CaP покрытия являются практически биоинертными.

В то же время усиление презентации CD8 на лейкозных Т-лимфоцитах может быть обусловлено их прямым взаимодействием с искусственными поверхностями, способными, как установлено ранее [18], оказывать морфофункциональный эффект на стволовые клетки.

Изучение *in vitro* иммунологического ответа на имплантируемые материалы позволяет не только совершенствовать медицинские изделия и оперативную технику, но и прогнозировать индивидуальный ответ на введение того или иного материала, в том числе при инженерии костной ткани у онкологических больных.

*Исследование выполнено при поддержке федеральных целевых программ «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2013 годы» (государственный контракт № 16.512.11.2087), «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (государственные контракты П861 от 25.05.2010; 16.740.11.0205 от 24.09.2010), грантов президента РФ для поддержки*

молодых российских ученых — кандидатов наук (МК-1149.2012.8), Национального исследовательского Томского политехнического университета (проект № 11-03/2012).

### Литература

1. Бабаева А.Г. Лимфоциты как регуляторы пролиферации и дифференцировки клеток нелимфоидных органов // Вестник АМН СССР. 1990. № 2. С. 43—45.
2. Биологические методы лечения онкологических заболеваний: пер. с англ. / под ред. В.Т. де Вита, С. Хеллмана, С.А. Розенберга. М.: Медицина, 2002. 936 с.
3. Биосовместимые материалы / под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: Изд-во «Медицинское информационное агентство», 2011. 544 с.
4. Блохин Д.Ю. Как убить бессмертную клетку // Химия и жизнь. 2009. № 3. С. 20—26.
5. ГОСТ Р ИСО 10993-18-2009. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 18. Исследование химических свойств материалов. Введ. 2010-09-01. М.: Стандартиформ, 2010. 26 с.
6. ГОСТ Р ИСО 10993-20-2009. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 20. Принципы и методы исследования иммуотоксичности медицинских изделий. Введ. 2010-09-01. М.: Стандартиформ, 2010. 28 с.
7. Дыгай А.М., Клименко Н.А. Воспаление и гемопоэз. Томск: Изд-во ТГУ, 1992. 276 с.
8. Иващенко Ю.Д., Быкорез А.И. Полипептидные факторы роста и канцерогенез. Киев, 1990. 192 с.
9. Клиническая онкогематология: руководство для врачей / под ред. М.А. Волковой. М.: Медицина, 2001. 576 с.
10. Окулов В.Б., Зубова С.Г. Адаптивные реакции клетки как основа прогрессии опухолей // Вопросы онкологии. 2000. Т. 46, № 5. С. 505—511.
11. Пичугин В.Ф., Сурменова М.А., Сурменев Р.А. и др. Исследование физико-химических и биологических свойств кальций-фосфатных покрытий, созданных методом вч-магнетронного распыления кремнийзамещенного гидроксипатита // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2011. № 9. С. 54—61.
12. Ребров В.Г., Громова О.А. Витамины, макро- и микроэлементы. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 960 с.
13. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Жукова О.Б. и др. Роль NF-κB, p53 и p21 в регуляции ФНО-α опосредованного апоптоза лимфоцитов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2010. Т. 148, № 2. С. 56—60.
14. Сурменова М.А., Сурменев Р.А., Пичугин В.Ф. и др. *In vitro* исследование магнетронных покрытий на основе кремнийзамещенного гидроксипатита // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2011. № 12. С. 81—88.
15. Сурменова М.А., Сурменев Р.А., Хлусов И.А. и др. Кальцийфосфатные покрытия, созданные методом вч-магнетронного распыления гидроксипатита: остеогенный потенциал *in vitro* и *in vivo* // Известия Том. политехн. ун-та. 2010. Т. 317, № 2. С. 101—106.
16. Хлусов И.А., Карлов А.В., Шаркеев Ю.П. и др. Остеогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток костного мозга *in situ*: роль физико-химических свойств искусственных поверхностей // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2005. № 3. С. 164—173.
17. Хлусов И.А., Пичугин В.Ф., Гостищев Э.А. и др. Влияние физических, химических и биологических манипуляций на поверхностный потенциал кальций-фосфатных покрытий на металлических подложках // Бюл. сиб. медицины. 2011. Т. 10, № 3. С. 72—81.
18. Хлусов И.А., Шевцова Н.М., Хлусова М.Ю. и др. Концепция «ниша-рельеф» для стволовых клеток как основа биомиметического подхода к инженерии костной и кровеносной тканей // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. VI, № 2. С. 55—64.
19. Чайкина М.В., Хлусов И.А., Карлов А.В., Пайчадзе К.С. Механохимический синтез нестехиометрических и замещенных апатитов с наноразмерными частицами для использования в качестве биосовместимых материалов // Химия в интересах устойчивого развития. 2004. Т. 12. С. 389—399.
20. Часовских Н.Ю., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Апоптоз и окислительный стресс. Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2009. 140 с.
21. Чечина О.Е., Биктасова А.К., Сазонова Е.В. и др. Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза // Бюл. сиб. медицины. 2009. № 2. С. 67—71.
22. Aherne S.A., O'Brien N.M. Modulation of cytokine production by plant sterols in stimulated human Jurkat T cells // Mol. Nutr. Food Res. 2008. V. 52 (6). P. 664—673.
23. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 2<sup>nd</sup> edition / ed. by B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. 851 p.
24. Blaine T.A., Rosier R.N., Puzas J. E. et al. Increased levels of tumor necrosis factor-α and Interleukin-6 protein and messenger RNA in human peripheral blood monocytes due to titanium particles // The journal of bone and Joint Surgery (American). 1996. V. 78. P. 1181—1192.
25. Damien C.J., Ricci J.L., Christel P. et al. Formation of a calcium phosphate-rich layer on absorbable calcium carbonate bone graft substitutes // Calcif Tissue Int. 1994. V. 55. P. 151—158.
26. De Bruijn J.D. Calcium phosphate biomaterials: Bonding and biodegradation properties. Leiden, 1993. 172 p.
27. Gibson I.R., Best S.M., Bonfield W. Chemical Characterization of Silicon-Substituted Hydroxyapatite // J. Bio. Mater. Res. Symp. 1999. V. 44. P. 422—428.
28. Granchi D., Verri E., Ciapetti G. et al. Bone-resorbing cytokines in serum of patients with aseptic loosening of hip prostheses // The Journal of Bone and Joint Surgery. (British). 1998. V. 80. P. 912—917.
29. Haynes D.R., Rogers S.D., Hay S. et al. The differences in toxicity and release of bone resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium alloy wear particles // The Journal of Bone and Joint Surgery (American). 1993. V. 75. P. 825—834.
30. Khlusov I.A., Zagrebina L.V., Shestov S.S., Naumov S.A. Physical-Chemical Manipulations with Microbial and Mammalian Cells: from Experiments to Clinics // Stem Cell Applications in Disease and Health / Editors W.B. Burnside et al. N. Y.: Nova Science Publishers, 2008. P. 29—71.

