**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**
**Державний біотехнологічний університет**
**Рейн-Ваальський університет прикладних наук, Німеччина**
**Університет аграрних наук, м. Уппсала, Швеція**
**Природничий дослідницький центр, м. Вільнюс, Литва**
**Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна**
**Національний аерокосмічний університет ім. М.Є. Жуковського**
**«Харківський авіаційний інститут»**
**Львівський національній університет ветеринарної**
**медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького**
**КЗ «Харківський зоологічний парк»**

# АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ, ЕКОЛОГІЇ ТА ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ

МАТЕРІАЛИ МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ

*27-28 квітня 2023 р.*

Харків
ДБТУ
2023

## ОРГАНІЗАЦІЙНИЙ КОМІТЕТ

**Михайлов В.М. –** доктор технічних наук, професор, заслужений діяч науки і техніки, лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки, проректор з наукової роботи Державного біотехнологічного університету (ДБТУ) (голова оргкомітету);
**Щербак О.В. –** кандидат с.-г. наук, професор, декан факультету біотехнологій ДБТУ (співголова оргкомітету);
**Безуглий М.Д. –** доктор с.-г. наук, професор, академік НААНУ, зав. кафедри біотехнології, молекулярної біології та водних біоресурсів ДБТУ (співголова оргкомітету);
**Йоахим Фенстерле –** професор, доктор, Рейн-Ваальський університет прикладних наук, Німеччина;
**Давиденко К.В. –** доктор, науковий співробітник відділу мікології лісу та фітопатології, Університет аграрних наук, м. Уппсала, Швеція;
**Дайва Бурокієне –** професор, ст. наук. співробітник, завідувач лабораторією хвороб рослин, Природничий дослідницький центр, Литва
**Головань Л.В. –** кандидат с.-г. наук, доцент, завідувач кафедри екології та біотехнології в рослинництві ДБТУ;
**Гноєвий І.В. –** доктор с.-г. наук, професор кафедри біотехнології, молекулярної біології та водних біоресурсів ДБТУ;
**Бузіна І.М. –** кандидат с.-г. наук, доцент кафедри екології та біотехнологій в рослинництві ДБТУ.

*Конференцію включено до Переліку міжнародних, всеукраїнських науково-практичних конференцій науковців, молодих учених і здобувачів вищої освіти у 2023 році згідно листа ІМЗО МОН України від 19.01.2023 №21/08-53.*

**Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування** [Електронний ресурс]: матеріали Міжнар. наук. конф., 27-28 квітня 2023 р. / Держ. біотехнол. ун-т. – Х., 2023. – Електронні текстові дані. – Режим доступу: http://btu.kharkov.ua/nauka/konferentsiyi/

У збірнику подано теоретичні й практичні результати досліджень і розробок досвідчених учених та молодих науковців, аспірантів, співробітників організацій і підприємств. Матеріали конференції призначено для викладачів, студентів, наукових співробітників, фахівців у галузі біотехнології, екології, тваринництва, рибництва, стратегії сталого розвитку та збалансованого природокористування регіонів, геоінформаційних технологій моніторингу, моделювання та прогнозування екологічного стану територій, водних біоресурсів та аквакультури, історії біотехнології, екології та аквакультури.

Видано в авторській редакції.

© Державний біотехнологічний університет, 2023

3. Elzinga K.G. // Craft Beer in the United States: history, numbers, and geography. Journal of Wine Economics. 2015. 10:242-274.
4. Klepetko B. //Pivní kultura v Česku. 2020. 24.
5. Pulec J. // Integration of the Czech Brewing Industry into Global Production Networks. 2016. 51(1): 47–59.

## ТРОЛОКС ЯК ФАКТОР ПІДВИЩЕННЯ ЗБЕРЕЖЕНОСТІ ТА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ГЕМОПОЕТИЧНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ З ДМСО

П.М. Зубов, О.Л. Зубова, Л.О. Бабійчук

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України
pmzubov@gmail.com

У теперішній час ефективність використання гемопоетичних прогеніторних клітин (ГПК) кордової крові (КК) людини для лікування різних захворювань, у тому числі важких, не викликає жодних сумнівів [1]. Підвищення застосування ГПК у клінічній практиці потребує розширення обсягів виготовлення препаратів, що обумовлює проведення комплексних досліджень, спрямованих на подальшу розробку ефективних технологій кріоконсервування та довгострокового зберігання клітин. Загальноприйнятим кріопротектором для кріоконсервування ядровмісних (ЯВК), у тому числі і гемопоетичних прогеніторних, клітин кордової крові є ДМСО у концентраціях 7,5–10%. Відомо, що під впливом температурно-осмотичних факторів, які діють на клітини під час кріоконсервування, відбувається порушення оксидантно-антиоксидантної рівноваги, що викликає гіперутворення активних форм кисню (АФК) та, як наслідок, загибель клітин [2]. Для запобігання накопиченню АФК у клітинах перспективним напрямком може бути додавання в кріозахисне середовище антиоксидантів, одним з яких є водорозчинний аналог вітаміну Е – тролокс [3]. У зв'язку з цим метою роботи було проведення досліджень щодо визначення структурно-функціональних характеристик ГПК, заморожених у кріопротекторних розчинах, що містять різні концентрації ДМСО та тролоксу.

Для досліджень використовували КК людини. Фракцію ЯВК КК виділяли методом седиментації в поліглюкіні. Антиоксидант тролокс застосовували у концентраціях 20; 30; 50; 70 та 200 мкМ. Обробку ЯВК КК кріопротектором ДМСО проводили до кінцевих концентрацій у пробі 2,5; 5 та 7,5%. Зразки кріоконсервували у програмному заморожувачі зі швидкістю 1–3 град/хв до -80°С з наступним зануренням у рідкий азот (-196°) [4]. Абсолютну кількість лейкоцитів підраховували у камері Горяєва. Відсоток та життєздатність $CD34^+$-клітин оцінювали за стандартним ISHAGE протоколом [5]. Результати вимірювань оцінювали за допомогою програмного забезпечення CELLQuest Pro (BD, США).

