ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТА КЛІНІЧНОЇ МЕДИЦИНИ ХНМУ
КАФЕДРА БІОХІМІЇ ХНМУ

Збірник тез
Науково-практичної онлайн-конференції з міжнародною участю «Проточна цитометрія в експериментальній та клінічній медицині»

29-30 квітня 2021 року
м. Харків, Україна

MINISTRY OF HEALTH OF UKRAINE
KHARKIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY
RESEARCH INSTITUTE OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL MEDICINE OF KhNMU
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

Abstract book
of the 1st Flow Cytometry in Experimental and Clinical Medicine Conference with International Participation

April 29-30, 2021
Kharkiv, Ukraine

УДК 57.083.34:543.4:616-076.5(082)

Рекомендовано до друку Вченою радою
Харківського національного медичного університету
Протокол №5 від 22 квітня 2021 р.

За редакцією проф. М'ясоєдова В.В., доц. Ткаченка А.С., проф. Наконечної О.А.

Редакційна колегія: д.мед.н., проф. М'ясоєдов В.В., к.мед.н., доц. Ткаченко А.С., д.мед.н., проф. Наконечна О.А., к.мед.н. Оніщенко А.І., д.мед.н., проф. Чумаченко Т.О., д.мед.н., проф. Макєєва Н.І., д.мед.н., проф. Бутов Д.О., д.хім.н. Посохов Є.О., к.мед.н., с.н.с. Прокопюк В.Ю., к.мед.н., проф. ХНМУ Ткаченко В.Л.

Відповідальний секретар: к.мед.н. Оніщенко А.І.

Проточна цитометрія в експериментальній та клінічній медицині: Збірник тез Науково-практичної онлайн-конференції з міжнародною участю (Харків, 29-30 квітня 2021 р.) / за ред. В.В. М'ясоєдова, А.С. Ткаченка, О.А. Наконечної. – Харків: ХНМУ, 2021. – 32 с.

У збірнику містяться матеріали першої Науково-практичної онлайн-конференції з міжнародною участю «Проточна цитометрія в експериментальній та клінічній медицині», яка відбулася у Харківському національному медичному університеті 29-30 квітня 2021 р. Метою конференції є обмін передовим вітчизняним та світовим досвідом й обговорення сучасних досягнень у проточній цитометрії. В програмі конференції ознайомлення з новітніми результатами фундаментальних та прикладних досліджень у сфері проточної цитометрії; обговорення принципів розробки та впровадження міжнародних стандартів в області проточної цитометрії; встановлення контактів між вченими та клініцистами з метою налагодження співпраці.

Надіслані до Оргкомітету тези публікуються без редакторської коректорської правки, відповідальність за зміст несуть автори.

INVESTIGATION BY FLOW CYTOPHLUORYMETRY OF THE STATE OF RAT HEPATOCYTES UNDER THE INFLUENCE OF XENOBIOTICS IN A SUBACUTE EXPERIMENT

A.I. Bezrodna
Kharkiv National Medical University
Biochemistry Department

Xenobiotics (XB) are foreign substances to the body that have a wide range of chemical properties, thanks to which their use in industry and everyday life is an integral part of modern society. Therefore, all living organisms today have an anthropogenic load of xenobiotics, and therefore the system of their metabolism is under constant stress, which leads to changes in the functioning of major organ systems, including the liver.

The aim - to investigate the condition of rat hepatocytes under the influence of xenobiotics in subacute experiment by means of flow cytofluorimetry.

Materials and methods. The study was performed on 40 white rats of both sexes of the WAG line lasting 45 days. Aqueous solutions of XB (ethylene glycol, polyethylene glycol and polypropylene glycol) were daily injected intragastrically at a dose of 1/10 DL_{50} using a metal gavage. On 45 day of experiment the hepatocytes were selected and were cheked by flow cytometry on a FACS Calibur flow cytometer the degree of lipid membrane asymmetry and evaluation of the apoptosis / necrosis stages. The study was conducted in the department of cryocytology of the Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine.

Results. It was found that the investigated XB at a dose of 1/10 DL_{50} led to changes in hepatocytes of experimented rats. This abnormalities attacked plasma membrane (PM) of hepatocytes. It was diagnosed the asymmetry of the distribution of phospholipids in the PM and imbalance in the asymmetry of the distribution of phospholipids in the PM of hepatocytes.

The distribution of phospholipid phosphatidylserine underwent special changes, in particular, were detected its migration from the inner layer into the outer layer of experimented rats. It was also found that this percentage of phosphotidylserine conversions depended on the type of xenobiotic. Therefore, the degree of cell death of hepatocytes (apoptosis-necrosis) also depends on the type of xenobiotic.

Conclusion. The method of flow cytofluorimetry should be used for subacute experiment. Rat hepatocytes underwent changes under the influence of xenobiotics, which was detected of flow cytofluorimetry.

Flow Cytometry using areas in Turkey

Umut Kökbaş
Medical Biochemistry Department, Nevsehir Haci Bektas Veli University,
Nevsehir, Turkey

Background: Response of cells to be detected using biochemical and physical properties of the microscope for many years the primary specifications have been used for flow cytometry techniques. Flow cytometry is a technique and apparatus based on a single pass along the flow channel and the basis for classification based on cell size and granularity in this order as a suspension of various cells. The surface and internal proteins of cells with this equipment, organelles and other components analysis and separation, size using laser and electronic technology are performed by the granularity and fluorescence emission as basis. Flow cytometry is the basis of technical know well this technique will increase the diagnostic value of standardization and allowing us to use the results in many pathologies. Flow cytometry has a wide range of applications in medicine. Standard operating procedures are used to produce standardized and reproducible data.

Aim: In this study, we will give information about the usage areas of flow cytometry in Turkey.

Materials and methods: Number of samples analyzed in flow cytometry in the hospital with medical schools in Turkey were investigated.

Results: As a result, flow cytometry is used in many areas in the field of diagnosis in Turkey, but most are used for cancer diagnosis.

Conclusion: Flow cytometry is not used as the basic method of analysis in Turkey. It is applied within the scope of advanced examination to patients who cannot be diagnosed with a definite diagnosis. Therefore, it is mostly used in cancer diagnosis.

Flow cytometric determination of diabetes-related and RANK-mediated oxidative damage to bone marrow cells and evaluation of the effect of vitamin D_3 treatment

A.O. Mazanova, O.O. Lisakovska, O.O. Makarova, I.O. Shymanskyi, M.M. Veliky
Department of Biochemistry of Vitamins and Coenzymes, Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine (NASU), Kyiv, Ukraine

Introduction: One of the side effects of type 1 diabetes (T1D) is secondary osteoporosis, which develops due to imbalance of osteoblasts/osteoclasts interaction. The cytokine system of the nuclear factor κB receptor-activator (RANK)/RANK ligand (RANKL)/osteoprotegerin plays a key role in bone remodeling and is expressed on osteoblasts and bone marrow (BM) osteoclast precursors. The hormonal form of vitamin D_3 is a powerful regulator of this cytokine systems. According to the WHO, a pandemic of vitamin D_3 deficiency around the world is currently observed. More than 90% of T1D patients are deficient in vitamin D_3 and are at risk of osteoporosis.