31. *Lahat A., Ben-Horin S., Lang A. et al.* Lidocaine down-regulates nuclear factor-kappaB signalling and inhibits cytokine production and T cell proliferation // *Clin. Exp. Immunol.* 2008. V. 152 (2). P. 320—327.
32. *Morks M.F.* Fabrication and characterization of plasma-sprayed HA/SiO<sub>2</sub> coatings for biomedical application // *J. Mech. Beh. Bio. Mater.* 2008. S1. 105 — 111.
33. *Nepola J.V.* External fixation // *Rockwood and Green's fractures in Adults. Four Edition.* Philadelphia: Lippincot-Raven Publishers, 1996. V. 1. P. 229—304.
34. *Pichugin V.F., Eshenko E.V., Surmenev R.A. et al.* Application of High-Frequency Magnetron Sputtering to Deposit Thin Calcium-Phosphate Biocompatible Coatings on a Titanium Surface // *Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques.* 2007. V. 1, № 6. P. 679—682.
35. *Pichugin V.F., Surmenev R.A., Shesterikov E.V. et al.* The preparation of calcium phosphate coatings on titanium and nickel-titanium by rf-magnetron sputtered deposition: composition, structure and micromechanical properties // *Surface & Coatings Technology.* 2008. V. 202. P. 3913—3920.
36. *Sharkeev Yu.P., Legostaeva E.V., Eroshenko A.Yu. et al.* The structure and physical and mechanical properties of a novel biocomposite material, nanostructured titanium-calcium-phosphate coating // *Composite Interfaces.* 2009. V. 16. P. 535—546.
37. *Surmenev R.A.* A review of plasma-assisted methods for calcium phosphate-based coatings fabrication // *Surface & Coatings Technology.* 2012. V. 206. I. 8—9. P. 2035—2056.
38. *Surmenev R.A., Surmeneva M.A., Evdokimov K.E. et al.* The influence of the deposition parameters on the properties of an rf-magnetron-deposited nanostructured calcium phosphate coating and a possible growth mechanism // *Surface and Coatings Technology.* 2011. V. 205. P. 3600—3606.
39. *Tepperman K., Roy P.W., Moloney B.F., Elder R.C.* Dicyanogold effects on lymphokine production // *Met. Based Drugs.* 1999. V. 6 (4—5). P. 301—309.

Поступила в редакцию 12.04.2012 г.

Утверждена к печати 30.05.2012 г.

#### Сведения об авторах

**И.А. Хлусов** — д-р мед. наук, профессор, научный руководитель НОЦ «Биосовместимые материалы и биоинженерия», профессор кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ (г. Томск).

**М.А. Сурменева** — инженер кафедры теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ (г. Томск).

**Р.А. Сурменев** — канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ (г. Томск).

**Н.В. Рязанцева** — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

**О.Е. Савельева** — канд. мед. наук, руководитель НОЦ молекулярной медицины СибГМУ (г. Томск).

**А.А. Иванова** — магистрант, инженер-исследователь кафедры теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ (г. Томск).

**Т.С. Прохоренко** — аспирант кафедры патофизиологии, ассистент кафедры фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

**Л.А. Таширева** — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**М.В. Дворниченко** — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**В.Ф. Пичугин** — д-р физ.-мат. наук, профессор, руководитель НОЦ «Биосовместимые материалы и биоинженерия», зав. кафедрой теоретической и экспериментальной физики НИ ТПУ (г. Томск).

#### Для корреспонденции

**Хлусов Игорь Альбертович**, тел./факс 8 (382-2) 42-64-43; e-mail: khlusov63@mail.ru