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

Zittle, Brown 1991; 1334.

2. Блатун Л. А. Местное медикаментозное лечение ран. Проблемы и новые возможности их решения / Л. А. Блатун // Consilium-medicum. - 2007. - №1 - Т. 9. - С. 4 - 11.

3. Аналіз фармацевтичного ринку лікарських засобів групи D06 Антибіотики і хіміотерапевтичні препарати для застосування в дерматології / В. В.Руденко, О. П.Шматенко, Р. Л.Притула, Т. М.Максимук. - Вісник Фармації. - №4 (72), 2012. - С. 66 - 70.

4. Паршина В. Л. Профилактика и лечение гнойно-септических заболеваний кожи, подкожной клетчатки и пупочной ранк в практике неонатальной реанимации / В. Л. Паршина // Consilium Medicum (Педиатрия) − № 1 (9), 2007- С. 4 - 8.

УДК 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

НОВІ ПІДХОДИ ДО КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

Макашова О.Є., Зубова О.Л., Зубов П.М., Михайлова О.О., Бабійчук Л.О.
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

Вступ. У зв'язку з пошуками нових шляхів вирішення проблеми замісної терапії з використанням стовбурових клітин увагу біологів і клініцистів привернула здатність гемопоетичних прогеніторних клітин (ГПК) кордової крові (КК) людини давати початок різним типам спеціалізованих соматичних клітин під впливом ряду індукуючих ростових факторів і зберігати цю здатність після тривалого кріоконсервування [2]. Всезростаюча увага з боку вчених і лікарів до використання КК призвела до необхідності створення банків, у яких зразки зберігаються в замороженому стані за температури -196°С протягом практично необмеженого часу без втрати їх біологічних властивостей. Проте невеликі об'єми кожної дози КК та неможливість повторного забору потребують застосування оптимального методу кріоконсервування з метою збереження максимальної кількості функціонально активних клітин після розморожування. Перспективним напрямком на сьогоднішній день може бути додавання до середовища кріоконсервування ГПК КК антиоксидантів, які здатні знижувати інтенсивність оксидативного стресу на всіх етапах кріоконсервування [3] і таким чином підвищувати кількість збережених та функціонально активних клітин після розморожування. Виходячи з того, що важливою складовою антиоксидантного захисту є система глутатіону, в нашій роботі при кріоконсервуванні було використано окрім кріопротектору ДМСО, саме цю речовину.

Таким чином, **метою** даної роботи було визначення збереженості та життєздатності гемопоетичних прогеніторних клітин після кріоконсервування з ДМСО та глутатіоном, а також після перенесення до умов, що моделюють фізіологічні.

Матеріали досліджень. У роботі використовували КК людини, збір якої проводили після отримання інформованої згоди у вагітної, з попереднім

проведенням ретельного допологового скринінгу на наявність протипоказань до донорства. Ексфузію крові здійснювали закритим шляхом у систему для забору крові з 25 мл антикоагулянту з пупкової вени під час природних пологів після народження дитини й відділення її від плаценти. Виділення фракції ЯВК із цільної КК проводили методом седиментації в поліглюкіні (6%-й розчин декстрану (ОАО «Біофарма», Україна) з молекулярною масою 60000). У клітинну суспензію вносили 25%-й розчин ДМСО до кінцевих концентрацій у зразку 5; 7,5 та 10%. Суспензії клітин обробляли кріопротектором за температури 0...4°С крапельним шляхом при постійному перемішуванні. У роботі використовували глутатіон (GSH) («Sigma-Aldrich», США) у кінцевій концентрації 1 та 3 мМ, який перед кріоконсервуванням вносили в зразки. Зразки кріоконсервували в програмному заморожувачі («Cryoson», Німеччина) зі швидкістю 1–3 град/хв до –80°С із наступним зануренням у рідкий азот (–196°С). Відігрівання здійснювали за температури 37–40°С на водяній бані при постійному погойдуванні до зникнення твердої фази. Для оцінки кількості $CD34^+$-клітин і їх життєздатності використовували стандартний ISHAGE протокол [1]. Для цього до 50 мкл суспензії клітин додавали 10 мкл антитіл, що містить FITC-мічений CD45 і PE-мічений CD34 («BD», США), та 10 мкл ДНК-барвника 7-аміноактиноміцина D (7AAD) [5]. Перемішували і інкубували 15 хв за кімнатної температури в темряві. Зразки аналізували на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur фірми Becton Dickinson («BD», США). Для мінімізації похибки збір даних проводився до моменту накопичення не менше 200 $CD34^+$-клітин. Результати вимірювань оцінювали за допомогою програмного забезпечення фірми «BD» – «CELLQuest Pro».