Aim: Using flow cytometry to determine the relationship between diabetes-associated impairment of RANK synthesis in BM cells, the development of oxidative stress and apoptotic/necrotic cell death, as well as to assess the ameliorative effect of cholecalciferol.

Materials and methods: T1D was induced in Wistar mail rats by single i.p. STZ injection (55 mg/kg b.w.). Diabetic animals were treated with or without vitamin D_3 (600 IU/kg b.w., per os, 30 days). The 25OHD level was measured by ELISA. The level of RANK-positive BM cells was determined using specific anti-RANK antibodies; ROS generation was investigated with DCF-DA, apoptotic cell death was assessed using Annexin-V-EGFP, necrotic – by propidium iodide. The studies were carried out on a flow cytometer COULTER ® EPICS ® XL.

Results: T1D resulted in a 40% decrease in blood 25OHD and was accompanied by a 16% increase in RANK-positive BM cells vs. controls. Diseased animals showed an increase in ROS generation (1.4-fold), significant reduction of annexin V-$EGFP^+$ (by 15%) and elevation of PI^+ (by 8%) BM cells. Cholecalciferol treatment led to normalization of vitamin D-status of animals with T1D and partial decrease in RANK-positive BM cells. We also found a decrease in ROS generation and restoration of the balance between apoptotic/necrotic cell death.

Conclusions: Vitamin D_3 deficiency caused by diabetes is associated with RANK-dependent ROS generation by BM cells and an imbalance in apoptotic/necrotic cell death, which can lead to the development of secondary osteoporosis. Vitamin D_3 was shown to be effective in reversing the bone remodeling disorder associated with diabetes.

FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING IN BOTTOM-UP SYNTHETIC BIOLOGY

I. Myrgorodska[1]
[1]University of Bristol, School of Chemistry, Cantock's Cl, Bristol BS8 1TS, UK

Flow cytometry is widely used in clinical practice and biomedical research. This technique analyzes single cells or particles as they flow past single or multiple lasers, thereby providing quantitative information on the distribution and number of detected entities. Aside from sorting living cells and measuring their number density flow cytometry is an equally effective tool when applied to other systems such as biomimetic microcapsules. Those micro-compartmentalized systems also called protocells are of particular interest for the field of bottom-up synthetic biology. A wide range of synthetic protocells have been constructed and used as biomimetic models of cell-free gene expression enzyme activity in crowded, or confined environments, artificial cytoskeleton reconstitution membrane gating, motility, and membrane growth and division. Given that protocells share some features of the living cells, fluorescence-activated cell sorting (FACS) appears to be an effective tool to study their population dynamics.

Here, we report two case studies where FACS proved to be an efficient technique for deriving quantitative on the population dynamics and number density of:*i.* redo-ox and *ii.* pH-sensitive protocells. Those protocells were further exploited for the design of more complex biomimetic systems including those displaying negative feedback circuits.

UV LIGHT-PRETREATED $GdYVO_4:Eu^{3+}$ NANOPARTICLES PROMOTE ROS GENERATION IN LEUKOCYTES

Anatolii Onishchenko[1,2], Anton Tkachenko[1,2] , Svetlana Yefimova[3], Umut Kökbaş[4], Iryna Vyshnytska[5], Volodymyr Prokopyuk[1,6], Pavel Maksimchuk[3]

[1]Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

[2]Department of Biochemistry, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

[3]Institute for Scintillation Materials National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

[4]Medical Biochemistry Department, Nevsehir Haci Bektas Veli University, Nevsehir, Turkey

[5]Biochemistry and Molecular Biology Department, All Saints University College of Medicine, St. Vincent and the Grenadines

[6]Department for Cryobiology of the Reproduction System, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Cancer remains a severe social and economic burden worldwide. Radiotherapy is a key therapeutic method to treat oncopathology. Several approaches have been intended to improve the outcome of radiotherapy, including the application of radiosensitizers and radioprotectors. In particular, nanoparticles (NPs) have been demonstrated to enhance the radiation dose due to their ability to produce reactive oxygen species (ROS) locally in tumor cells to promote their apoptosis.

The aim of this research was to assess the ability of $GdYVO_4:Eu^{3+}$ NPs to generate ROS in leukocytes after exposure to UV light.

Materials and methods. $GdYVO_4:Eu^{3+}$ NPs were either kept in the dark for at least 4 days prior to the experiment or were pre-treated with UV light during 40 min using a 250 W mercury lamp. Aliquots of blood obtained from 9 intact WAG rats were incubated with 10 ml RPMI 1640 medium during 24 h with UV light-treated and non-treated NPs. In both cases, the concentration of NPs reached 20 µg/ml. Control samples lacked NPs. ROS generation was evaluated in leukocyte suspensions obtained from the samples mentioned above using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) staining. Data were acquired by a BD FACSCanto™ II flow cytometer (Becton Dickinson, USA). The mean fluorescence intensity (MFI) of dichlorofluorescein (DCF) was assessed in CD45- positive and 7-aminoactinomycin D (7AAD)-negative cells. Data were processed using Kruskal-Wallis and Dunn's tests.

Results. Incubation with UV light non-treated NPs did not affect ROS levels in viable leukocytes. This was confirmed by statistically insignificant differences in MFI values of DCF ($p>0.05$). However, UV light pretreatment of NPs resulted in almost twice as high ROS levels in leukocytes ($p<0.0001$) as in control samples and white blood cells incubated with UV light non-treated NPs.

Conclusions. UV light-pretreated $GdYVO_4:Eu^{3+}$ NPs induce ROS generation.

FOOD ADDITIVE E407a DOES NOT ENHANCE LIPOPOLYSACCHRIDE-INDUCED REACTIVE OXYGEN SPECIES GENERATION IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

Anton Tkachenko[1,2], Oksana Nakonechna[2],
Tatyana Chumachenko[3], Volodymyr Prokopiuk[1]
[1]Research Institute of Experimental and Clinical Medicine
[2]Department of Biochemistry
[3]Department of Epidemiology
Kharkiv National Medical University

Food-grade and semi-refined carrageenans (food additives E407 and E407a, respectively) are common thickeners and gelling agents, which are widely consumed by the population of both middle-income and high-income countries. However, their safety has been causing controversy for decades. Recent research data suggest that carrageenans may exacerbate bacterial intestinal inflammation acting synergistically with lipopolysaccharide (LPS), which is found in cell walls of Gram-negative bacteria and is known to be a potent inducer of inflammation.

