

## **Выводы**

Согласно результатам проведенных исследований, метод электростатического сбора радона и его дочерних продуктов распада является пригодным для снижения их концентрации. Во время исследования удалось снизить концентрацию радона/ДПР почти в 30 раз. Параллельное измерение снижения концентрации ДПР радиометром «Сосна» на угольном накопителе дало меньший результат — снижение в 16 раз. Вероятно, это обусловлено недоучетом части ДПР, подвергающихся альфа-распаду и не фиксируемых применяемым радиометром. Следовательно, это нужно учитывать при использовании подобной методики в дальнейшем или проводить измерения специально предназначенным для этого прибором «РАА-10».

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Ларин, С. А. Вклад приоритетных канцерогенов в развитии злокачественных новообразований среди населения / С. А. Ларин, К. Г. Громов, С. А. Мун // Успехи современного естествознания. — 2005. — № 11. — С. 95–96.
2. Zeeb, H. WHO handbook on indoor radon: a public health perspective / H. Zeeb, F. Shannoun // World Health Organization. — 2009.
3. Махди, М. Р. Радиометрия эсхалации радона из строительных материалов: дис. ... канд. техн. наук: 05.11.10 / М. Р. Махди. — Минск, 1995. — 105 с.
4. Effect of electrical field on  $^{222}\text{Rn}$  progeny concentration / J. Bugu // Health Phys. — 1985. — Vol. 49. — P. 512–518.
5. Costa-Ribeiro, C. Radon detector suitable for personal or area monitoring / C. Costa-Ribeiro, J. Thomas, R. T. Drew // Health Phys. — 1969. — Vol. 17. — P. 193–196.

УДК 611.018.1:611.013.395]-097

## **ИММУНОРЕАКТИВНОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ *IN VITRO***

**Кондрачук А. Н.<sup>1</sup>, Петренев Д. Р.<sup>2</sup>**

**<sup>1</sup>Учреждение образования**

**«Гомельский государственный медицинский университет»,**

**<sup>2</sup>Государственное научное учреждение**

**«Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»**

**г. Гомель, Республика Беларусь**

## **Введение**

В настоящее время разрабатываются новые подходы, основанные на возможности использования клеточных технологий для нужд регенеративной медицины, в связи с чем, мезенхимальные стромальные клетки (МСК) привлекают огромное внимание ученых и практиков учитывая расширяющийся спектр их возможного клинического применения. В дополнение к регенеративным способностям, МСК демонстрируют выраженные иммуномодулирующие свойства, которые могут быть использованы например в лечении таких заболеваний как, реакция отторжения трансплантата, аутоиммунные заболевания, хронические воспалительные заболевания и др [1].

Механизм иммуносупрессивного действия МСК на сегодняшний день остается слабо изученным. Вероятно, действия его основаны на паракринных эффектах. Эффект супрессии активированных иммунных клеток мезенхимальными клетками *in vitro* является дозозависимым. Он усиливается с увеличением пропорции МСК при сокультивировании этих клеток с активированными лимфоцитами. Так, в некоторых условиях *in vitro* стимуляция МСК патоген-ассоциированными молекулами приводила к увеличению секреции провоспалительных факторов, но не супрессорной реакции [2]. Можно предположить, что иммуносупрессорные свойства МСК изменяются в условиях *in vivo*, проявляясь и усиливаясь с увеличением доли этих клеток в участке воспаления. Это может происходить за счет миграции МСК из прилегающих или отдаленных тканей (например, костного мозга) и (или) их пролиферации в очаге воспаления [3].

## **Цель**

Изучение возможных дозозависимых иммуномодуляторных эффектов МСК костного мозга лабораторных животных *in vitro* в условиях совместного культивирования с иммунокомпетентными клетками.

## **Материал и методы исследования**

### **Источник МСК**

МСК получали из бедренных костей лабораторных мышей линии С57В1/6 10–12 недельного возраста, массой  $20 \pm 5,25$  г. В эксперименте было задействовано 20 животных. Эвтаназию лабораторных животных осуществляли ингаляционной передозировкой  $\text{CO}_2$ . Костный мозг вымывали шприцом с иглой 30G с 2 мл базовой среды с добавлением антибиотиков в стерильные чашки Петри (Sarstedt, Германия). После пипетирования и получения гомогенной взвеси определяли концентрацию клеток и жизнеспособность с трипановым синим в камере Горяева.

