

## МИКРОДУГОВЫЕ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫЕ ПОКРЫТИЯ НА ТИТАНЕ ТОРМОЗЯТ РОСТ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК IN VITRO

И.А. Хлусов<sup>1,2</sup>, Ю.П. Шаркеев<sup>2,3</sup>, Г.Б. Слепченко<sup>2</sup>, Е.Г. Черемпей<sup>2</sup>, Л.С. Литвинова<sup>4</sup>,  
Е.Г. Комарова<sup>3</sup>, М.Б. Седельникова<sup>3</sup>, В.В. Шуплецова<sup>4</sup>, Н.А. Дунец<sup>4</sup>,  
О.Г. Хазиахматова<sup>4</sup>, К.А. Юрова<sup>4</sup>, М.Ю. Хлусова<sup>1</sup>, М.В. Чайкина<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

E-mail: khlusov63@mail.ru

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск

<sup>3</sup> Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск

<sup>4</sup> Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград

<sup>5</sup> Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, г. Новосибирск

### Введение

Кальцийфосфатная (КФ) керамика, включая гидроксиапатит и бета-трикальцийфосфат (ТКФ), активно применяется как в ортопедии и травматологии, челюстно-лицевой хирургии и дентальной имплантологии, так и для поиска новых способов торможения опухолевого роста. Например, через стимуляцию клеточного иммунитета, ТКФ оказывает противоопухолевое действие при перевиваемых опухолях у бестимусных мышей [1]. Широкий спектр ионов металлов, в том числе, бактерицидных, способен индуцировать клеточную смерть различных опухолевых клеток, включая Jurkat линию лейкозных Т-лимфобластоподобных клеток человека (далее Jurkat Т-клетки) [2].

Целью настоящей работы было изучение in vitro поведения Т-клеток линии Jurkat при краткосрочном контакте с рельефным КФ покрытием, в том числе, несущим в своем составе ионы меди или цинка, обладающие антимикробным эффектом.

### Материалы и методы эксперимента

В эксперименте in vitro применяли образцы размером 10×10×1 мм<sup>3</sup>, несущие двустороннее покрытие из фосфатов кальция. Покрытие формировали на подложке из коммерчески чистого титана (весовых %: 99,58 Ti; 0,12 O; 0,18 Fe; 0,07 C; 0,04 N; 0,01 H) методом микродугового оксидирования на установке Microarc-3.0 (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск) в анодном режиме. Электролит состоял из водного раствора ортофосфорной кислоты (20 мас. %), карбоната кальция (9 мас. %) и синтетического гидроксиапатита (6 мас. %). Порошок синтетического гидроксиапатита с диаметром частиц 40–100 нм, в том числе, с замещением кальция на медь или цинк (Ca<sub>10-x</sub>Zn<sub>x</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> или Ca<sub>10-x</sub>Cu<sub>x</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>, x = 0,1), получен механохимическим способом, как описано ранее [3].

Исследование морфологии и элементного состава поверхности образцов осуществляли на сканирующем электронном микроскопе Quanta 200 ESEM FEG с EDX-анализатором (FEI, Нидерланды). Элементный состав КФ покрытий на титане варьировал в следующих значениях: Ca (6,6–11,4 атомных %), P (17,4–21,1 атомных %), O (52,0–62,2 атомных %), Ti (12,3–17,8 атомных %), Zn (0,18–0,36 атомных %), Cu (0,06–0,16 атомных %).

Шероховатость КФ покрытий определяли с помощью профилометра Talysurf 5-120 (Taylor Hobson Ltd., Великобритания) согласно ГОСТ 2789–73 (ISO 4287-1997) по индексу шероховатости Ra. Применяли образцы с Ra = 2,5–3,3 мкм, что соответствует биологически активному диапазону рельефа КФ покрытий для морфофункциональной

реакции клеток периферической крови [4]. Средняя толщина КФ покрытий, измеренная согласно ГОСТ 9.302–88 ЕСЗКС с помощью микрометра МК-25 (Россия), варьировала в диапазоне 30–51 мкм. Масса КФ покрытий на образцах составила 12–16 мг.

Изучение биодеградации образцов с КФ покрытием проводили в синтетической культуральной среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США) с низким содержанием микроэлементов в течение 7 дней при температуре 37 °С (2 мл среды на каждый образец согласно рекомендациям ISO 10993-5), как описано ранее [5]. Концентрации ионов Zn или Cu в растворе определяли с помощью инверсионной вольтамперометрии согласно [6].

Для *in vitro* исследования использовали иммортализованные Jurkat Т-клетки (Российская коллекция клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург) в конечной концентрации  $1 \times 10^6$  жизнеспособных клеток на 1 мл питательной среды.