The research was designed to assess the synergic effects of semi-refined carrageenan and LPS on reactive oxygen species (ROS) generation in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Materials and methods. Blood was collected from 8 intact WAG rats. Its aliquots of 100 µl were incubated with RPMI 1640 medium for 2h. In addition, E407a (10 mg per ml, group 1), LPS (1 µg/ml, group 2) and both of them (10 mg per ml E407a, LPS 1 µg/ml, group 3). Control samples contained neither LPS nor E407a. Thereafter, the samples were used to obtain leukocyte suspensions. ROS generation was assessed by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) staining. BD FACSCanto™ II cell analyzer (BD, USA) was used to acquire data. To compare ROS generation, the mean fluorescence intensity (MFI) of dichlorofluorescein (DCF) in the gated regions of PBMCs was analyzed. Kruskal-Wallis and Dunn's tests were used to process data.

Results. Incubation of PBMCs with LPS was demonstrated to enhance ROS generation, evidenced by a statistically significant increase in MFI values in the samples from group 2 compared with controls. Short-term exposure to E407a did not promote ROS generation in PBMCs. The difference in MFI values between the samples incubated with LPS and LPS+E407a were statistically insignificant ($p>0.05$), indicating that E407a did not stimulate LPS-induced ROS generation in PBMCs.

Conclusions. Low doses of semi-refined carrageenan during the short-term incubation do not increase LPS-induced ROS generation in PBMCs.

HIGH COMPLEXITY FLOW CYTOMETRY APPLICATION IN THE MEASURABLE RESIDUAL DISEASE

I.A. Vyshnytska[1], G. Uzoekwe[2]

1. Biochemistry and Molecular Biology Department, All Saints University College of Medicine, St. Vincent and the Grenadines

2. MD5 student, All Saints University College of Medicine, St. Vincent and the Grenadines

Minimal (measurable) residual disease is the small number of cancer cells that remain in the body after treatment. Traditional diagnostic methods, such as immunohistochemistry and morphology, have detection sensitivity of only 10^{-2}- 10^{-3}, which does not reliably predict progression-free survival or overall survival after the treatments. There's an increasing clinical interest in the measurement and achievement of minimal residual disease negativity in several hematological diseases, for example in multiple myeloma.

Conventional multiparametric flow cytometry can easily reach a detection sensitivity of 10^{-4}, but to achieve the high sensitivity required for minimal residual disease evaluation, millions of cells have to be acquired. And the conventional immunophenotyping protocols are unable to achieve these numbers. Current consensus guidelines require a minimum of 2 million and recommend 5 million events be acquired to reach a minimum sensitivity of 10^{-5}. So, it's necessary to increase the specificity and sensitivity of the technique to acquire a greater number of events and to differentiate normal from abnormal plasma cells. And here the adopting high complexity flow cytometry(HCFC) comes in rescue.

Currently there are challenges in HCFC-method. Immunophenotyping panels become more complicated in adopting HCFC, and this directly affects the time a technician spends on reagent handling. Improvement of acquisition processes is, perhaps, more directly linked to the development of high-performance flow cytometers with many parameters for the acquisition of complex panels. They must also have a high capacity for data processing, and, to facilitate quality control, they must make it easy to monitor performance, calibration, and compensation and standardization processes between cytometers.

One of the biggest challenges will be when processing data, as soon we will be more capable of increasing the number of samples processed and the number of parameters analyzed. This will gradually move us toward high-dimensional single-cell analysis, which presents its own challenges in terms of data management, data visualizations, result reproducibility, computational power, and information sharing.

The natural evolution of HCFC will continue to require new tools to improve staining, acquisition, and analytical processes.

ІНТЕНСИВНІСТЬ ПРОЦЕСІВ ЕРИПТОЗУ ПРИ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ У ВАГІТНИХ

Н.А.Абдулаєва, О.І.Каліновська, В.І.Черепова
Кафедра акушерства та гінекології №2
Харківський національний медичний університет
м.Харків, Україна

Церебральні артеріовенозні мальформації (АВМ) у вагітних на сьогодні відносяться до актуальних проблем сучасного акушерства через їх недостатню вивченість. В останні роки відмічається значний інтерес відомих світових науковців до вивчення цереброваскулярних порушень (ЦВП) у вагітних, що пов'язано з підвищенням числа материнської та перинатальної захворюваності та смертності. ЦВП виникають при обмеженні кровотоку внаслідок звуження судин, утворення тромбів, закупорки або розриву кровоносних судин. До найпоширеніших форм ЦВП відносяться тромбоз судин головного мозку, гостре порушення мозкового кровообігу (ГПМК), геморагічний або ішемічний інсульт, аневризми, церебральна емболія, дисциркуляторна енцефалопатія. Основними факторами ризику розвитку ЦВП є паління вагітних, вік більше 35 років, багатоплідна вагітність, артеріальна гіпертензія, прееклампсія, цукровий або гестаційний діабет, ожиріння, серцево-судинні захворювання, використання допоміжних репродуктивних технологій, спадкові тромбофіліі, антіфосфоліпідний синдром. Ризик інсульту безпосередньо пов’язаний з рівнем артеріального тиску (АТ), корелює з величиною систолічного і діастолічного АТ. Ризик ЦВП значно збільшується при тривало існуючій гіпертензії і погано контрольованому АТ. Підвищення рівня естрогенів, прогестерону, ХГЧ сприяє змінам в судинній стінці, що на тлі артеріальної гіпертензії призводить до формування та росту і розривам артеріальної аневризми та артеріовенозної мальформації (АВМ). Інсульт у вагітної може викликати захворювання плода, обумовлені впливом діагностичних процедур, які показані вагітній з інсультом, та тератогенною дією лікувальних заходів майже до загибелі плода. Незалежним фактором ризику виникнення інсульту є мігрень, яка підвищує ризик його виникнення в 2 - 3 рази. Гемодинамічні зміни (підйом АТ в III триместрі, збільшення обсягу крові на 30-40%), викликані підвищеними потребами матки, плаценти, зростаючого плода, підвищують тиск в судинному руслі і внаслідок цього можуть бути причиною геморагічного інсульту, кровотеч з АВМ або аневризми.

Мета дослідження — вивчити активність процесів ериптозу, тобто запрограмованої загибелі еритроцитів, у вагітних з цереброваскулярними порушеннями.

