

УДК 34.15.19: 34.57.21:62.33.31

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕАКЦИИ
СТРОМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКИ И
МОНОНУКЛЕАРОВ КРОВИ
НА КРАТКОВРЕМЕННЫЙ КОНТАКТ
С ИСКУССТВЕННЫМИ МАТЕРИАЛАМИ**

И.А. Хлусов, К.А. Нечаев, М.В. Дворниченко,
М.Ю. Хлусова, Н.В. Рязанцева*,
О.Е. Савельева*, В.Ф. Пичугин, Ю.П. Шаркеев**,
Е.В. Легостаева**, К.В. Зайцев***

Научно-образовательный центр «Биосовместимые материалы и биоинженерия»

Томского политехнического университета и Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск

*Научно-образовательный центр молекулярной медицины Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск

**Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск

***Томский НИИ курортологии и физиотерапии ФМБА России

E-mail: khlusov63@mail.ru

Изучены секреция цитокинов, апоптоз и продукция активных форм кислорода в клеточных культурах при их контакте *in vitro* с имплантатами, несущими микродуговые, магнетронные или абляционные кальцийфосфатные покрытия. Установлено, что клетками, способными контролировать процессы приживления/отторжения имплантатов с разной шероховатостью, являются, в первую очередь, мононуклеарные лейкоциты крови. Тесты *in vitro* подтвердили факт, что имплантаты с «гладкими» (Ra менее 1 мкм) кальцийфосфатными покрытиями менее пригодны для стимуляции репаративной регенерации костной ткани.

Ключевые слова:

Фибробластоподобные клетки, мононуклеарные лейкоциты крови человека, кальцийфосфатные покрытия, цитокины, апоптоз.

По мнению исследователей в области медицинского материаловедения и биоинженерии тканей, именно на границе раздела искусственного материала (имплантата) и биологических структур развиваются основные события, связанные с гистогенезом и жизнедеятельностью клеток, на основе общебиологических процессов пролиферации, коммитирования, дифференцировки, созревания и гибели [1, 2]. В подобном случае судьба клеточной культуры связана с суммарным воздействием, опосредованным через прямое взаимодействие клеток с искусственной поверхностью и секреторную активность многоклеточной системы.

Биологическая реакция на искусственные материалы определяется рядом факторов, включая топографию поверхности, химический состав, скорость деградации, тип продукта растворения и механические свойства имплантата. Поэтому в настоящее время разрабаты-

Хлусов Игорь Альбертович, д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета, профессор кафедры теоретической и экспериментальной физики ТПУ.
E-mail: khlusov63@mail.ru

Область научных интересов: клеточные технологии, биоинженерия.

Нечаев Кирилл Андреевич, аспирант кафедры фармакологии Сибирского государственного медицинского университета.

E-mail: Azul19@yandex.ru
Область научных интересов: клеточные технологии.

Дворниченко Марина Владимировна, канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета, инженер кафедры теоретической и экспериментальной физики ТПУ.

E-mail: dochic@yandex.ru
Область научных интересов: молекулярная и клеточная биология.

Хлусова Марина Юрьевна, канд. мед. наук, доцент кафедры патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета.

E-mail: uchsovet@ssmu.ru
Область научных интересов: патофизиология клеточного роста.

Рязанцева Наталья Владимировна, д-р мед. наук, профессор, проректор Сибирского государственного медицинского университета, зав. кафедрой фундаментальных основ клинической медицины, научный руководитель НОЦ молекулярной медицины Сибирского государственного медицинского университета.

E-mail: nv_gyazan@mail.ru.
Область научных интересов: молекулярная медицина.

Савельева Ольга Евгеньевна, канд. мед. наук, руководитель НОЦ молекулярной медицины Сибирского государственного медицинского университета.

E-mail: olga_chechina@mail.ru.
Область научных интересов: молекулярная медицина.