Jurkat Т-клетки ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из 90 % RPMI-1640 (Sigma, США), 10 % инактивированной (56 °С в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров (Sigma, США) и 0,3 мг/мл L-глутамин (Sigma, США). В каждую из трех лунок 24-луночного планшета (Orange Scientific, Бельгия; площадь лунки 1,86 см<sup>2</sup>) помещали по 1 образцу исследуемых групп с КФ-покрытием, культивировали в течение 24 часов при температуре 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Контролем служила клеточная взвесь без тестируемых образцов (6 лунок).

После культивирования клеточную взвесь центрифугировали при 500 g в течение 15 мин. Процентное соотношение живых и погибших (апоптотических и некротических) форм клеток, общее количество клеток в пробе определяли методом проточной цитофлуориметрии на аппарате Guava EasyCytePlus («Millipore», США) с использованием реагента и программы Guava Via Count («Millipore», США). Концентрацию цитокина IL-8 в супернатанте (межклеточной жидкости) определяли согласно методологии, описанной ранее [7].

Результаты обрабатывали с применением программы «STATISTICA for Windows 10.0». Рассчитывали параметры распределений: медиану (Me), 25 % квартиль (Q<sub>1</sub>) и 75 % квартиль (Q<sub>3</sub>). Для оценки статистической значимости различий применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В наших исследованиях не применялись митогены, факторы роста и химические активаторы, 100–1000-кратно увеличивающие концентрацию цитокинов в супернатантах клеточных культур [8] и способствующие адаптации (выживанию) клеточной культуры *in vitro*, трудно достижимой в естественных условиях. В связи с этим, согласно табл. 1, часть Jurkat Т-клеток в 24-часовой культуре погибала путем апоптоза (медиана 5,2 %) или некроза (медиана 8,2 %).

Абсолютное количество жизнеспособных Jurkat Т-клеток, контактировавших с КФ покрытиями, снижалось в сравнении с контролем роста клеточной культуры на пластике. В случае «чистого» или Zn-содержащего КФ покрытия различия достигали статистических величин (табл. 1). Уменьшение выживаемости клеточной культуры было обусловлено экспоненциальным приростом ( $y = 4,72e^{0,5x}$ ;  $R^2 = 0,99$ ) доли некротических форм клеток в связи с повышением концентрации интерлейкина-8 (IL-8) в межклеточной жидкости. Некоторые авторы рассматривают IL-8 как апоптоз-индуцирующий фактор для Jurkat Т-клеток и других лейкоцитарных линий (K562, HL-60, KG-1, U937, THP-1) [8].

С другой стороны, описана прямая индукция процессов гибели Jurkat T-клеток ионами Cu [2] или Zn [9]. В недельных экстрактах тестируемых покрытий мы наблюдали 7-кратное увеличение (в сравнении с растворителем, до 36 мкг/кг навески; 0,57  $\mu$ M) выхода ионов Cu, но не Zn. Однако, даже такая концентрация почти в 100 раз ниже описанной в литературе для цитотоксичности металлов (0,05–5 мМ) в отношении Jurkat T-клеток [2].

### Выводы

Керамоподобные микрорельефные КФ покрытия слабо растворялись в модельной биологической жидкости, что обуславливало малый выход в раствор ионов меди и, в большей степени, цинка.

При 24-часовом *in vitro* контакте с тестируемыми КФ покрытиями вклад ионов металлов, выходящих в раствор, в процессы клеточной смерти Jurkat T-клеток можно считать незначительным. Тем не менее, малые концентрации жизненно важных микро-элементов в КФ покрытиях способны вносить существенный дисбаланс в секреторные процессы, приводящие к снижению выживаемости культуры опухолевых клеток *in vitro*.

Таблица 1. Характерные изменения показателей клеточной смерти, молекулярных маркеров мембран и концентрации цитокинов в культуре Jurkat T-клеток после 24-часового культивирования с образцами, несущими разновидности микродугового покрытия на титановой подложке, Me(Q1-Q3)

Число жизнеспособных клеток, 10 <sup>6</sup> /мл	Апоптоз, %	Некроз, %
n = 6–9		
1) Пластиковая поверхность культурального планшета (контроль)		
0,95 (0,93–1,13)	5,2 (5,2–8,9)	8,2 (8,1–14,2)
2) Кальцийфосфатное покрытие		
0,86* (0,82–0,91) P1 < 0,04	5,5 (5,0–6,7)	12,0 (7,6–20,4)
3) Кальцийфосфатное покрытие с добавкой меди		
0,83 (0,69–1,09)	6,1 (5,5–7,0)	21,2* (15,4–30,9) P1 < 0,02 P2 < 0,01
4) Кальцийфосфатное покрытие с добавкой цинка		
0,85* (0,62–0,87) P1 < 0,04	4,1* (3,3–4,7) P1 < 0,01 P3 < 0,001	36,3* (16,2–38,6) P1 < 0,01 P2 < 0,001

Примечание: n – число образцов (наблюдений) в каждой группе; \*) – статистически значимые различия между группами наблюдений согласно U-критерию Манна-Уитни.

