ISSN 2519-2655

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
АКАДЕМІЯ НАУК ВИЩОЇ ОСВІТИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ПРОМИСЛОВОЇ ФАРМАЦІЇ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ
КАФЕДРА АПТЕЧНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ

MINISTRY OF HEALTH OF UKRAINE
MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE
HIGHER EDUCATION ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY (NUPh)
DEPARTMENT OF INDUSTRIAL PHARMACY
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY OF DRUGS

СУЧАСНІ ДОСЯГНЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ І БІОТЕХНОЛОГІЇ

MODERN ACHIEVEMENTS OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

ЗБІРНИК НАУКОВИХ ПРАЦЬ
Випуск 5

PROCEEDINGS PAPERS
Issue 5
collection of scientific works

ХАРКІВ
KHARKIV
2018

УДК 615.1
С 89

Редакційна колегія:
проф. Котвіцька А.А., проф. Загайко А.В., проф. Гладух Є.В.,
проф. Стрельников Л.С., проф. Вишневська Л.І., проф. Половко Н.П.,
проф. Стрілець О.П., проф. Шпичак О.С., доц. Калюжная О.С.,
доц. Рибалкін М.В., доц. Семченко К.В., ас. Марченко М.В.,
доц. Кухтенко Г.П., доц. Манський О.А., ас. Солдатов Д.П.

С 89 **Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології** : збірник наукових праць, випуск 5. – Х.: Вид-во НФаУ, 2018. – 481 с.
ISSN 2519-2655

Modern achievements of pharmaceutical technology and biotechnology : collection of scientific works, issue 5. Kharkiv: NUPh publishing house, 2018. – 481 p.

Збірник містить матеріали VII Науково-практичної дистанційої конференції з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології» (23 листопада 2018 р.).

Розглянуто теоретичні та практичні аспекти розробки, виробництва, контролю якості, стандартизації та реалізації лікарських засобів на сучасному етапі.

Для широкого кола магістрантів, аспірантів, докторантів, співробітників фармацевтичних та біотехнологічних підприємств, фармацевтичних фірм, викладачів вищих навчальних закладів.

Collection contains materials of the VII International scientific and practical distance conference «Modern achievements of pharmaceutical technology and biotechnology» (November, 23, 2018).

Theoretical and practical aspects of development, production, quality control, standardization and merchandising of medicinal products at the present stage are examined.

This collection is intended for a wide range of graduate students, doctoral students, employees of pharmaceutical and biotechnological enterprises, pharmaceutical companies, teachers of higher educational institutions.

Редколегія не завжди поділяє погляди авторів статей
Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, економіко-статистичних даних, власних імен та інших відомостей
Матеріали подаються мовою оригіналу

ISSN 2519-2655

УДК 615.1
©НФаУ, 2018

До препаратів нового покоління можна віднести нові комбіновані лікарські засоби, які створюються на основі хімічної субстанції разом з препаратами стимулюючими дію ноотропів. Існують певні вимоги до таких ліків: вони повинні покращувати пам'ять, активувати основні фази процесу запам'ятовування, позитивно впливати на пригнічений стан, прибирати головні болі, запаморочення, нормалізувати обмінні процеси і активувати антиоксидантну систему, впливати на безсоння, підвищувати загальну працездатність. До таких комбінованих препаратів можна віднести таблетки Тіоцетам®форте – комбінацію антиоксиданту тіотриазоліну та ноотропного лікарського засобу пірацетаму.

Таким чином, розвиток нових вітчизняних сполук з ноотропною дією та їх комбінацій, рухається дуже динамічно. Актуальним питанням сьогодення є фармацевтичне дослідження пірацетаму не тільки як монопрепарат, але і в комбінаціях з антиоксидантом Тіотриазоліном. Це і буде задачею наших подальших досліджень.