Матеріали та методи: досліджено 66 вагітних, з них 25 контрольна група, 21 - з артеріальною гіпертензією та ЦВП, 20 - з плацентарною дисфункцією. Дослідження інтенсивності процесів ериптозу проведено шляхом аналізу транслокації фосфатидилсерину у зовнішній шар фосфоліпідного бішару мембрани з використанням FITC Annexin V (Becton Dickinson, США) на проточному цитометрі BD FACSCanto™ II. Статистична обробка отриманих результатів проведена за допомогою програми Statistica 6.0.

Результати дослідження. За результатами дослідження встановлено, що у вагітних з ЦВП на тлі артеріальної гіпертензії значення показників ериптозу, а саме відсоток анексин V-позитивних клітин та значення середньої інтенсивності флуоресценції FITC в еритроцитах, статистично не відрізняється у порівнянні з контролем. Таким чином ЦВП залишається важливою проблемою в Україні. АГ є одним з основних чинників розвитку цереброваскулярних захворювань, особливо у вагітних. Високий кров'яний тиск може бути небезпечним як для матері, так і для плода, отже жінок схильних до цереброваскулярних захворювань слід ретельно обстежувати та доглядати.

Висновки. Розвиток ЦВП на тлі артеріальної гіпертензії у вагітних не супроводжується активацією процесів ериптозу.

ЗНАЧЕННЯ ЕРИПТОЗУ В ДІАГНОСТИЦІ АНОМАЛЬНИХ МАТКОВИХ КРОВОТЕЧ

О.О.Алєксєєва, О.А.Лященко, О.Б.Овчаренко
Кафедра акушерства та гінекології №2
Харківський національний медичний університет
м. Харків, Україна

Вступ. Проблема аномальних маткових кровотеч (АМК) займає одне з провідних місць у сучасній гінекологічній практиці, тому що 30% жінок страждають на АМК, з них 65% пацієнток репродуктивного віку звертаються до стаціонару за допомогою. Міжнародна Федерація Акушерів та Гінекологів (FIGO) у 2011 р. в складі представників 17 країн світу запропонувала класифікаційну систему PALM-COEIN, що виділяє дві основні групи АМК, що пов'язані та не пов'язані з органічною патологією матки.

Патологія тиреоїдної системи посідає значне місце серед екстрагенітальних захворювань жінок репродуктивного та перименопаузального віку. Як гіпо-, так і гіпертиреоз можуть бути етіопатогенетичною причиною розвитку АМК. Відхилення від норми рівнів тироксину та трийодтироніну призводять до менструальних порушень. Поширеність гіпотиреозу серед населення постійно збільшується. У дорослих частота його серед жінок становить від 1,4 до 2 % .

З кожним роком зростає кількість операцій на органах малого тазу з приводу АМК, зумовлених пухлинами, ендометріозом та відсутністю ефекту від проведення консервативної терапії, що призводить до втрати органів репродуктивної системи, зміни якості життя та зниження працездатності жінок.

Метою дослідження було вивчення активності процесів ериптозу, тобто загибелі еритроцитів, що є аналогом апоптозу ядровмісних клітин, у жінок з патологією щитоподібної залози, які мають аномальні маткові кровотечі.

Матеріали та методи. Обстежено 55 жінок віком від 18 до 49 років, які були поділенні на 3 групи: I група – жінки з АМК (15 пацієнток); II група – з АМК та патологією щитоподібної залози (20 пацієнток, з яких 18 жінок мали первинний гіпотиреоз та 2 – вторинний гіпотиреоз); III – контрольна група (20 здорових жінок). Активність ериптозу визначали за допомогою фарбування FITC Annexin V (Becton Dickinson, США) на проточному цитометрі BD FACSCanto™ II.

Результати дослідження. Встановлено, що у жінок, хворих на АМК, особливо у жінок з патологією щитоподібної залози, спостерігалося статистично значуще підвищення відсотка анексин V-позитивних еритроцитів та збільшення значень середньої інтенсивності флуоресценції анексин V FITC на 15% в еритроцитах у порівнянні з контрольною групою, що вказує на активацію процесів ериптоза.

Висновки. Використання проточної цитометрії для визначення інтенсивності процесів ериптозу має перспективи для використання у прогнозуванні ступеня тяжкості аномальних маткових кровотеч у жінок з патологією щитоподібної залози.

ПРОБЛЕМИ РОЗДІЛЕННЯ Й ІДЕНТИФІКАЦІЇ КЛІТИН

Є.Д.Андросов
Кафедра біологічної хімії
Харківський національний медичний університет
Харків, Україна

Існує ряд способів і систем для проведення проточного цитометричного сортування клітин, наприклад, сперми ссавців і, зокрема,до популяцій, що несуть Х-хромосоми, та/або популяцій, що несуть Y-хромосоми, з метою підвищити ймовірність того, що запліднення яйцеклітини сортовою спермою призведе до отримання потомства бажаної статі. Однак, відомі методи кидають ряд викликів, особливо щодо пізнішого використання клітин в отриманні потомства. Так, важливо, щоб вони не впливали негативно на життєздатність цих клітин. Часто, одна чи більше цілей застосування методів і систем (швидше сортування, більша точність тощо) конфліктують з іншими. Тому необхідно врівноважувати й враховувати різноманітні фактори, включаючи температуру та її зміни, тиск і його зміни, яким піддаються клітини, середовища рідин, із якими контактують клітини, сили, що докладаються до клітин, і довговічність останніх. Наступний виклик має відношення до фізичних та оптичних властивостей клітин. Наприклад, сплющені чи іншим чином асиметричні клітини (червоні кров'яні тільця, клітини сперми ссавців) демонструють анізотропне виділення енергії (світової). Комплексні параметри внутрішнього вмісту клітини й її кордонів створюють заломлення та відбивання світла способами, які дуже залежать від орієнтації клітини відносно будь-яких джерел опромінення й детекторів, що використовуються для розпізнавання клітин. Нарешті, по мірі того як кожна клітина проходить крізь зону визначення, світло, що падає на цю клітину,що випромінюється з клітини (флуоресцентне) іщо відбивається клітинами, залишаються залежними від орієнтації клітини. Зокрема, відомі рішення проблеми орієнтації клітин передбачають таку, коли поверхні клітин мають тенденцію шикуватись у послідовному напрямі, застосування двох взаємоперпендикулярних детекторів (0- і 90-градусних), одного чи більше параболічних рефлекторів, гідродинамічної орієнтації, оптичного визначення вздовж тієї самої осі, що й потік із внутрішнім контуром та оболонкою, який несе ці клітини.

Отже, навіть з порівняно передовим станом проточної цитометрії (ПЦ), існує нагальна потреба в технологіях, здатних забезпечити більш ефективні, чутливі й точні методи і пристрої розділення та ідентифікації клітин.