Пичугин Владимир Федорович, д-р. физ.-мат. наук, профессор, зав. кафедрой теоретической и экспериментальной физики ТПУ, председатель совета НОЦ «Биосовместимые материалы и биоинженерия» при ТПУ и Сибирском государственном медицинском университете.

E-mail: pichugin@tpu.ru.
Область научных интересов: физика тонких пленок, медицинское материаловедение.

Шаркеев Юрий Петрович, д-р. физ.-мат. наук, профессор, заведующий лабораторией физики наноструктурных биосовместимых композитов Института физики прочности и материаловедения СО РАН.

E-mail: sharkeev@ispms.tsc.ru.
Область научных интересов: физика конденсированного состояния, медицинское материаловедение.

ваются подходы к использованию материалов с технологическими и биологическими свойствами для конкретных заболеваний и пациентов, что входит в понятие «интеллектуальные имплантаты» [1] и «персонализированная терапия» [3].

В основе негативного влияния материала лежит каскад событий, характерных для воспаления. Показано, что эти события приводят к развитию гранулематозной реакции со стороны окружающих тканей и активации секреции цитокинов и протеолитических ферментов, выраженность и длительность выделения которых, согласно [4], является определяющей для развития патологического состояния.

Тем не менее, до сих пор не выработаны надежные критерии, позволяющие прогнозировать судьбу (приживление/отторжение) имплантата в организме.

В связи с этим цель исследования связана с изучением секреции цитокинов, процессов апоптоза и продукции активных форм кислорода (АФК) в клеточных культурах при их контакте *in vitro* с имплантатами, несущими различные кальцийфосфатные покрытия.

Для культивирования тестируемых клеток применяли подложки из наноструктурного титана ВТ1.0 (диаметр 12 мм, толщина 1 мм), несущие двусторонние кальцийфосфатные (КФ) покрытия. Покрытия наносили на титановую подложку с помощью модификации способа микродугового оксидирования [5], магнетронного напыления [6] либо абляционной плазмы [7].

Шероховатость поверхности искусственных КФ покрытий оценивали по значениям параметров вертикальных неровностей профиля с помощью измерительной системы Talysurf 5-120 (разрешающая способность 1 нм). Определяли *Ra* (мкм) как средний результат шероховатости в пределах нескольких длин участков измерений согласно ГОСТ 2789-73.

В качестве тестируемых многоклеточных систем использовали культуру пренатальных фибробластоподобных клеток легкого, как источник стромальных стволовых клеток, или мононуклеаров периферической крови человека. Культуральной посудой служили 24-луночные пластиковые планшеты Costar (площадь лунки 1,77 см²). Биологическое тестирование выполняли *in vitro* при 37 °С в течение 24 часов.

Характеристики популяций мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) из различных тканей очень схожи [8]. Они обнаружены в эмбриональной [9] и легочной тканях [10], в связи с чем использованная нами в экспериментах культура пренатальных фибробластоидных клеток легкого человека (ООО «Банк стволовых клеток», г. Томск) может служить источником ММСК. Препараты представляют собой популяцию клеток разной формы и размеров, что характерно для пула ММСК [9], сохраняющую при

Легостаева Елена Викторовна, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. лаборатории физики наноструктурных биосовместимых композитов Института физики прочности и материаловедения СО РАН.

E-mail: lego@ispms.tsc.ru

Область научных интересов: физика конденсированного состояния.

Зайцев Константин Васильевич, канд. мед. наук, зав. лабораторией изучения механизмов действия физических факторов Томского НИИ курортологии и физиотерапии ФМБА России.

E-mail: zaitsev-kv@mail.ru

Область научных интересов: клеточные технологии.

пассажах стабильный кариотип. Клетки свободны от посторонних вирусных (ВИЧ, гепатит, герпес и др.) и бактериальных агентов (сифилис, микоплазмы, хламидии и др.). Жизнеспособность клеток, определяемая согласно ISO 10993-5 по исключению окрашивания в тесте с 0,4 % трипановым синим, составила 95 %.