УДК: 577.352.336: 576.311.342.2: 576.324: 57.043

ВЛИЯНИЕ ГЛИЦЕРОЛА И ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ НА ИЗМЕНЕНИЕ ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ПРОПОРЦИЙ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Землянских Н.Г., Бабийчук Л.А.
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
г. Харьков, Украина

Введение. Выживаемость эритроцитов в условиях криоконсервирования может быть связана с изменениями механических свойств плазматических мембран под влиянием криопротекторных агентов. Исследования различных патологий эритроцитов, сопровождаемых модификацией механических характеристик мембраны (устойчивости и деформируемости) и геометрических параметров клеток, позволяют предположить взаимосвязь между свойствами мембран и изменениями формы и объема клеток. В основе такой взаимосвязи лежат особенности структурного состояния белков мембрано-цитоскелетного комплекса, контролирующего и опосредующего регуляцию физиологических процессов в эритроцитах [2, 3].

В практике криоконсервирования основным криопротектором, используемым для защиты эритроцитов человека от неблагоприятных факторов при замораживании-отогреве, является глицерол. Существенным недостатком данного криопротекторного агента (КПА), как представителя эндоцеллюлярного типа защитных соединений, является трудоемкая процедура его удаления из размороженных клеток с целью сохранения их осмотической стабильности в физиологических условиях. Альтернативой эндоцеллюлярным КПА могут быть нетоксичные экзоцеллюлярные (не проникающие через мембрану) вещества, которые можно не удалять из размороженной эритромассы, поскольку снижение их концентрации происходит путем постепенного разведения в русле крови реципиента. К числу таких КПА относится полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1500 (ПЭГ-1500).

В норме форма эритроцитов человека представляет собой

двояковогнутый диск. Введение гипертонических растворов КПА в суспензию эритроцитов приводит к выходу воды из клеток с последующим перераспределением ионов между вне- и внутриклеточной средой, что обусловливает изменение объема клеток. Кроме того под влиянием КПА дискоциты могут изменять форму, трансформируясь в стоматоцито- и эхиноцито-подобные клетки. В результате поперечный размер и диаметр клетки меняются. Изменения геометрических пропорций эритроцитов по-разному проявляются в зависимости от вида КПА и их концентрации. Можно предположить, что стабилизация клеток в присутствии КПА, обеспечивающих высокий уровень их сохранности после размораживания, характеризуется сходными изменениями геометрических пропорций эритроцитов.

Цель исследования заключалась в изучении влияния криопротекторных агентов глицерола и ПЭГ-1500 на изменение геометрических пропорций эритроцитов человека в их присутствии.

Методы исследования. Объектом исследования служили эритроциты крови доноров, полученной в центре службы крови г. Харькова. Эритроциты отмывали от плазмы и лейкоцитарных компонентов 3-кратным центрифугированием при 1200 g в течение 10 мин при комнатной температуре с использованием раствора 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl, pH 7.4.

Геометрические параметры клеток определяли методом прочной цитометрии по данным распределения клеточных субпопуляций в соответствии с показаниями прямого светорассеивания (FCS) при длине волны аргонного лазера 488 нм на приборе FACS Calibur (Becton Dickenson, США). Эритроциты инкубировались в течение 30 мин при 37 °С в растворах глицерола и ПЭГ-1500, дополненных 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl, pH 7.4, с разведением эритромассы до концентрации порядка 10^7 клеток/мл. Контрольные образцы эритроцитов инкубировали в модифицированной Рингер-глюкозной среде: 125 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$, мМ, 1 мМ $CaCl_2$, 32 мМ HEPES (pH 7,4), 5 мМ глюкоза. При каждом измерении просчитывалось 20000 клеток. Обработка экспериментальных данных выполнена с помощью программы WinMDI 2.8.

Статистическая обработка результатов выполнена с использованием программного пакета Statgraphics plus 2.1. Данные представлены в виде M ± SE (среднее значение ± стандартная ошибка). Статистическую значимость различий между экспериментальными группами оценивали с помощью множественного рангового теста Фишера по процедуре группировки выборок с наименьшей значимой разницей. В каждой серии проведено 6 опытов (n=6).