У той же час, як показав аналіз патентного пошуку пристроїв і способів (методів) для проведення ПЦ і, зокрема сортування клітин, то їх кількість залишає бажати кращого, особливо створених вітчизняними дослідниками.

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ПРОТОЧНОЇ ЦИТОМЕТРІЇ ПРИ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Д.О. Бутов[1], М.О. Ткаченко[2], Т.С. Бутова[3]
[1]Кафедра фтизіатрії та пульмонології ,
[2]Кафедра внутрішньої медицини №2 і клінічної імунології та алергології імені академіка Л.Т. Малої
Харківський національний медичний університет, Харків, Україна
[3]КНП ММР «Мереф'янська центральна районна лікарня», Мерефа, Україна

Туберкульоз - це інфекційна хвороба, яка є основною причиною погіршення самопочуття, однією з 10 найбільших причин смерті у всьому світі та основною причиною смерті від одного інфекційного агента у хворих на ВІЛ / СНІД. Проточна цитометрія в останні десятиріччя набуває все більшого поширення як лабораторний метод у галузі клінічних досліджень та впевнено впроваджується у практичну медицину. Метод проточної цитометрії надає широкі можливості з вивченням кількісних та якісних характеристик окремих популяцій клітин, у першу чергу імунокомпетентних, а тому набуває особливого значення в дослідженні захворювань, в основі патогенезу яких лежить імунний дисбаланс. Туберкульоз є найяскравішим і особливим прикладом патологічного процесу, що є результатом взаємодії між мікроорганізмом та клітинами імунної системи хворого на специфічний процес.

Впровадження проточної цитометрії в дослідженні туберкульозу дозволяє зрозуміти особливості специфічного процесу на клітинному рівні з розумінням перебігу імунно-патологічної відповіді організму на *M. Tuberculosis*. У майбутньому це може призвести до розробки нових інноваційних методів прогнозування, профілактики, діагностики, лікування різних форм туберкульозу.

Однією з проблем сучасної фтизіатрії є особливості діагностики латентної туберкульозної інфекції від розвитку хвороби. Запропоновані методи діагностики активних форм туберкульозу за допомогою проточної цитометрії полягають у визначенні маркерів імунної відповіді уповільненого типу, а саме накопичення туберкульоз-специфічних $CD4^+$ інтерферон-γ^+ Т-лімфоцитів у крові або зразках бронхоальвеолярного лаважу при відповідній специфічній реакції. Інші дослідження пропонують використовувати CD154 у якості маркера активації специфічної протитуберкульозної імунної відповіді.

Пошук найбільш чутливого та специфічного діагностичного маркера активного туберкульозу триває. Впровадження проточної цитометрії у рутинну клінічну практику з метою ранньої діагностики активного туберкульозу дозволило б скоротити рівень захворіваності туберкульозу та його ускладнень, що б призвело до зниження витрати на лікування кожного окремого випадку.

ЗАСТОСУВАННЯ ПРОТОЧНОЇ ЦИТОМЕТРІЇ З ВІЗУАЛІЗАЦІЙНИМ АНАЛІЗОМ У ДОСЛІДЖЕННІ ВПЛИВУ ТРАНСМЕМБРАННИХ БІЛКІВ IFITM НА M. TUBERCULOSIS

Т. І. Коваленко, М. В. Лахно
Кафедра мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова ХНМУ, Харків, Україна

Вступ. Візуалізаційний аналіз проточної цитометрії поєднує у собі функції проточної цитометрії та флуорисцентної мікроскопії з досягненнями в алгоритмах обробки даних. Дана методологія дозволяє аналізувати велику кількість певних кількісно визначених параметрів для окремих клітинних та субклітинних подій експерименту.

Мета дослідження: за даними наукової літератури визначити способи дослідження кількісної зміни Mycobacterium tuberculosis у клітинах-хазяїна за допомогою проточної цитометрії з візуалізацією.

Матеріали та методи: наукові джерела, які освітлюють візуалізаційний аналіз проточної цитометрії та способи його використання в дослідженні внутрішньоклітинних патогенів.

Результати. Для вивчення процесів, які допомагають M.tuberculosis, виживати всередині таких клітин як макрофаги, необхідно розуміти процеси, що забезпечують інтерналізацію патогена, його взаємодію з клітинними факторами господаря та дозрівання фагосом. Попередні дослідження показали, що індуковані інтерфероном трансмембранні (IFITM) білки є фактором обмеження клітини господаря для бактерії туберкульозу. Під час дослідження з використанням проточного цитометрута кількісного аналізу, визначили можливість вивчати вплив блокування IFITM1-3, які обмежують внутрішньоклітинний ріст M.tuberculosis, або вплив гіперекспресії IFITM3, що посилює внутрішньоклітинну ендосомну закисленість у клітинах, інфікованих M.tuberculosis,а також дію на кількісне зростання туберкульозної палички. Для кількісного вимірювання впливу надмірної експресії IFITM3 на інфекцію H37Rv-mCherry (вірулентний штам M.tuberculosis H37Rv, який експресує флуоресцентний білок mCherry) застосовується технологія, яка дозволяє зробити знімки окремих клітин, що містять внутрішньоклітинні збудники M.tuberculosis. Наступним кроком використовуючи програмні алгоритми розрізняють інтерналізовані та неінтерналізовані бактерії туберкульозу. Клітини, в яких бактерії зв'язуються з клітинної мембраною, виключають з аналізу на підставі маски інтерналізації. Далі за допомогою програмного забезпечення вимірюється інтенсивність пікселів mCherry у надмірно виражених та контрольних клітинах IFITM3. Відповідно до чого в клітинах з надмірним вираженням IFPM3 відмічатиметься значне зниження середньої інтенсивності дії mCherry на клітинку. А збільшення середньої інтенсивності дії mCherry на клітину буде спостерігатися в клітинах з блокуванням IFITM порівняно з контрольними клітинами. Візуалізаційний аналіз проточної цитометрії також дозволяє отримувати багаточисленні зображення інфікованих клітин, які можна використовувати для подальшого аналізу.

Висновки. Методика проточної цитометрії з візуалізацією дозволяє виявити кількісні зміни інтерналізованих M.tuberculosisв клітинах з блокуванням IFITM порівняно з клітинами з гіперекспресією IFITM3, що також може підтверджувати роль трансмембранних білків IFITM. Тож, подальший розвиток методів візуалізаційного аналізу проточної цитометрії та застосування для вивчення внутрішньоклітинних патогенів на рівні окремих клітин та популяцій може значно покращити розуміння фізіології внутрішньоклітинних патогенів та їх взаємодії з клітинами господаря.