Изучение активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и ее костного изофермента в кондиционных средах культуры ММСК, имеющей фибробластоподобный фенотип, выполнялось по общепринятой биохимической технике с применением стандартного колориметрического метода [11].

Взвесь стромальных клеток использовалась в концентрации 9×10^4 жизнеспособных кариоцитов в 1 мл культуральной среды следующего состава: 15 % инактивированной при 56 °С эмбриональной телячьей сыворотки (НПО «Вектор»), 280 мг/л L-глутамин, DMEM среды до 100 мл. Контролем роста служила культура фибробластоподобных клеток на пластиковой поверхности.

Фракционирование периферической крови взрослого человека для выделения мононуклеарных лейкоцитов проводили центрифугированием на градиенте плотности $1,077 \text{ г/см}^3$ Ficoll-Paque («Pharmacia» Швеция) с центробежным ускорением 500 g в течение 45 мин. Содержание мононуклеаров составило 85 % при жизнеспособности 90 % в тесте с 0,4 % трипановым синим. В каждую лунку добавляли взвесь мононукле-

аров в конечной концентрации 10^6 клеток в 1 мл культуральной среды следующего состава: 10 % инактивированной при 56 °С эмбриональной телячьей сыворотки, 90 % среды RPMI-1640.

После культивирования жидкую часть культуры забирали, центрифугировали с центробежным ускорением 500 g в течение 15 мин. В надосадочной жидкости (супернатантах) определяли уровни фактора некроза опухоли (TNF α) и интерлейкинов (IL-2, IL-4) методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Концентрацию TNF α , IL-2, IL-4 в супернатантах фибробластоподобных и мононуклеарных клеток определяли с помощью наборов для ИФА производства «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Учет результатов проводили с использованием фотометра для микропланшетов («Multiscan EX», США). Концентрацию TNF α , IL-2 или IL-4 рассчитывали по калибровочной кривой.

Исследуемые мононуклеары крови в количестве 10^6 переносили в объеме 1 мл в пробирки для проточного цитофлюориметра, ресуспендировали в аннексинном буфере, содержащем аннексин V, меченный флуоресцеинизотиоцианатом, и пропидий йодид, инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре [12]. Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре FACSCalibur (BD, США).

Уровень наработки АФК в клетках определяли методом проточной цитометрии с помощью дихлорфлуоресцеина диацетата (ДХФ-ДА). Анализ образцов клеток проводился на проточном цитометре FACSCalibur (BD, США) с помощью гистограмм FL-1, и соответствующих им окон статистики, содержащих показатели средней геометрической интенсивности свечения меченых клеток.

Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова–Смирнова). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали непараметрический критерий Манна–Уитни (U-тест). С целью выявления связи между исследуемыми показателями

определяли коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (r). Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Постановка эксперимента позволила выяснить секреторную активность фибробластоподобных клеток, в которой костная фракция ШЦФ занимала 88 % в общем пуле секретируемого в культуре фермента. Костная ШЦФ считается маркером остеобластов [13], дифференцирующихся в течение 3–4-х суток культивирования из ММСК. Другими клетками в культуре, судя по морфологии, были производные кроветворной стволовой клетки (нейтрофилы, моноциты/макрофаги). Цитохимическая окраска культуры фибробластоподобных клеток на неспецифическую эстеразу [14] подтвердила результаты морфологического исследования. Согласно изменению секреции ИЛ-2 и ИЛ-4 при контакте с искусственными поверхностями (табл. 1), среди фибробластоподобных стромальных клеток присутствовали также Т-лимфоциты.

Имплантаты с шероховатым (среднее $Ra = 2,947$ мкм, $n = 3$) КФ покрытием, сформированным микродуговым способом, не влияли на секрецию цитокинов в культуре фибробластоподобных клеток (табл. 1). Судьба ММСК в данном случае определяется, преимущественно, физическими свойствами искусственной поверхности, что и было отмечено ранее [2].