Концентрацию клеток доводили до  $1 \times 10^6$ /мл. полной культуральной средой и помещали в Т-25 флаконы (Sarstedt, Германия). Клетки культивировали в  $\text{CO}_2$  инкубаторе при  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  и 100 % влажности. Через 24 часа надосадочную жидкость удаляли и замещали свежей порцией полной культуральной среды. Первичную культуру МСК мониторировали для определения конfluence-монослоя клеток микроскопически (инвертированный микроскоп «Leica», Германия). По достижении первичной культуры 70–80 % конfluence-клетки с поверхности пластика снимали трипсинизацией (0,25 % Trypsin/EDTA, Sigma, США). Для получения МСК 1-го пассажа засеивали полученную клеточную суспензию первичной культуры МСК в стерильные культуральные флаконы Т-75 (Sarstedt, Германия) с плотностью посева аналогичной для первичной культуры. Флаконы культивировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  и 100 % влажности воздуха. Два раза в неделю проводили 50 % смену культуральной среды. Количество клеток подсчитывали с трипановым синим в камере Горяева.

### **Источник иммунокомпетентных клеток**

В качестве иммуноцитов использовали мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) и спленоциты мыши. Периферическую кровь отбирали напрямую иглой из желудочков сердца в стерильные пробирки с добавлением 20 ЕД/мл гепарина. МНПК выделяли на градиенте плотности Histopaque ( $\rho = 1,077$ , Sigma, США).

Для получения спленоцитов использовали несколько вариантов безферментативной обработки. Селезенку измельчали на 4–5 фрагментов. Фрагменты перетирали между двух предметных стекол со шлифованными краями. Полученную суспензию с наличием крупных конгломератов пропускали через шприцевые иглы разного диаметра. Альтернативно вначале надорвав капсулу селезенки с одного края выдавливали клеточную массу с помощью скребка (Cellscraper 16 cm, «Sarstedt») в чашку Петри, или фрагментированную на 4–5 кусков селезенку аккуратно раздавливали поршнем шприца. Крупные сгустки и фрагменты ткани осаждали отстаиванием или пропускали суспензию через сетчатый капроновой фильтр. Таким образом, получали достаточно однородную, практически без клеточных сгустков суспензию. Далее спленоциты фракционировали на градиенте плотности Histopaque-1077 («Sigma») или лизировали эритроциты в исходной суспензии буфером на основе хлорида аммония (ACK lysis buffer).

МСК и спленоциты культивировали во флаконах Т-25 (Sarstedt, Германия) в концентрации  $0,6\text{--}0,7 \times 10^6$  клеток в мл. используя следующие базовые среды: RPMI-1640, DMEM/F12, DMEM (все Gibco, США), DMEM (AppliChem, Германия). Для полной культуральной среды добавляли 10 % FBS (терминализованная при  $56^\circ\text{C}$  — 30 мин), 2 mM L-glutamine, 100U/ml antibiotic (penicillin/streptomycin), 1 mM sodium pyruvate, 0,005 % 2-mercaptoethanol (все Sigma, США).

### **Окрашивание МПК внутриклеточным флуоресцентным красителем CFSE**

Перед совместным культивированием МНПК предварительно окрашиваются внутриклеточным красителем 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеиндиацетат N-сукцинимидил эфира (CFSE, Invitrogen, США), по изменению интенсивности флуоресценции которого, после окончания культивирования, оценивается количество поделившихся клеток. Конечная используемая концентрация CFSE для окрашивания  $1 \times 10^7$  МНПК/мл культуральной среды составляла 5 мкМ.

### **Совместное культивирование МСК и МНПК**

Сокультивирование МНПК и МСК проводили в варианте «монослойной культуры». МСК были в предмонослое и практически не делились, находясь на плато кривой роста. МНПК физически контактировали с МСК достигшими 80 % конfluence-клетками и прошедшими фазу активного деления. Митотическую инактивацию МСК проводили митомицином С (Invitrogen, США) в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин. Культуру клеток после обработки трижды промывали базовой средой. МНПК предварительно окрашенные CFSE культивировали в кон-

центрациях  $2 \times 10^4$  и  $2 \times 10^5$  клеток/луночку 24-луночного планшета в полной культуральной среде содержащей 5 мкг/мл фитогемагглютинаина в присутствии или отсутствии МСК 1-го пассажа.