МЕТОД ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

О.В. Кудокоцева, И.И. Ломакин
Отдел криофизиологии ИПКиК НАН Украины, г. Харьков, Украина

Кордовая кровь (КК) является общепризнанным источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) для лечения многих гематологических и наследственных заболеваний. В настоящее время КК рассматривается и как источник других популяций клеток, в частности способных инициировать и/или стимулировать ангиогенез, участвовать в регенерации печени и т.д. Цель – обоснование выбора дозы клеток КК с целью их трансплантации при различных патологических состояниях в эксперименте.

Исследования ЯСК (CD45+) КК человека, в том числе и ГСК (CD34+), проведены методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (BD) (США) с использованием реагентов BD. Жизнеспособность ЯСК оценивали с использованием флуоресцентного ДНК красителя 7AAD. В качестве экспериментальных моделей использовали фторурациловую модель миелосупресии (мыши), цереброваскулярную патологию (ЦВП) (спонтанно-гипертензивные крысы SHR), модель токсического поражения печени крыс в результате хронической алкогольной интоксикации.

Клинический эффект клеточной терапии во многом зависит от достаточного количества трансплантируемых клеток на килограмм массы тела реципиента. Вопрос возникает именно в выборе дозы вводимых клеток КК при различных патологических состояниях. Так, на примере фторурациловой миелосупресии у мышей мы ориентировались на общепринятые нормы для трансплантации клеток КК: $(1\text{-}3)\times10^7$ ЯСК (CD45+) на 1 кг массы тела или (1,7-2,3) ГСК (CD34+)$\times10^5$/кг. Показано, что процент жизнеспособных ЯСК после размораживания составляет (65-71)% (основные потери происходят за счет гранулоцитов), тогда как для ГСК этот показатель составляет (96-98)%. Поэтому, с целью трансплантации клеток КК при гематологической патологии мы считаем правильным вести перерасчет дозы вводимых клеток на количество CD34+ клеток. В случае ЦВП и токсического поражения печени перерасчет дозы вводимых клеток на ГСК мы считаем необоснованным с точки зрения механизма терапевтического действия клеток КК при негематологических видах патологии. Известно о наличии в КК мезенхимальных стволовых клеток (МСК), способных к дифференцировке в клетки костной, хрящевой и жировой тканей, а также в кардиомиоциты, гепатоциты, нейроны. Анализ характерных для МСК маркеров является весьма дорогостоящим, в связи с чем мы вели перерасчет дозы вводимых клеток КК на количество CD45+ с учетом процента жизнеспособных по 7AAD клеток.

Таким образом, при выборе дозировки клеточного препарата следует учитывать как вид патологии, так и количественные и качественные (процент жизнеспособности по 7AAD) характеристики вводимых клеток, определяемые методом проточной цитофлуориметрии.

ОСОБЛИВОСТІ ОКИСЛЮВАЛЬНОГО СТРЕСУ У ДІТЕЙ З БРОНХІАЛЬНОЮ АСТМОЮ

Н.І. Макєєва, В.В. Андрущенко, В.В. Поляков
Кафедра педіатрії № 2
Харківський національний медичний університет
м.Харків, Україна

Астма – це хронічний системний процес, який приводить до пошкодження та ремоделювання дихальних шляхів.

Важливу роль у патогенезі бронхіальної астми (БА) відіграє окислювальний стрес (ОС), основною причиною якого є порушення у системі «оксиданти-антиоксиданти». Він виражається надмірним утворенням активних форм кисню (АФК) і ослабленням ефективності антиоксидантного захисту (АОЗ).

У клітин системи імуногенезу (макрофаги, моноцити, гранулоцити, лімфоцити) механізм генерації АФК безпосередньо пов'язаний із захисною функцією.

Гранулоцити — це (до них відносяться базофіли, еозинофіли і нейтрофіли) захисні клітини людини.

Нейтрофіли, володіючи унікальною функцією фагоцитозу, складають першу лінію неспецифічного захисту. Однією з найбільш важливих особливостей нейтрофілів є «респіраторний вибух», результатом якого є продукція АФК, від яких залежить ефективна внутрішньоклітинна загибель пошкоджених клітин, що були поглинені фагоцитами. Здатність до генерації АФК характеризує функціональну активність нейтрофілів, а саме можливість здійснення завершеного фагоцитозу.

Метою даного дослідження було вивчення рівня активних форм кисню (АФК) у гранулоцитах дітей хворих на БА.

Матеріали та методи досліджень. Обстежено 26 дітей з персистуючою бронхіальною астмою, частково контрольованим перебігом в періоді загострення. Дослідження проводилося восени 2020 року у пульмонологічному відділенні на базі КНП "Міська клінічна дитяча лікарня № 16" міста Харків. Пацієнтів розподілили на групи залежно від ступеня бронхіальної астми: 1 група — БА легка персистуюча (n = 12), 2 група — БА середньої важкості персистуючу (n = 7), 3 група — БА важка персистуюча (n = 7). До 4 групи включили практично здорових дітей (n = 9).

Рівні АФК оцінювали в гранулоцитах з використанням барвника 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетату (H2DCFDA) за допомогою лазерного проточного цитофлуориметра-сортера BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) з аналізом отриманих результатів з використанням програми FACSDiva 6.1.2. У групах порівнювали значення середньої інтенсивності флуоресценції дихлорфлуоресцеїну у популяції гранулоцитів.

Результати. У пацієнтів з тяжким перебігом персистуючої БА спостерігалося вірогідне зниження рівнів АФК в гранулоцитах порівняно, як з групою контролю так і з рівнями у пацієнтів з легкою та середньоважкою БА.

Висновки. Вірогідно знижений рівень АФК в гранулоцитах у пацієнтів з тяжкою БА відобразив наявність пригнічення їх продукції, що дозволяє припустити виснаження резервних можливостей гранулоцитів.

РОЛЬ ЛАБОРАТОРНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ В ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СОЛІДНИХ ОРГАНІВ

І.В. Новікова[1,2], І.М.Медвєдєва[3]
[1] КНП Харківської обласної ради «Обласна клінічна лікарня», , Харківський національний медичний університет, кафедра біологічної хімії[2], м. Харків,
КНП Сумської обласної ради «Обласна клінічна лікарня», м. Суми, Україна [3]

Трансплантація органів, потребує потужного лабораторного супроводу пари донор/реципієнт. Система антигенів HLA на поверхні клітин людини відповідальна за розпізнавання «свій» або «чужий» в організмі.

Мета дослідження: огляд методів лабораторної діагностики, що використовуються для передтрансплантаційного та посттрансплантаційного моніторингу.

Матеріали та методи: аналіз та узагальнення літературних джерел.