При контакте с «гладкими» КФ покрытиями жизнедеятельность клеточной культуры стромальных стволовых клеток может зависеть от выделения TNF α (магнетронный способ нанесения покрытия, $Ra = 0,197$ мкм, $n = 3$) или торможения секреции ИЛ-2 и ИЛ-4 (абляционное способ нанесения покрытия, $Ra = 0,127$ мкм, $n = 3$). При этом эффективность роста костной ткани на подобных покрытиях в тесте эктопического остеогенеза *in vivo* не превышала 30 % при 75...80 % для шероховатых микродуговых покрытий [15].

Таким образом, секреторная активность многоклеточной системы в культуре фибробластоподобных клеток при контакте с «гладкими» искусственными покрытиями может быть одним из молекулярных механизмов в регуляции функциональной активности клеток и судьбы имплантатов в организме.

Таблица 1. Уровни цитокинов в супернатанте при культивировании фибробластоподобных клеток человека с искусственными материалами, $X \pm m$

№ группы	Исследуемая группа, $n = 3$	Уровень цитокинов, пг/мл		
		TNF α	ИЛ-2	ИЛ-4
Контроль секреции				
1	Культура фибробластоподобных клеток человека на пластике	46,52 \pm 0,67	78,01 \pm 0,44	66,33 \pm 1,28
Культуры клеток на образцах наноструктурного титана с кальцийфосфатным покрытием				
2	Микродуговое покрытие	51,56 \pm 3,93	77,57 \pm 1,07	68,77 \pm 3,61
3	Абляционное покрытие	46,91 \pm 2,79	72,14 \pm 1,16*	49,98 \pm 0,67*
4	Магнетронное покрытие	62,26 \pm 3,47*	77,32 \pm 1,59	65,86 \pm 3,33

Примечание: здесь и в табл. 2, 3 n – число наблюдений (образцов) в каждой группе; указаны различия по U-критерию Вилкоксона: (*) – с группой 1 ($p < 0,05$)

С одной стороны, кооперация макрофагов и Т-хелперов через цитокиновую регуляцию функции остеокластов (TNF α и ИЛ-2) и фибробластов (TNF α) способна запускать воспалительный/остеолитический (склеротический) процесс [1]. Избыток TNF α , недостаток ИЛ-2 и ИЛ-4, выявленные нами для разных изделий (табл. 1), являются проапоптотическими сигналами для лейкоцитов [16], мигрирующих в очаг постимплантационного воспаления. В связи с этим, тканевая многоклеточная система при контакте с «гладкими» КФ покрытиями может вызывать апоптоз иммунокомпетентных клеток крови, опосредованный через цитокины. Внутриклеточные пути реализации подобного варианта клеточной смерти описаны в работах [17, 18]. Данные процессы могут затруднять прогноз выживаемости подобных имплантатов в конкретном организме.

Известно, что при использовании медицинских изделий развивается воспалительная реакция, активность и исход которой модулируется не только местными стромальными элемен-

тами, но и циркулирующими во фракции мононуклеаров крови иммунными клетками [1]. In vitro ответ мононуклеаров периферической крови, включая цитокиновый профиль, различается в зависимости от состава искусственных материалов [19].

В наших экспериментах образцы наноструктурного титана с КФ покрытиями дифференцированно стимулировали in vitro секреторную активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека (табл. 2). Так, отмечалось увеличение концентрации TNF α (на 93 %) и IL-4 (на 15 %) в культуре клеток при контакте с абляционным и микродуговым покрытиями соответственно.

Тестируемые материалы обладают хорошей биосовместимостью на клеточном уровне, поскольку не вызывают увеличения апоптоза мононуклеаров крови и концентраций внутриклеточных АФК (табл. 3). Тем не менее, тест на окрашивание с 0,4 % трипановым синим показал некоторый рост числа окрашенных клеток (с 9 % до 14 %) при контакте культуры клеток крови с абляционным КФ материалом. По-видимому, часть клеток в данной группе погибала путем некроза, индуцированного высокими дозами TNF α (табл. 2), что уменьшало долю апоптотически измененных мононуклеаров (табл. 3).

