

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 заморозувачі зі швидкістю 1–3 град/хв до -80°C 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 зберігалось на 27% більше клітин, ніж в контрольній групі без антиоксиданту. В пробах, кріоконсервованих з 5% ДМСО, також спостерігалось 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 $(81,4 \pm 2,9)\%$, 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 $(26,4 \pm 0,5)\%$, 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 70 мкМ 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 або 70 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.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kekre N., Antin J. // Blood. 2014. 124(3):334–43.
2. Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. // Cell Signal. 2012. 24(5):981–90.
3. Varo-Ghiuru F., Miclea I., Hettig A. // Cryo Letters. 2015. 36(1): 1–7.
4. Бабійчук Л.О., Грищенко В.І., Гуріна Т.М., та ін. // Патент України № 92227. 2010.
5. Murugesan M., Nair C.K., Nayanar S.K. // Asian J. Transfus. Sci. 2019. 13(1): 43–6.

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ АНТИМІКРОБНИХ КОНСЕРВАНТІВ

О.П. Стрілець, Л.С. Стрельников

Національний фармацевтичний університет
oksanastr1970@gmail.com

М'які лікарські засоби, як і будь-які продукти, що містять воду та суміш органічних і неорганічних сполук, потребують захисту від мікробного забруднення, щоб гарантувати безпеку для пацієнта та забезпечити якість під час використання і зберігання засобу. Це забезпечується хімічними, фізичними або фізико-хімічними стратегіями. Найпоширеніша стратегія ґрунтується на застосуванні антимікробних засобів, що можуть бути синтетичними, природними сполуками чи навіть багатофункціональними інгредієнтами. Консерванти, які широко застосовують у фармацевтичній технології м'яких лікарських засобів: метилпарагідроксибензоат (E218), пропілпарагідроксибензоат (E216), натрію метилпарабен (E219), натрію пропілпарабен (E217), етил парагідроксибензоат (E214), калію сорбат (E202), натрію сульфат безводний (E221), спирт бензиловий, бензалконію хлорид, хлоргексидину глюконат, феноксіетанол, кислота сорбінова, цетримід, цетилпіридинію хлорид, хлоралгідрат, хлоркрезол. Ці хімічні агенти мають різні механізми протимікробної дії залежно від хімічної структури та реакційної здатності функціональної групи. Консерванти діють на кілька клітинних мішеней, їх використання у високих концентраціях є ефективнішим для збереження продукту, але може бути і потенційно токсичним для пацієнта, а при низьких концентраціях може розвиватись мікробна резистентність [1, 2]. Тому питанню щодо обґрунтування концентрації антимікробних речовин у складі лікарських засобів приділяють особливу увагу. Мікробне забруднення може виникнути під час виробництва (первинне забруднення) та/або під час використання (вторинне забруднення). Ідеальна система застосування антимікробних консервантів повинна захищати продукт від мікробної деградації в закритому пакуванні до використання та у відкритому пакуванні протягом усього терміну використання. Усі потенційні джерела забруднення мають бути ідентифіковані та контрольовані. Один з етапів фармацевтичної розробки, коли закладається стратегія захисту фармацевтичного препарату від мікробного забруднення, – обґрунтування необхідності використання антимікробних речовин і визначення їх оптимальних концентрацій [3]. На кафедрі біотехнології Національного фармацевтичного університету була здійснена робота з обґрунтування вибору консерванта та його концентрації у складі гелю з фітокомплексом для лікування дерматологічних захворювань.

Мета. Обґрунтування вибору консерванта та його оптимальної концентрації під час розробки складу гелю з фітокомплексом для забезпечення мікробіологічної стабільності.

Методика. Як об'єкти досліджень використовували 6 зразків гелю з фітокомплексом (екстракт чабрецю, кропиви, горіха) з додаванням одного з обраних для дослідження консервантів (Euxyl 9010K, метилпарагідроксибензоат, кислота сорбінова, калію сорбат, кислота бензойна), контрольний зразок був без консерванту. Концентрації антимікробних речовин були обрані як такі, що відповідають їхньому середньому значенню від діапазону