Результати: Невідповідності між тканинним типом донора і реципієнта призводять до відторгнення органу внаслідок того, що імунна система пацієнта розпізнає «чужу тканину». Основним пусковим механізмом в реакції гуморального відторгнення при трансплантації солідних органів є HLA антитіла. Найбільш значущими при імунній відповіді є локуси HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ і HLA-DP. Антигени HLA-A, HLA-B і HLA-C (клас I) виявляють на всіх ядерних клітинах організму, включаючи тканини нирок, серця та ін., а також на поверхні тромбоцитів. Антигени HLA-DR, HLA-DQ і HLA-DP (клас II) в нормі присутні на антигенпрезентуючих клітинах.. У деяких пацієнтів є «природні» антитіла до HLA, а також антитіла до HLA, індуковані інфекцією. При пересадці органу, який має антигени HLA, до яких у пацієнта наявні циркулюючі антитіла, може спостерігатись надгостре або гостре відторгненням. Ці антитіла ускладнюють пошук органу для реципієнта, тому одним із завдань лабораторної служби є скринінг та ідентифікація передіснуючих антитіл. Типування тканин реципієнтів і донорів, надає інформацію про ступінь відповідності між органами донора і організмом реципієнта.

Лабораторний супровід передтрансплантаціного та посттрансплантаційного моніторингу включає: HLA-типування донорів і реципієнтів для трансплантації солідного органу; скринінг і ідентифікація HLA-антитіл: - аналіз на цитотоксичність; аналіз антитіл за допомогою технології Luminex; оцінка перехресної сумісності для трансплантації солідного органу; посттрансплантаційний моніторинг: визначення донор-специфічних антитіл; визначення маркерів відторгнення.

Методи лабораторного супроводу мають унікальне клінічне призначення: стандартний тест перехресної сумісності за комплемент залежною цитототоксичністю (cross-match); оцінка перехресної сумісності за допомогою проточної цитометрії; оцінка перехресної сумісності за допомогою Luminex; інтерпретація результатів проби перехресної сумісності (cross-match); аутосумісність.

Критеріями потенційної відповідності донора є: сумісність за групою крові; сумісність тканинного типу (HLA-генотипу); скринінг на антитіла; віртуальна перехресна сумісність; оцінка ризику; вірусологічна оцінка.

Аналіз перехресної сумісності за допомогою проточної цитометрії є більш чутливим методом у порівнянні з цитотоксичними тестами перехресної сумісності та дозволяє визначати специфічні антитіла IgG до HLA класу I та/ або II донора; виявляти антитіла, що не зв'язують комплемент, та можуть залишитися непоміченими при цитотоксичній пробі перехресної сумісності.

МОЖЛИВОСТІ ПРОТОЧНОЇ ЦИТОФЛУОРІМЕТРІЇ ДЛЯ ОЦІНКИ ПОШКОДЖЕНЬ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЧОЛОВІКІВ З РІЗНИМ СТАНОМ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ, СПРИЧИНЕНИХ КРІОКОНСЕРВУВАННЯМ

Павлович О.В.[1], Юрчук Т.О.[1], Петрушко М.П.[1,2]

[1] *Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;*

[2] *Медичний центр «ДРТ-клініка репродуктивної медицини», Харків, Україна*

Вступ. Кріоконсервування сперматозоїдів людини є невід'ємною частиною допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ), однак, його ефективність багато в чому залежить від вихідних характеристик гамет. Крім того, в процесі заморожування-відігріву відбуваються летальні та сублетальні пошкодження клітин, що може негативно вплинути на результати лікування методами ДРТ. Визначити рівень пошкодження гамет можна за наявністю в них процесів апоптозу та некрозу.

Мета. Метою дослідження була оцінка летальних та сублетальних пошкоджень в кріоконсервованих сперматозоїдах чоловіків при нормо- та патоспермії методом проточної цитофлуориметрії.

Матеріали і методи. В роботі використовували сперматозоїди чоловіків (n=30) з нормозооспермією, олігоастенотератозооспермією (ОАТ) та астенозооспермією. Клітин кріоконсервували за двоетапною програмою у 10% розчині гліцерину (Sigma Aldrich, США). Для визначення апоптозу та некрозу в сперматозоїдах використовували 7-аміноактиноміцин D (7AAD) та Annexin V, відповідно. Отримані за допомогою проточного цитофлуориметра «FACS Calibur» («Becton-Dickinson», США) результати аналізували з використанням програми «Win MDI v.2.8» (США).

Результати. Серед свіжовиділених сперматозоїдів чоловіків з нормозооспермією кількість клітин на ранній стадії апоптозу склала (2,3±0,7)%, з некрозом – (1,3±0,7)%. При астенозооспермії значущих відмінностей за кількістю апоптичних та некротичних клітин порівняно з нормозооспермією не спостерігалось, на відміну від ОАТ сперматозоїдів (кількість некротичних клітин зростала до (4,0 ± 0,6)% ($p<0,017$)).

Після кріоконсервування збільшувалась кількість клітин з астеноспермічних та ОАТ еякулятів на стадії раннього та пізнього апоптозу, а у випадку ОАТ ще й на стадії некрозу ($p<0,017$). Збільшення кількості апоптотичних клітин в кріоконсервованих сперматозоїдах при нормозооспермії не виявлено.

Висновки. Використання проточної цитофлюориметрії дозволило з'ясувати, що кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з нормозооспермією стандартним методом заморожування не призводить до виникнення в клітинах апоптозу, але спричиняє розвиток апоптозу у сперматозоїдах зі зниженими вихідними морфофункціональними характеристиками. Застосування забарвлення 7AAD та Annexin V та FASC–аналізу дало змогу диференціювати стадії апоптозу та виявити, що після кріоконсервування сперматозоїдів при ОАТ підвищується кількість некротичних клітин. Таким чином, використання проточної цитофлюориметрії має важливе значення для оцінки стану кріоконсервованих сперматозоїдів, а виявлене підвищення рівня апоптозу у гаметах чоловіків з патоспермією спонукає до розробки методів низькотемпературного консервування, які забезпечать збереження більшої кількості клітин.