Таблица 2. Уровни цитокинов в супернатанте при культивировании мононуклеаров крови человека с искусственными материалами, X \pm m

№ группы	Исследуемая группа, n = 3	Уровень цитокинов, пг/мл		
		TNF α	IL-2	IL-4
Контроль секреции				
1	Культура мононуклеаров крови человека на пластике	41,74 \pm 0,60	63,74 \pm 0,93	63,91 \pm 0,70
Культуры клеток на образцах наноструктурного титана с кальцийфосфатным покрытием				
2	Микродуговое покрытие	40,98 \pm 1,25	66,88 \pm 1,30	73,36 \pm 1,66*
3	Абляционное покрытие	79,19 \pm 2,08*	61,51 \pm 1,02	61,73 \pm 0,80
4	Магнетронное покрытие	59,74 \pm 15,53	67,27 \pm 1,45	68,35 \pm 3,41

Таблица 3. Количество апоптотических клеток и уровень внутриклеточных активных форм кислорода при культивировании мононуклеаров крови человека с искусственными материалами, X \pm m

№ группы	Исследуемая группа, n = 3	Результаты измерений	
		Уровень апоптоза, %	Уровень активных форм кислорода, (у.е.о.п.)
1	Культура мононуклеаров крови человека на пластике	13,78 \pm 5,31	0,550 \pm 0,290
Культуры клеток на образцах наноструктурного титана с кальцийфосфатным покрытием			
2	Микродуговое покрытие	11,66 \pm 2,41	0,236 \pm 0,048
3	Абляционное покрытие	7,99 \pm 0,66*	0,190 \pm 0,010*
4	Магнетронное покрытие	13,34 \pm 0,46	0,316 \pm 0,050

Использование корреляционного анализа для выявления механизмов описанных феноменов показало, что секреторная активность культуры фибробластоподобных клеток не зависела от шероховатости КФ покрытий. В то же время, выявлены тесные зависимости Ra покрытий с секрецией TNF α мононуклеарами крови ($r = -0,80$; $p = 0,01$; $n = 9$), IL-2 ($r = 0,69$; $p = 0,04$; $n = 9$) и IL-4 ($r = 0,83$; $p = 0,006$; $n = 9$).

Представленные данные раскрывают взаимосвязь физических свойств поверхности имплантатов и цитокиновых механизмов их различной способности к остеоинтеграции, показанной нами ранее [15]. Согласно корреляционному анализу, клетками-мишенями («стражниками»), осуществляющими регуляцию приживления/отторжения имплантатов с разной шероховатостью, являются, в первую очередь, мононуклеары крови. При средней шероховатости кальцийфосфатных покрытий в диапазоне 0,1...3 мкм, в качестве статистически значимого критерия, позволя-

ющего в модельных экспериментах *in vitro* на 80 % прогнозировать поведение имплантата в организме, можно рекомендовать определение секреции TNF α мононуклеарами периферической крови. При этом «гладкие» КФ покрытия менее пригодны для репаративной регенерации костной ткани вследствие высокой вероятности секреции TNF α , по-видимому, как проявление неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем [20].