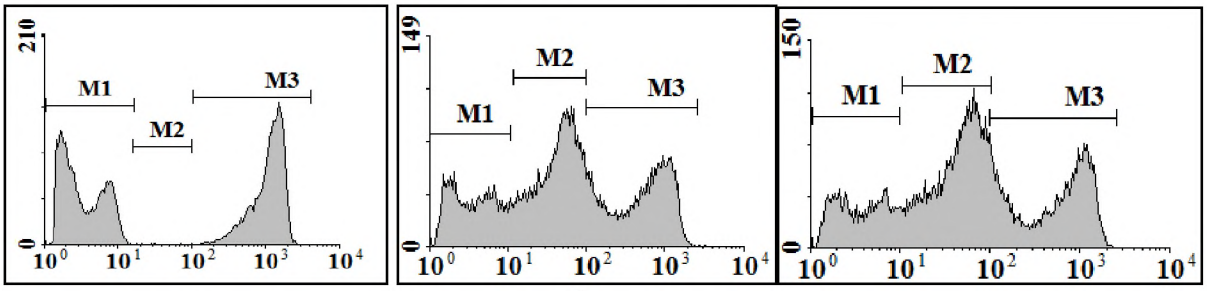
Основные результаты. Метод проточной цитометрии позволяет анализировать индивидуальные характеристики нескольких тысяч клеток в гетерогенной клеточной суспензии при одном измерении и получить информацию о размере клеток по сигналу прямого светорассеяния [4].

Движение жидкости в капилляре заставляет эритроциты вращаться, вследствие чего детекторы фиксируют разные проекции диска, определяя бимодальное распределение клеток на гистограммах (рис.1). При логарифмическом анализе эритроциты, инкубируемые в среде Рингера (контроль) четко распределяются в пределах двух зон, соответствующих

маркерам M1 и M3, которые отражают поперечные и фронтальные размеры дисковидных клеток.

Изменения геометрических параметров эритроцитов под влиянием криопротекторных веществ могут быть охарактеризованы 2 показателями: количеством клеток в каждой зоне, и значением медианы гистограммы, показывающей величину, относительно которой клетки в выделенной зоне разделены на две равные части по количеству клеток. Добавление в суспензию эритроцитов криопротекторных веществ приводит к перераспределению клеток между зонами в соответствии с их характеристиками.

Изменения геометрических параметров эритроцитов под влиянием КПА являются концентрационно-зависимыми (таблица). В целом, для всех исследованных растворов КПА отмечалось снижение количества клеток и значения медианы в зоне M3. Также наблюдалось снижение количества клеток в зоне M1 для всех исследованных растворов. Таким образом, общая тенденция в перераспределении клеток между зонами M1, M2 и M3, границы которых установлены на основании распределения клеток в контрольной среде (рис. 1), заключалась в снижении количества клеток в зонах M1 и M3, с одновременным увеличением их доли в зоне M2. Такая тенденция говорит об изменении геометрических пропорций значительного числа эритроцитов в направлении уменьшения фронтальных и увеличения поперечных размеров диска, что возможно за счет изменения формы клеток и их объема.



а *б* *в*

Рис. 1. Гистограммы распределения эритроцитов, экспонированных в среде Рингера (а), 5% глицероле (б) и 5% ПЭГ, по показателям FSC. Измерения проведены в логарифмической форме. Шкала X – показатели прямого светорассеивания (FSC), (усл. ед.). Шкала У – количество просчитанных событий. Представлены данные типичного эксперимента.

Таблица 1. Перераспределение популяций эритроцитов между зонами M1 – M3 под влиянием криопротекторных веществ по данным проточной цитометрии (FSC) (M ± SE).

Количество клеток, %			
Растворы	**M1**	**M2**	**M3**
Среда Рингера	53,8 ± 2,8	2,5 ± 0,6	43,8 ± 3,1
ПЭГ-1500, 5 %	36,2 ± 2,8*	43,3 ± 1,5	21,1 ± 2,1*
ПЭГ-1500, 20 %	41,2 ± 3,5*	46,0 ± 2,1	13,6 ± 2,0*
Глицерол, 5 %	36,9 ± 3,0*	44,0 ± 2,1	20,0 ± 2,0*
Глицерол, 20 %	38,7 ± 2,1*	43,1 ± 1,9	19,1 ± 2,2*
Значения медиан гистограмм, у.е.			
Растворы	**M1**	**M2**	**M3**

Среда Рингера	4,1 ± 0,5	–	1323,5 ± 44.4
ПЭГ-1500, 5 %	4,8 ± 0,1	54,0 ± 2,7	977,2 ± 65,1*
ПЭГ-1500, 20 %	4,3 ± 0,2	72,0 ± 5,0	365,6 ± 46,7*
Глицерол, 5 %	4,8 ± 0,3	70,6 ± 8,5	817,0 ± 164,8*
Глицерол, 20 %	4,1 ± 0,1	90,4 ± 7,9	458,3 ± 104,8*

* P<0,5 относительно контроля (среда Рингера).