**Оценка антиген-неспецифической пролиферативной активности МНПК в совместных культурах в присутствии и отсутствии МСК методом проточной цитофлуориметрии**

После 3-х дневного культивирования клеточную суспензию из лунок переносили в пробирки для проточной цитометрии с моноклональными антителами к CD45TC (Caltag-Invitrogen, США). Измерения проводили на проточном цитофлуориметре «Cytomics FC-500» (Beckman Coulter, США). Для оценки пролиферативного ответа в соответствии с распределением флуоресценции устанавливали границы популяции живых лейкоцитов, в пределах которой выделяли субпопуляцию CD45<sup>+</sup> Т-клеток (FL4). Пролиферацию лимфоцитов оценивали по интенсивности флуоресценции внутриклеточного красителя CFSE в диапазоне флуорохрома — FITC (FL1). Результат регистрировали на 50000 событий в пробе. После измерения, пролиферацию лимфоцитов оценивали как процент не поделившихся (CFSE<sup>high</sup>) и поделившихся (CFSE<sup>low</sup>) CD45<sup>+</sup>-лимфоцитов.

Сравнение количественных показателей в двух независимых группах проводили по методу Манна — Уитни. Корреляционный анализ выполняли путем определения коэффициентов корреляции по Спирмену.

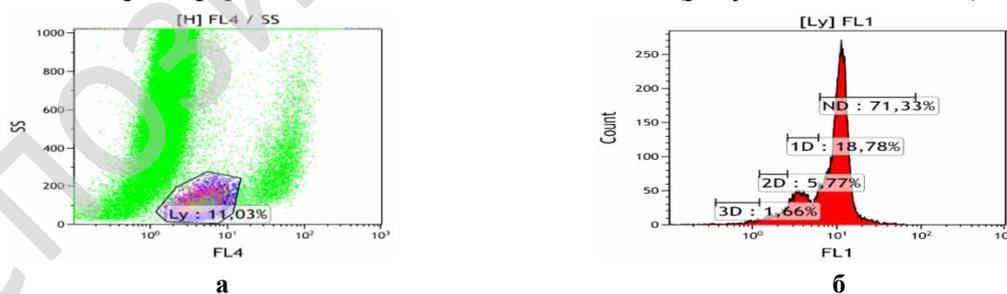
**Результаты исследования и их обсуждение**

**Морфологическая характеристика МНК, сокультивируемых с МСК**

На начальных этапах культура МСК характеризовалась высокой степенью гетерогенности, которая выражалась в существовании в культуре разных клеточных типов, отличающихся по морфологии и скорости пролиферации. После 48 часов сокультивирования ФГА-МНК прочно адгезировали к МСК, в случае неактивированных МНК такие клетки были единичны. Наблюдалась характерная примесь гемапоэтических клеток

**Пролиферативная активность МНПК**

Доля поделившихся клеток среди неактивированных МНПК была крайне мала (от 0 до 2,5 %). Добавление ФГА увеличивало процент пролиферирующих клеток (15–50 %) После 48 часов взаимодействия МСК не стимулировали пролиферацию неактивированных лимфоцитов и ингибировали клеточное деление ФГА активированных МНПК. При совместном культивировании МСК и МНПК показано ингибирующее влияние МСК костного мозга на ФГА-индуцированную пролиферацию лимфоцитов. Максимальный супрессорный эффект ФГА-индуцированную пролиферацию лимфоцитов отмечен при соотношении МСК:МНПК 1:10 (степень ингибирования составила 29 %). При соотношении МСК:МНПК 1:1 достоверного влияния МСК на пролиферацию МНПК не было выявлено (рисунок 1, таблица 1).



**Рисунок 1 — Пролиферативный ответ CD45<sup>+</sup> ФГА стимулированных лимфоцитов в присутствии МСК 1-го пассажа: а — распределение CD45<sup>+</sup> лимфоцитов по боковому светорассеиванию; б — Dotplot диаграмма распределения не поделившихся CFSE<sup>high</sup>-лимфоцитов и поделившихся CFSE<sup>low</sup>-лимфоцитов**

**Таблица 1 — Пролиферативная активность ФГА-активированных МНПК при совместном культивировании с МСК**

Дозовое соотношение	Снижение, %,
МСК : МНПК 1:10	29 ± 4 ↓ *
МСК : МНПК 1:1	21 ± 5 ↓

\* — Достоверное отличие от монокультуры ФГА-МНПК, p < 0,05.