Исследование выполнено при поддержке федеральных целевых программ «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» (государственные контракты № 16.512.11.2087 и № 16.513.11.3075), «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (государственный контракт П861 от 25.05.2010), Аналитической ведомственной целевой программы (АВЦП) «Развитие научного потенциала высшей школы на 2009–2011 годы» (регистрационный номер проекта 2.1.1/14204), гранта №5ФНМ-27 программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», интеграционного проекта №126 СО РАН и гранта РФФИ №09-04-00287а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 2nd edition / ed. by B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons. – San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. – 851 p.
2. Khlusov I.A., Zagrebin 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 / ed. by W.B. Burnside and R.H. Ellsley. – N.Y.: Nova Science Publishers Inc, 2008. – P. 37–80.
3. Vogiatzi P., Cassone M., Clifudio P.P. Personalizing gene therapy in gastric cancer // Drug News Perspect. – 2006. – V. 19. – № 9. – P. 533–540.
4. Rollins B.J. Chemokines // Blood. – 1997. – V. 90 – P. 909–928.
5. Sharkeev Yu.P., Legostaeva E.V., Eroshenko A.Yu., Khlusov I.A., Kashin O.A. 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.
6. Pichugin V.F., Eshenko E.V., Surmenev R.A., Shesterikov E.V., Tverdokhlebov S.I., Ryabtseva M.A., Sokhoreva V.V., Khlusov I.A. 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.
7. Струц В.К., Петров А.В., Матвиенко В.М, Пичугин В.Ф., Твердохлебов С.И. Свойства кальций-фосфатных покрытий, осаждаемых из абляционной плазмы, создаваемой мощными ионными пучками // Взаимодействие ионов с поверхностью: Труды XIX международной конференции (ВИП-2009). – Звенигород, 21–25 августа 2009. – М.: Издательство «Галлея-принт», 2009. – Т. 2. – С. 402–405.
8. Da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues // Journal of Cell Science. – 2006. – V. 119. – P. 2204–2213.
9. Aerts F., Wagemaker G. Mesenchymal stem cell engineering and transplantation // Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells / ed. by J.A. Nolte. – The Netherlands, Dordrecht: Springer, 2006. – P. 1–44.
10. Lama V.N., Smith L., Badri L., Flint A., Andrei A.-C., Murray S., Wang Zh., Liao H., Toews G.B., Krebsbach P.H., Peters-Golden M., Pinsky D.J., Martinez F.J., Thannickal V.J. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts // The Journal of Clinical Investigation. – 2007. – V. 117. – P. 989–996.
11. Тиц Н. Клиническое руководство по лабораторным тестам: пер. с англ. / под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Юнимед-Пресс, 2003. – 943 с.

12. Van Engeland M., Nieland L.J.W., Ramaekers F.C.S., et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure // *Cytometry*. – 1998. – V. 31. – P. 1–9.
13. Риггз Б.Л., Мелтон III Л.Дж. Остеопороз: пер. с англ. – СПб.: ЗАО «Издательство БИНОМ», «Невский диалект», 2000. – 560 с.
14. Запускалов И.В., Кривошеина О.И., Хлусов И.А., Мартусевич Я.А., Шевцова Н.М., Зайцев К.В., Кочмала О.Б. Морфофункциональные свойства стромальных стволовых клеток при культивировании *in vitro* в динамических условиях // *Бюллетень Сибирской медицины*. – 2009. – № 4. – С. 28–32.
15. Khlusov I.A., Karlov A.V., Sharkeev Yu.P., Pichugin V.F., Kolobov Yu.R., Shashkina G.A., Ivanov M.B., Legostaeva E.V., Sukhikh G.T. Osteogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow *in Situ*: Role of Physicochemical Properties of Artificial Surfaces // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2005. – V. 140. – P. 144–152.
16. Белушкина Н.Н., Хасан Х.А., Северин С.Е. Молекулярные основы апоптоза // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 1998. – № 4. – С. 15–23.
17. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Жукова О.Б., Биктасова А.К., Чечина О.Е., Сазонова Е.В., Радзивил Т.Т., Вайс А.Н., Часовских Н.Ю. Роль NF- κ B, p53 и p21 в регуляции ФНО-опосредованного апоптоза лимфоцитов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2010. – Т. 148. – № 2. – С. 56–60.
18. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Жукова О.Б., Биктасова А.К., Чечина О.Е., Сазонова Е.В., Белкина М.В., Часовских Н.Ю., Хаитова З.К. Роль активных форм кислорода и белков семейства Bcl-2 в реализации ФНО-опосредованного апоптоза лимфоцитов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2010. – Т. 148. – № 2. – С. 139–143.
19. Blaine T.A., Rosier R.N., Puzas J. E., Looney R. J., 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.
20. Браун А.Д., Моженко Т.П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. – Л.: Наука, 1987. – 232 с.

Поступила 17.11.2011 г.