Абсолютну кількість клітин підраховували в камері Горяєва згідно зі стандартною методикою. Збереженість клітин визначали як відсоток кількості клітин у досліджуваному зразку по відношенню до початкової їх кількості до будь-якого впливу (інкубація з кріопротектором, заморожування-відігрів). Абсолютну кількість ГПК в зразках визначали як добуток абсолютної кількості ЯВК на відсоток ГПК, визначений методом проточної цитофлуориметрії.

Для визначення відстроченої загибелі частину клітин після розморожування переносили до розчину Хенкса у співвідношенні 1:10 й інкубували при 37°С протягом години. Після цього визначали збереженість, життєздатність у клітинах методом проточної цитофлуориметрії.

Статистичну обробку результатів проводили методом Стьюдента-Фішера з використанням програми «Excel» («Microsoft», США) після встановлення нормальності розподілу. Дані представляли як $M \pm m$. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Основні результати. Найбільш небезпечними етапами для клітин є стадії безпосереднього заморожування та розморожування. Крім втрати кількості клітин, яка спостерігається вже на етапі виділення та еквілібрації з ДМСО, процес кріоконсервування здатний викликати порушення структурно-функціональних властивостей $CD34^+$-клітин, що в подальшому може призвести як до пошкодження цих клітин, так і до їх загибелі. Тому основним завданням кріобіологів під час розробки технологій кріоконсервування є мінімізація

факторів, які призводять до розвитку патологічних і незворотніх процесів у клітинах, з метою покращення результатів кріоконсервування. Виходячи з цього, завданням нашої роботи було оцінити ефективність кріоконсервування ГПК КК у кріозахисних розчинах, які містять різні концентрації ДМСО та глутатіон.

Аналіз збереженості $CD34^+$-клітин після кріоконсервування продемонстрував зниження цього показника порівняно з даними, отриманими до кріоконсервування. Найбільші втрати $CD34^+$-клітин були в зразках, кріоконсервованих під захистом 5% ДМСО, де збереженість була на рівні 70,1±2,4, що вказує на недостатню концентрацію кріопротектора. Застосування ДМСО у концентрації 7,5 та 10% сприяло збереженню 78,3±3,1 та 79,1±2,9% $CD34^+$-клітин. При цьому рівень життєздатності в даних зразках був на рівні 80%.

Аналіз кріоконсервованих ГПК кордової крові показав, що додавання глутатіону (рис. 1) сприяло значному підвищенню їх збереженості порівняно з даними, отриманими без додавання антиоксиданту. Застосування глутатіону в концентрації 1 та 3 мМ підвищувало збереженість ГПК у зразках із ДМСО в концентраціях 7,5% і 10% ДМСО до 90-93% після кріоконсервування, що на 15-20% більше порівняно з контрольними даними.