Полученные данные подтверждают, что МСК эффективно подавляют пролиферацию активированных лимфоцитов. В присутствии МСК пролиферативная активность ФГА-активированных МНПК снижается. Этот эффект опосредуется как за счет растворимых медиаторов, продуцируемых МСК, так и с помощью непосредственных контактов «клетка-клетка».

В экспериментах не удалось поддержать длительную культуру спленоцитов мыши. Наблюдалась значительная потеря жизнеспособности клеток уже на вторые сутки культивирования. Количество жизнеспособных клеток, оцененных цитофлуориметрически в тесте с Propidium Iodide сразу после выделения составляла 95–98 %, и 65–70 % на вторые сутки культивирования.

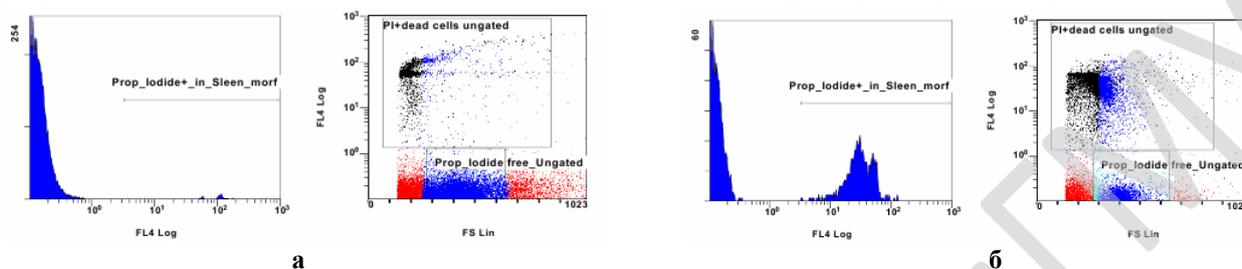


Рисунок 2 — Оценка жизнеспособности культуры спленоцитов мыши в тесте с Propidium Iodide: а — после выделения — 0 сутки; б — на 2-е сутки

### Выводы

МСК подавляют пролиферативную активность мононуклеаров периферической крови стимулированных фитогемагглютинином, эффект особенно выражен при взаимодействии с МСК в фазе экспоненциального роста. Максимальный супрессорный эффект ФГА-индуцированной пролиферации лимфоцитов отмечен при соотношении МСК:МНПК 1:10, степень ингибирования составила 29 %.

Не смотря на доступность и простоту получения спленоцитов мышей, этот тип клеток в моделях оценки иммунореактивности оказался весьма требовательным к условиям культивирования и составу культуральных сред, что необходимо учитывать исследователю при подготовке эксперимента.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Salem, H. K. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status / H. K. Salem, C. Thiernemann // Stem Cells. — 2010. — Vol. 28. — P. 585–596.
2. Rasmuson, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells / I. Rasmuson // Exp. Cell. Res. — 2006. — Vol. 312. — P. 2169–2179.
3. Immunobiology of mesenchymal stem cells / S. Ma [et al.] // Cell Death and Differentiation. — 2014. — Vol. 21. — P. 216–225.

УДК 811.161.3

## РАЗВИТИЕ КОММУНИКАТИВНОЙ КОМПЕТЕНТНОСТИ ОБУЧАЮЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ БИЛИНГВИЗМА

Коновалова Ю. А.

Гомельский филиал государственного учебного заведения  
«Университет гражданской защиты Министерства чрезвычайных ситуаций Беларуси»  
г. Гомель, Республика Беларусь

### Введение

Современное мировое развитие характеризуется ускорением динамики социально-экономических процессов и вовлечением в глобальную конкуренцию все новых сфер экономической и социальной жизни, включая образование. В настоящее время происходит увеличение количества людей, владеющих, как минимум, двумя языками, интернационализация образования, миграционные процессы, динамическое развитие билингвизма. Перечисленные факторы превратили билингвизм в реальность нашего времени.

Проблема билингвизма (двуязычия) считается одной из самых сложных в языковедческой науке и наиболее актуальной для Беларуси, поскольку в нашей стране согласно Конституции государственными языками являются белорусский и русский языки [1, с. 8]. Общие положения этого явления достаточно подробно исследованы в работах Е. М. Верецагиной, А. Е. Супруна, М. Б. Ус-