Результаты могут иметь принципиальное значение при выборе остеопластического материала в случаях высокого риска инфекционных осложнений эндопротезирования или органосберегающего остеосинтеза у больных, страдающих гемобластозами и опухолевыми поражениями костной ткани.

*Исследование выполнено за счет средств грантов Российского научного фонда (проект 16-15-10031, анализ результатов культивирования иммунокомпетентных клеток) и РФФИ (проект 15-03-07659, изготовление трехмерных матриц для культивирования клеток и тестирование их физико-химических свойств).*

#### Список литературы

1. Tai S., Cheng J.Y., Ishii H., Akimoto S., Satoh T., Yamamoto K., Nakajima T., Karaki S., Suzuki E., Yamaguchi K., Maruyama K. Characterization of beta-tricalcium phosphate as a novel immunomodulator // *Int Immunopharmacol.* – 2014. – Vol. 19 (1). – P. 45–51. doi: 10.1016/j.intimp.2013.12.024.
2. Caicedo M., Jacobs J.J., Reddy A., Hallab N.J. Analysis of metal ion-induced DNA damage, apoptosis, and necrosis in human (Jurkat) T-cells demonstrates Ni<sup>2+</sup> and V<sup>3+</sup> are more toxic than other metals: Al<sup>3+</sup>, Be<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mo<sup>5+</sup>, Nb<sup>5+</sup>, Zr<sup>2+</sup> // *J Biomed Mater Res A.* – 2008. – Vol. 86 (4). – P. 905–913.
3. Chaikina M.V., Uvarov N.F., Ulihin A.S., Khlusov I.A. Mechanochemical synthesis of nanosized functional materials with the apatite-type structure // *Problems of Materials Science.* – 2008. – Vol. 54 (2). – P. 219–232.
4. Хлусов И.А., Нечаев К.А., Шевцова Н.М., Хлусова М.Ю., Дворниченко М.В., Зайцев К.В., Колокольцова Т.Д., Большасов Е.Н., Шаркеев Ю.П., Легостаева Е.В., Сабурин И.Н. К вопросу о фибробластоподобных клетках в периферической крови человека // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* – 2010. – Т. V. – № 4. – С. 72–78.
5. Tverdokhlebov S.I., Stankevich K.S., Bolbasov E.N., Khlusov I.A., Kulagina I.V., Zaytsev K.V. Nonwoven Polylactide Scaffolds Obtained by Solution Blow Spinning and the In Vitro Degradation Dynamics // *Advanced Materials Research.* – 2014. – Vol. 872. – P. 257–263.
6. Khlusov I.A., Slepchenko G.B., Dambaev G.T., Zagrebina L.V., Shestov S.S., Antipov S.A., Feduschak T. A., Khlusova M.Yu., Kokorev O.V., Yermakov A.Ye, Uymin M.A., Nekrasova A.M. Trace Elements and Nanoparticles. – N.Y.: Nova Science Publishers Inc., 2011. – 93 p.
7. Khlusov I.A., Sharkeev Yu.P., Pichugin V.F., Legostaeva E.V., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Sokhnevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Khlusova M.Yu., Gutor S.S., Tolkacheva T.V. Influence of the Structure of the Titanium Oxide Coating Surface on Immunocompetent Tumor Cells // *Russian Physics Journal.* – 2016. – Vol. 58 (11). – P. 1527–1533.
8. Terui Y., Ikeda M., Tomizuka H., Kasahara T., Ohtsuki T., Uwai M., Mori M., Itoh T., Tanaka M., Yamada M., Shimamura S., Ishizaka Y., Ikeda K., Ozawa K., Miura Y., Hatake K. Activated Endothelial Cells Induce Apoptosis in Leukemic Cells by Endothelial Interleukin-8 // *Blood.* – 1998. – Vol. 92 (8). – P. 2672–2680.
9. Tuomela S., Autio R., Buerki-Thurnherr T., Arslan O., Kunzmann A., Andersson-Willman B., Wick P., Mathur S., Scheynius A., Krug H.F., Fadeel B., Lahesmaa R. Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8 (7). – P. e68415. doi: 10.1371/journal.pone.0068415.