Очевидно, что изменение геометрических параметров эритроцитов при экспонировании в гипертонических растворах ПЭГ-1500 может быть связано, в первую очередь, с их осмотическим сжатием, на что указывает уменьшение значения медианы в зоне М3. В отношении гистограмм клеток, экспонированных с глицеролом, следует заметить, что наблюдаемые перераспределения отражают, прежде всего, изменения геометрических пропорций клеток, т.е. формы клеток, а не изменение их объема, поскольку данный КПА проникает в клетки в обмен на внутриклеточную воду, вследствие чего существенного изменения объема клеток не происходит.

Принимая во внимание особенности количественного распределение клеток между зонами М1, М2 и М3 и изменения значений медиан в зонах М1 и М3 можно отметить, что 5 %-ные растворы ПЭГ-1500 и глицерола действительно имеют очень близкие характеристики. Однако эритроциты, экспонированные в 20 %-ных растворах ПЭГ-1500 и глицерола, несмотря на определенное сходство в количественном распределении клеток между зонами М1, М2 и М3, все же отличаются по значениям медиан в зоне М3. Резкое снижение значений медиан в зоне М3 в присутствии ПЭГ указывает на обезвоживание эритроцитов в данном гипертоническом растворе, что, может иметь негативные последствия для стабильности размороженных клеток после переноса в физиологические условия.

Изменения геометрических пропорций эритроцитов в гипертонических растворах КПА, обусловленные трансформацией их формы и объема, могут, в определенном смысле, рассматриваться как реализация внешнего ответа клеток на изменения структурного состояния или характера взаимодействий между белками мембрано-цитоскелетного комплекса, обусловленных влиянием КПА. Результатом такого рода перестроек в сети мембрано-цитоскелетного комплекса может быть изменение механических свойств мембраны. В частности, при повышении осмоляльности среды было обнаружено увеличение жесткости мембран эритроцитов [5]. Возможно, изменения механических свойств эритроцитов в присутствии гипертонических растворов криопротекторных веществ также связаны с формированием более жестких мембран, способных выдерживать большие по величине стрессовые напряжения. Модификации структурного состояния отдельных белков или взаимодействий между белками мембрано-цитоскелетного комплекса, лежащие в основе изменений свойств мембраны под влиянием осмотического фактора, в конечном счете, реализуются путем трансформации геометрических параметров клеток. По-видимому, такого рода распределение геометрических параметров эритроцитов, обусловленное изначальной неоднородностью свойств субпопуляций в клеточной суспензии, является оптимальным для

повышения стабильности клеток.

Возможно, растворы ПЭГ и глицерола, обеспечивающие повышение стабильности эритроцитов, способствуют формированию структурно-функционального состояния мембрано-цитоскелетного комплекса, которое достигается путем комбинации незначительных по величине изменений его отдельных элементов. Для каждого вещества вклад модификации тех или иных компонентов в стабилизацию мембраны к стрессу, по-видимому, может отличаться, поэтому увеличение концентрации криопротекторных агентов ведет к разным последствиям в изменении пропорций клеток. Поскольку физико-химические свойства растворов криопротекторов отличаются между собой, степень их дегидратирующего влияния также может иметь разное проявление, что объясняет разные условия проявления ими стабилизирующего действия на клетки в условиях стресса. Высказанные предположения в определенной степени находят экспериментальные подтверждения в работе [1], где показали вариабельность проявлений взаимодействия белка с концентрированными растворами различных веществ, которые приводили к локализованным возмущениям поверхности, дегидратации, изменению электростатических характеристик и динамики макромолекул. Приведенные факты подтверждают возможность неспецифической модификации отдельных элементов мембрано-цитоскелетного комплекса под влиянием криопротекторных веществ, которые могут вести к изменениям белок-белковых взаимодействий в сети специфических связей данного комплекса, что отражается на физических свойствах мембран эритроцитов и определяет трансформацию геометрических параметров клеток.