Аналіз кількості збережених ГПК після кріоконсервування у розчинах, що містять різну кількість ДМСО та тролоксу, виявив значущу залежність між кріопротекторними концентраційними рядами: мінімальною ця кількість була у пробах, заморожених з 2,5% ДМСО, а максимальною – з 7,5%. Не зважаючи на наднизьку концентрацію кріопротектора (2,5%), внесення тролоксу сприяло підвищенню збереженості клітин в усіх експериментальних групах. При цьому значущі відмінності спостерігалися в пробах, що містять 50–200 мкМ тролоксу. Максимальна збереженість була в пробах, що містять 70 мкМ антиоксиданту. В цих зразках зберігалося на 27% більше клітин, ніж в контрольній групі без антиоксиданту. В пробах, кріоконсервованих з 5% ДМСО, також спостерігалося зростання збереженості: якщо при концентраціях 5–10 мкМ тролоксу в пробах можна говорити про тенденцію, то починаючи зі зразків, що містили 20 мкМ антиоксиданту, були значущі відмінності. Максимальною збереженість була в пробах, які містили 70 мкМ тролоксу

(значуще підвищення на 15% у порівнянні з контрольними пробами). Найвищим показник збереженості був у пробах, що містили у складі кріопротекторного середовища 7,5% ДМСО. Якщо в контролі збереженість складала (81,4±2,9)%, то при внесенні тролоксу, в залежності від його концентрації, цей показник був 85–92%. Максимальна збереженість спостерігалася в пробах з 70 мкМ тролоксу.

Аналіз життєздатності ГПК виявив чіткі закономірності динаміки змін даного показника залежно від концентрації ДМСО, використаного для заморожування, і значно меншою мірою тролоксу: мінімальні показники спостерігалися в пробах, кріоконсервованих з 2,5% ДМСО (48-55%), і максимальні – з 7,5% (близько 69–73%). У пробах, що містили 5% ДМСО цей показник займав проміжне значення і становив 62–66%. Слід вказати на значущі відмінності між концентраційними рядами ДМСО. Детальний аналіз життєздатності у зразках в межах однієї концентрації ДМСО виявив лише тенденцію до підвищення з ростом концентрації тролоксу в пробах.

Слід зауважити, що такий показник, як життєздатність клітин, характеризується своєю відносністю, оскільки в кожному зразку будь яка кількість клітин, що залишилися в пробі, приймається за 100%. При цьому кількісні показники, зокрема абсолютна кількість клітин, при даному аналізі не приймалася до уваги. А оскільки нами було проведено визначення абсолютної кількості клітин в усіх експериментальних зразках та підрахунок відсотка життєздатних $CD34^{+}7AAD^{-}$-клітин, тому для максимально об'єктивного аналізу ефективності обраних концентрацій антиоксиданту в роботі було проведено визначення виходу життєздатних ГПК після заморожування-відігрівання. Це дозволить виділити ефективні кріопротекторні розчини, які здатні стабілізувати клітини та підвищувати їх стійкість до факторів кріоконсервування. І в першу чергу це стосується гемопоетичних прогеніторних клітин, оскільки саме вони здійснюють проліферативну та відновлювальну активність, а клітини лейкоцитарного ряду виконують функцію мікрооточення, забезпечуючи ГПК необхідними біохімічними сигналами, потенціюючи та регулюючи їх дію.

Аналіз виходу живих ГПК в пробах, що містили 2,5% ДМСО та тролокс в різних концентраціях, виявив, що даний показник в цих групах був найнижчим: в контролі складав (26,4±0,5)%, проте в пробах, що містили тролокс відзначалося підвищення виходу. Причому значущими ці відмінності були вже в пробах, що містили 20 мкМ тролоксу. Максимальний вихід живих клітин був у зразках, що містили 50 мкМ. В цих пробах збереженість була вищою на 30% у порівнянні з контрольними значеннями. У зразках, які кріоконсервували з 5% ДМСО, вихід живих клітин різко зростав у порівнянні з пробами, що оброблялися та заморожувалися у 2,5%-вмісному середовищі. І цей ріст був 1,8-кратним. Внесення антиоксиданту в концентрації 30 мкМ призводило до значущого збільшення виходу живих ГПК на 15,4%. Найефективнішими виявилися кріопротекторні розчини, що містили тролокс в концентрації 70 мкМ. В цих пробах вихід живих ГПК збільшувався на 26,0%. Максимальним вихід був у пробах з 7,5% ДМСО. Внесення антиоксиданту викликало достовірне збільшення цього параметра, починаючи з 20 мкМ. Максимальні зміни спостерігалися в пробах, що містили 70мкМ тролоксу (підвищення на 26,3% у порівнянні з контролем).

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що використаний в роботі водорозчинний аналог вітаміну Е – тролокс сприяє підвищенню збереженості та життєздатності гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові людини. Кріоконсервування $CD34^{+}$-клітин в розчинах, що містять 7,5% ДМСО та тролокс у концентраціях 50 або70 мкМ, забезпечує вихід живих клітин після розморожування, що становить до 75% по відношенню до їх вихідного рівня. Слід також відзначити, що вихід живих $CD34^{+}$-клітин після кріоконсервування з 5% ДМСО та тролоксом був на рівні даних, отриманих із оптимальними концентраціями ДМСО (7,5%), до яких не було додано антиоксидант. Ці результати показують можливість зниження концентрації кріопротектора без погіршення якості препаратів.