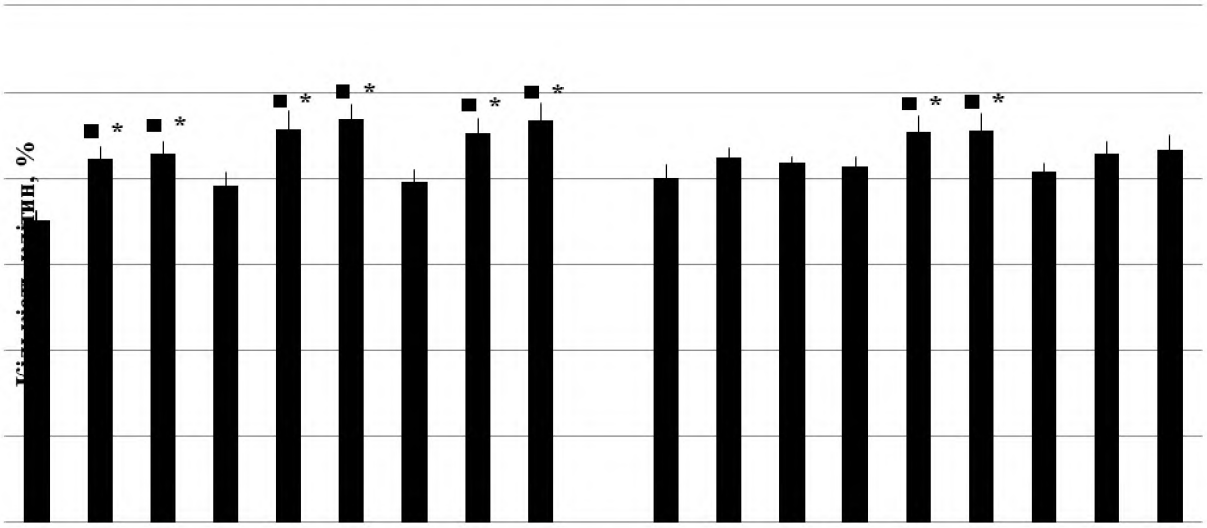


Рисунок 1. Збереженість та життєздатність $CD34^+$-клітин кордової крові після кріоконсервування в розчинах ДМСО та глутатіону різної концентрації, %

Примітка: Дані представлено у відсотках, у вигляді M±SE. * – різниця статистично значуща по відношенню до контрольних значень без додавання антиоксиданту; $p<0,05$.

Аналіз життєздатності ГПК (рис. 1), кріоконсервованих із додаванням глутатіону, продемонстрував збільшення кількості життєздатних $CD34^+$-клітин у зразках із 7,5% ДМСО до 91,2%. В усіх інших зразках можна говорити про тенденцію до збільшення життєздатності ГПК після кріоконсервування.

Як показали наші попередні результати під час кріоконсервування ГПК КК зазнають значного стресорного впливу, в результаті чого відбувається

накопичення високих концентрацій активних форм кисню, які, як свідчать літературні дані [4], можуть ініціювати розвиток апоптозу та загибель клітин як до, так і після кріоконсервування. Існує також теорія, що в процесі кріоконсервування клітини отримують певні сигнали, які роблять їх «схильними» до розвитку апоптозу, але не ініціюють його розвиток у цей момент. У зв'язку з цим, для підвищення терапевтичної ефективності препаратів кордової крові важливим завданням є не тільки проведення їх оцінки відразу після розморожування, а й визначення відстроченого виживання клітин після перенесення до фізіологічних умов. Тому, на наступному етапі нами була проведена оцінка відстроченої загибелі клітин після розморожування. Для цього в експерименті ми застосували просту модель, відтворюючи лише основні принципи трансфузії: розведення деконсервованої клітинної суспензії, яке відбувається природним чином у кровоносному руслі реципієнта, ізоосмотичність середовища та температуру інкубації (37°С). Підтримання температури 37°С протягом усього періоду інкубації клітин - важливий фактор, що дозволяє виявити порушення метаболізму, оскільки збереження клітин в умовах більш низьких температур маскує можливий дисбаланс у клітинному метаболізмі в силу уповільнення практично всіх процесів зі зниженням температури.

Таким чином, оцінка ефективності кріоконсервування ЯВК КК у розчинах, що містять різні концентрації ДМСО та глутатіон, після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні показала, що у зразках із ДМСО у концентрації 5% спостерігалося зниження збереженості та життєздатності у 2 рази, порівняно з даними після розморожування. Найбільш захищеними виявилися клітини, кріоконсервовані з ДМСО у концентрації 7,5 та 10%. За даних концентрацій зниження показників збереженості та життєздатності було менш вираженим, хоча й значуще нижчим на 20% порівняно з даними відразу після кріоконсервування.

Кріоконсервування $CD34^+$-клітин з глутатіоном забезпечувало більші показники збереженості та життєздатності після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні (рис. 2). Ефективні концентрації глутатіону (1 та 3 мМ) у комбінації з ДМСО в концентрації 7,5 або 10% зберігали до 85% $CD34^+$-клітин, що на 25% більше порівняно з контролем та підвищували кількість життєздатних клітин на 15%.