Выводы. Криопротекторные агенты глицерол и ПЭГ-1500, обеспечивающие эффективную защиту эритроцитов человека при замораживании-отогреве, вызывают сходные изменения геометрических параметров клеток, что указывает на важную роль трансформации геометрических параметров клеток для модификации механических свойств мембран. Независимо от того, являются ли изменения геометрических параметров эритроцитов под влиянием КПА причиной или следствием структурно-функциональных модификаций мембранных компонентов, именно они, во многом, определяют стабильность клеток в процессе криоконсервирования.

Список литературы

1. Abriata LA, Spiga E, Peraro MD. Molecular Effects of Concentrated Solutes on Protein Hydration, Dynamics, and Electrostatics. Biophys. J. 2016, 111(4), 743-755.

2. Mohandas N, Evans E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1994, 23, 787-818.

3. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. Semin. Hematol. 1993, 30(3), 171-192.

4. Piagnerelli M, Zouaoui Boudjeltia K, Brohee D, Vereerstraeten A, Piro

P, Vincent JL, Vanhaeverbeek M. Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques. J. Clin. Pathol. 2007, 60(5), 549-554.

5. Tan Y., Sun D., Wang J., Huang W. Mechanical characterization of human red blood cells under different osmotic conditions by robotic manipulation with optical tweezers. IEEE Trans Biomed Eng. 2010, 57(7), 1816-1825.

УДК 606

БІОТЕСТУВАННЯ ЯК МЕТОД БІОТЕХНОЛОГІЇ

Зимлянський М.О., Гороз Ю.О., Стрілець О.П., Стрельников Л.С.
Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

На сьогоднішній день одним з найбільш популярних методів контролю токсичного забруднення навколишнього середовища та токсичної дії на організм людини косметичних, фармацевтичних, біотехнологічних та промислових продуктів є біотестування. Цей метод контролю оснований на реакції тест–об'єктів на токсичну дію того чи іншого препарату.

З розвитком біології та біотехнології, на сьогоднішній день використовують велике різноманіття тест–об'єктів. Тест–об'єкти – це високочутливі організми, які представленні в межах географічного регіону, доступні для культивування та добре вивчені. Як тест–об'єкт можна використовувати риб, ракоподібних, комах, найпростіших, водорості та багато інших.

Останнім часом найбільш перспективним організмом для визначення токсичності вважається інфузорія туфелька (*Paramecium caudatum*).

Інфузорії – це одноклітинні еукаріотичні організми. Характерна особливість інфузорій – відносно швидка мінливість, яка дозволяє їм адаптуватися до самих різних умов. У міру того як найпростіші адаптуються до умов середовища, перебудовуються всі їх життєві функції, змінюються швидкість руху, темп розмноження і здатність поглинати їжу, а також форма і розміри тіла. Але якщо середовище не змінюється, то властивості інфузорій залишаються стабільними, це і дозволяє використовувати їх як тест–об'єкт [3].

Характерною особливістю інфузорії *Paramecium caudatum* є подразливість. Це здатність організму відповідати певним чином на дії навколишнього середовища. Ця властивість характерна для всіх живих істот. Найпростіші не мають нервової системи, вони сприймають подразнення всією клітиною і здатні відповідати на них рухом, переміщаючись в напрямку подразника або від нього.

Вони володіють високою чутливістю, високою швидкістю розмноження, простотою культивування та подібною, до людського організму, реакцією на токсичну дію препаратів. На кафедрі біотехнології Національного фармацевтичного університету розпочато роботу з вивчення біотестування фармацевтичних, косметичних та біотехнологічних препаратів на токсичність з використанням як тест–об'єктів інфузорій *Paramecium caudatum* [2].

Біотестування – вид біологічного контролю оснований на визначенні тест – реакції тест-організму на токсичну дію препарату на організм.