МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА БІОЛОГІЧНОЇ ХІМІЇ ТА
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

MINISTRY OF HEALTH OF UKRAINE
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
AND VETERINARY MEDICINE

ЗБІРНИК
публікацій
І Міжнародної науково-практичної
online конференції
«СУЧАСНІ ДОСЯГНЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ, КЛІНІЧНОЇ, ЕКОЛОГІЧНОЇ БІОХІМІЇ ТА МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ»,
присвячена 85-річчю з дня заснування кафедри біохімії

BOOK
of publications
of I International scientific and practical
online conference
"MODERN ACHIEVEMENTS OF EXPERIMENTAL, CLINICAL, ENVIRONMENTAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY",
dedicated to the 85th Anniversary of the Department of Biochemistry

07 березня 2024 р.
м. Харків, Україна
March 07, 2024
Kharkiv, Ukraine

УДК 615.1
ББК 52.8
А 43

ЕЛЕКТРОННЕ ВИДАННЯ

Редакційна колегія: проф. Алла КОТВІЦЬКА, проф. Інна ВЛАДИМИРОВА, проф. Віра КРАВЧЕНКО, проф. Нодар СУЛАШВІЛІ, проф. Юлія РАЗУМІЄНЕ, доц. Ігор СЕНЮК, доц. Олена ЩЕРБАК.
Укладачі: проф. Віра КРАВЧЕНКО, доц. Ігор СЕНЮК, доц. Олена ЩЕРБАК.

Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології: збірник публікацій І Міжнародної науково-практичної *online* конференції, присвяченої 85-річчю з дня заснування кафедри біохімії (м. Харків, 07 березня 2024 р.). – Х. : НФаУ, 2024. – 593 с.

Конференція внесена до реєстру з'їздів, конгресів, симпозіумів та науково-практичних конференцій, які заплановані у 2023 році, реєстраційне посвідчення УкрІНТЕІ № 590, від 11.12.2023 р.

Дане видання представлене збірником матеріалів науково-практичної конференції, в якому наведені сучасні та актуальні питання розвитку експериментальної та клінічної біохімії. Метою заходу стало презентування результатів експериментальних досліджень науковців, які спрямовані до поглибленого вивчення клітинних та молекулярних механізмів розвитку поширених патологічних станів та їх фармакокорекцію. Автори у своїх роботах приділили увагу щодо вивчення біохімічних механізмів дії біологічно активних сполук та лікарських засобів, тим самим висвітлюючи актуальні питання медичної та фармацевтичної біохімії. Науковий захід популяризує сучасні експериментальні дослідження, які розкривають біохімічні процеси у функціонуванні організму людини та у розкритті патогенетичних аспектів діагностики, лікування і профілактики захворювань.

Видання розраховане для широкого кола науковців та практичних фахівців у галузі знань «Охорона здоров'я», а також для усіх охочих, які зацікавлені у розвитку експериментальних наукових проєктів.

УДК 615
ББК 52.8

© Національний фармацевтичний університет, 2024р.

9. Nagaraja AS, Sadaoui NC, Dorniak PL, et al. SnapShot: stress and disease. Cell Metab. 2016;23(2):388-8.e1. doi: 10.1016/j.cmet.2016.01.015.

ВИКОРИСТАННЯ ТРОЛОКСУ ЯК СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ДОВГОСТРОКОВОЇ ВИЖИВАНОСТІ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ГЕМОПОЕТИЧНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ

Зубов П.М., Зубова О.Л.
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна
pmzubov@gmail.com

Вступ. Завдяки унікальним властивостям компонентів кордової крові людини (КК), відносній простоті та безпеці заготівлі, КК стала одним із найбільш затребуваних джерел гемопоетичних прогеніторних клітин (ГПК) для лікування патологій крові, імунної системи, онкологічних та інших захворювань. Всезростаюча увага з боку вчених і лікарів до КК призвела до необхідності створення кріобанків, у яких зразки можуть зберігатися в замороженому стані тривалий час без втрати їх біологічних властивостей. Проте невеликі об'єми кожної дози КК та неможливість повторного забору потребують використання ефективного методу кріоконсервування з метою збереження максимальної кількості функціонально активних клітин після розморожування. Вирішення цього завдання можливе тільки шляхом проведення комплексних досліджень, спрямованих на вивчення ролі факторів, що впливають на збереженість та життєздатність клітин на кожному з етапів процесу кріоконсервування. Це дозволить виявити критичні точки порушень структурних компонентів і проводити цілеспрямований підбір умов для стабілізації клітин з подальшою розробкою ефективних методів кріоконсервування. Окрім цього, для прогнозування терапевтичної ефективності препаратів КК важливим завданням є не тільки проведення їх оцінки відразу після розморожування, а й визначення відстроченого стану клітин шляхом перенесення до фізіологічних умов *in vitro*.

Показано, що при кріоконсервуванні, як на стадії еквілібрації з кріопротекторами, так і після розморожування спостерігається збільшення в клітинах вільних радикалів (активних форм кисню), в результаті чого відбувається порушення енергетичного стану та пошкодження мембран клітин через перекисне окислення ліпідів. Додавання до кріозахисного середовища речовин, які мають виражені антиоксидантні та цитопротекторні властивості,

дозволить, на нашу думку, уникнути або сповільнити розвиток оксидативного стресу і таким чином покращити результати кріоконсервування та підвищити клінічну ефективність препаратів. Одними з таких хімічних сполук виступають антиоксиданти, які можуть «знешкоджувати» вільні радикали ще до розвитку ефекту пошкодження біомолекул. Спираючись на аналіз літературних джерел та наші попередні дослідження по визначенню активності антиоксидантів, ми припустили, що максимально ефективним може бути внесення в кріопротекторні розчини для кріоконсервування ядровмісних, у тому числі гемопоетичних прогеніторних, клітин кордової крові людини такої біологічно активної речовини як α-токоферол або його водорозчинного аналога – тролокса.