Висновки. Таким чином отримані результати свідчать про позитивний вплив глутатіона на збереженість та життєздатність ГПК як відразу після розморожування так і перенесення до умов, що моделюють фізіологічні, та можуть стати передумовою до вдосконалення існуючих методів кріоконсервування даних клітин.

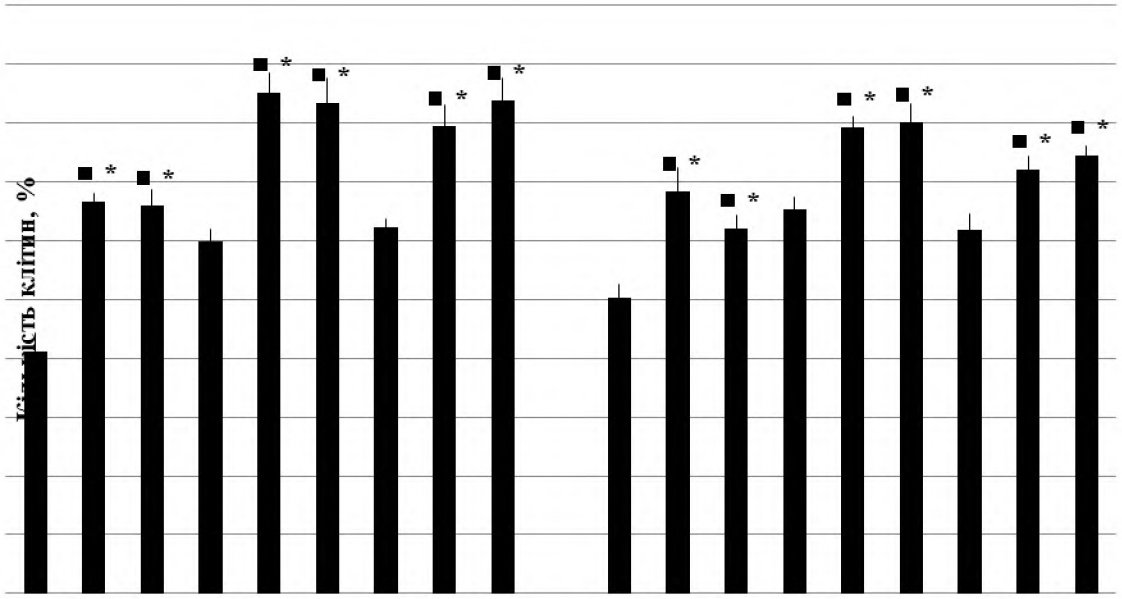


Рисунок 2. Збереженість і життєздатність $CD34^+$-клітин кордової крові, кріоконсервованих в розчинах ДМСО та глутатіону різної концентрації, після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні, %

Примітка: Дані представлено у відсотках, у вигляді M±SE. * – різниця статистично значуща по відношенню до відповідних контрольних значень без додавання антиоксиданту; $p < 0,05$

Перелік літератури

1. Keeney M., Chin-Yee I., Weir K., at al. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell count based on the ISHAGE guidelines // Cytometry.- 1998.- V. 34, № 2.- P.61-70.
2. Kekre N., Antin J.H. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist // Blood.- 2014.- V. 124, № 33.- P. 34-43.
3. Rushworth G.F., Megson I.L. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits // Pharmacol Ther.- 2014.- V. 141, № 2.- P. 150-159.
4. Thannickal V.J., Fanburg B.L. Reactive oxygen species in cell signaling // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.- 2000.- V. 279, № 6.- P. L1005-1028.
5. Zembruski N.C., Stache V., Haefeli W.E., at al. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry // Anal Biochem.- 2012.- V. 429, № 1. P. 79–81.

УДК 543.422.3:[615.453.6:615.217.2].074

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАРВЕДІЛОЛУ В ТАБЛЕТКАХ «КАРВЕДІЛОЛ»

Малецька О.Р., Васюк С.О.

Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, Україна

Вступ. Карведілол ((±)-[3-(9Н-карбазол-4-ілоксі)-2-гідроксипропіл][2-(2-метоксіфеноксі)етил]амін) – синтетичний лікарський препарат, що відноситься