Мета дослідження. Визначення збереженості, життєздатності та виходу живих функціонально активних гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові після кріоконсервування в розчинах, що містять різні концентрації ДМСО і тролоксу, та моделювання трансфузії *in vitro*, з метою покращення результатів кріоконсервування та забезпечення довгострокової виживаності клітин.

Матеріали та методи. Використовувалася КК людини, отримана з вени пуповини, після нормальних пологів при наявності інформованої згоди породіллі відповідно до вимог комісії з біоетики ІПКіК НАН України. Матеріал було заготовлено на консерванті «Глюгіцир». Виділення фракції ГПК із цільної КК проводили методом седиментації в поліглюкіні (6%-й розчин декстрану) з молекулярною вагою 60000). У роботі застосовували антиоксидант тролокс у концентраціях 5; 10; 20; 30; 50; 70 та 200 мкМ. Після внесення до суспензій клітин відповідних концентрацій антиоксиданту проводили їх обробку 25%-м розчином ДМСО до кінцевих концентрацій у пробі 2,5; 5; 7,5%. Кріоконсервування проводили зі швидкістю 1°С в хвилину до -80°С на програмному заморожувачі з наступним зануренням до рідкого азоту. Відтавання здійснювали при 37÷40°С на водяній бані. Моделювання трансфузії *in vitro* проводили шляхом перенесення у співвідношенні 1:10 суспензії деконсервованих ГПК у розчин Хенкса (pH 7,4) при підтриманні температури 37ºС протягом однієї години. Підрахунок клітин у пробах проводили в камері Горяєва згідно зі стандартною методикою. Життєздатність ГПК оцінювали за стандартним ISHAGE протоколом з використанням моноклональних антитіл CD45FITC, CD34PE і ДНК-барвника 7-аміноактиноміцину D (7AAD) методом протокової цитофлуориметрії.

Результати та обговорення. Аналіз збереженості ГПК КК після кріоконсервування в розчинах з різною концентрацією ДМСО і тролоксу та

моделювання трансфузії *in vitro* протягом години виявив, що у пробах, які містили 2,5% ДМСО, збереженість клітин була мінімальною і складала близько 25% в контролі та до 37% в пробах з антиоксидантом. Не зважаючи на наднизьку концентрацію кріопротектора внесення тролоксу підвищувало збереженість клітин в даних експериментальних умовах, при цьому значущі відмінності спостерігалися в пробах, що містили 50-200 мкм тролоксу. Збереженість в цих зразках досягала 38%. Збільшення концентрації кріопротектору до 5% у середовищі заморожування викликало підвищення збереженості практично у 2 рази у порівнянні з 2,5% ДМСО: у контролі даний показник становив до 54%, а при додаванні тролоксу - до 63%. Значущі відмінності фіксувалися вже при концентрації антиоксиданту у пробі 20 мкм. Максимальний ріст збереженості на 22% був у пробах, що містили 50-70 мкм тролоксу. У пробах, кріоконсервованих з 7,5% ДМСО, спостерігалася максимальна збереженість: у контролі вона була близько 60%, а при внесенні тролоксу в концентраціях 50-200 мкМ цей показник сягав 74% (підвищення складало близько 20%). Можна також відзначити, що збереженість ГПК в пробах з 5% ДМСО та тролоксу була навіть вища за контрольні значенням з 7,5% ДМСО, що дає підґрунтя для розробки кріозахисних середовищ зі зниженим вмістом ДМСО.

Аналіз життєздатності ГПК КК методом протокової цитофлуориметрії з використанням ДНК барвника 7-AAD не виявив достовірних змін серед усіх досліджуваних експериментальних груп. Життєздатність клітин складала від 72 до 80%. Оскільки ці результати не дають повного уявлення про кількість живих клітин, які зберігаються у пробах після процедури кріоконсервування та подальшого моделювання трансфузії *in vitro* та не враховують збереженість клітин, було проведене визначення виходу живих $CD34^{+}7AAD^{-}$- клітин. Даний підхід дозволяє враховувати як їх відносну життєздатність, мова про яку була вище, так і абсолютну кількість клітин у пробі. Аналіз виходу живих ГПК після кріоконсервування у розчинах з 2,5% ДМСО і тролоксом та годинної інкубації у розчині Хенкса виявив тенденцію до підвищення даного показника, починаючи з 20 мкМ. Максимальний вихід клітин до 28% спостерігався у пробах, що містили 50-70 мкМ антиоксиданту. Вихід живих ГПК у пробах, кріоконсервованих з 5% ДМСО, був у 1,6-1,8 разів вище у порівнянні з 2,5% ДМСО. Достовірне підвищення спостерігалося у зразках, що містили 50-200 мкМ тролоксу. Максимальні показники виходу (до 45%) були у зразках, що містили 70 мкМ. Значущий ефект від внесення тролоксу спостерігався в зразках, що містили 7,5% ДМСО та 50-70 мкМ антиоксиданту. У цих пробах вихід живих