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В ОЦЕНКЕ ПОТЕНЦИАЛА КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕГАКАРИОЦИТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИПСК

Д. Погожих[1], Р. Блашик[1], К. Фигейредо[1]
Институт Трансфузиологии и Трансплантологии, Высшая Медицинская Школа Ганновера (МНН), г. Ганновер, Германия

На сегодняшний день, переливание донорских тромбоцитов - единственный эффективный клинический подход к быстрому жизненно необходимому увеличению количества этих форменных элементов в крови пациента в случае тяжелой тромбоцитопении. Однако, применение данной процедуры на практике сталкивается с целым рядом препятствий, таких как неблагоприятные иммунные реакции реципиента, высокая чувствительность тромбоцитов к широкому ряду манипуляций, острая нехватка и короткий срок хранения донорского материала, и т.д. В будущем, мегакариоциты (МК), полученные *in vitro*, могут стать альтернативой или дополнением переливанию донорских тромбоцитов. Методы проточной цитометрии (FC) являются одним из ключевых подходов в оценке продуктов клеточной инженерии. В настоящем исследовании мы провели комплексную характеристику фенотипа, функциональности и иммуногенного потенциала МК, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Фенотипическая характеристика типичных маркеров МК была выполнена с помощью FC. Анализ содержания ДНК проводили методами флуоресцентной микроскопии и FC. Способность МК к формированию отшнуровывающихся тромбоцитов была проанализирована с помощью фазово-контрастной микроскопии, а их ультраструктура - с помощью растровой электронной микроскопии. Иммуногенность была охарактеризована с помощью FC на разных стадиях созревания МК, полученных из ИПСК, путем определения уровней экспрессии главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) и кинетики экспрессии костимулирующих молекул Т-клеток: CD40, OX40L, белков B7 и ICOSLG, а также отрицательных регуляторов иммунного ответа: PD-L1 и FasL. Также были проведен анализ пролиферации и дегрануляции Т-клеток. МК, полученные из ИПСК, показали типичную полиплоидию и способность к формированию отшнуровывающихся тромбоцитов. Экспрессии CD40 не обнаружено. Частота МК, экспрессирующих OX40L, значительно снижалась во время созревания. Популяции, экспрессирующие B7, значительно уменьшаются во время созревания МК *in vitro*. Частота ICOSLG снижалась, тогда как PD-L1 и FasL экспрессировались только на остаточных уровнях. Было показано, что МК, генерируемые *in vitro*, запускают пролиферацию и индуцируют дегрануляцию Т-клеток, что можно снижать путем подавления экспрессии ГКГС. Характеристика иммуногенного потенциала МК имеет важное значение для того, чтобы сделать трансфузию МК на основе ИПСК на шаг ближе к клиническому применению.

ВПЛИВ ЕЛЕКТРОННИХ СИГАРЕТ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ ГЕНЕРАЦІЇ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В ЛЕЙКОЦИТАХ ЩУРІВ

Т.М. Попова[1], О.А. Наконечна[1], О.В. Тіщенко[2], Л.С. Кривенко[2]
[1]Кафедра біологічної хімії, Харківський національний медичний університет, Харків, Україна
[2] Кафедра дитячої стоматології та імплантології, Харківський національний медичний університет, Харків, Україна

Вступ. За останні 8 років електронні сигарети (ЕС) стали популярними серед молодих споживачів як у всьому світі, так і в Україні. Аерозоль ЕС утворюється шляхом нагрівання рідини, яка складається з пропіленгліколю, гліцерину, штучних ароматизаторів і різної концентрації нікотину від 0,3 до 18мг/мл. Виробники переконують, що аерозоль ЕС містить значно меншу концентрацію токсичних сполук ніж дим звичайних тютюнових сигарет.Проте, систематична дія таких карбонілів, як акролеїн, ацетальдегід чи формальдегід, що містяться у аерозолі, навіть у малих концентраціях, можуть спричинити розвиток оксидативного стресу в клітинах споживача. Ми припустили, що ЕС чинять небезпеку для здоров'я через окислювальну токсичність на клітини.

Мета дослідження. Оцінити інтенсивність генерації активних форм кисню (АФК) в лейкоцитах периферичної крові щурів, які піддавалися дії дев'яносто денного впливу аерозолю ЕС.

Матеріали та методи. Експеримент проводили на 16 щурах-самцях популяції WAG, віком 10 тижнів, вагою 86-94г. Щурів розподілили на дві групи. У групу 1 (контрольну) увійшли 8 інтактних тварин. Група 2 складалася з 8 щурів, які піддавали інгаляційному впливу аерозолю ЕС протягом 90 днів. Вміст рідини ЕС був наступним: пропіленгліколь/гліцерину 50/50 (у співвідношенні), нікотин – 6 мг/мл, етилмальтол і сукралоза. Після виведення тварин з експерименту у зразках крові, щурів обох груп визначали інтенсивність генерації АФК в лейкоцитах за допомогою проточної цитометрії з використанням 2 '7'-діхлородігідрофлуоресцеіна діацетату. Статистичний аналіз отриманих даних було проведено з використанням програми STATISTICA 7.0. Результати представлено як медіана і міжквартільний розмах – Me[IQR]. Відмінності між 2 незалежними групами перевіряли за допомогою Манн-Уітні U тесту. Нульову гіпотезу відхиляли при рівні статистичної значущості $p<0,05$.

Результати. Серед популяції $CD45^{+}$-лейкоцитів, залежно від флуоресценції 2,7-діхлорфлуоресцеіна, було ідентифіковано дві субпопуляції: перша – з високим рівнем АФК (АФК-високий) і друга – з низьким рівнем АФК (АФК- низький). Відсоток клітин в субпопуляції лейкоцитів АФК-високий у щурів групи 2, які інгаляційно отримали аерозоль ЕС (Me=50.58 [46.53; 53.11] %) був у 2.30 рази вище у порівнянні з групою 1Me=22.03 [20.01; 23.53] %, MWUtestZ=3.36,p=0.0007. Встановлено, що медіана середнього значення інтенсивності флуоресценції в групі 2Me=6816 [6487; 7122] була вище ніжу групі 1 Me=7938[7795; 8121], MWUtestZ=3.38 p=0.0007.

Висновки. Таким чином інгаляційний вплив аерозолю ЕС спричинив гіперпродукцію активних форм кисню в лейкоцитах щурів.

ПОРІВНЯННЯ ПРОГРАМНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ДЛЯ ПРОТОЧНОЇ ЦИТОМЕТРІЇ

Прокопюк В.Ю.[1,2], Ткаченко В.Л.[1], Тонкошкур С.Н.[3], Оніщенко А.І.[1]
[1]Харківський національний медичний університет, Харків, Україна
[2]Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків, Україна
[3]Комунальне підприємство «Санепідсервіс», Харків, Україна
v.yu.prokopiuk@gmail.com

Вступ. Проточна цитометрія є сучасним методом досліджень, «золотим стандартом» в клітинній біології та медицині. Велика вартість та складність обслуговування обладнання обмежує застосування методу. Втім робота оператора проточного цитометра займає відносно невеликий час та може бути виконана технічним персоналом. Більше часу займає аналіз отриманої інформації. В останні роки запропоновано багато програмного забезпечення для аналізу даних проточної цитометрії, який може значно розширити можливості методу, коло дослідників, які можуть його застосовувати, можливості знайомства науковців з методом.

Метою роботи був пошук та порівняння програмного забезпечення для аналізу результатів проточної цитометрії.

Матеріали та методи. Проводили пошук в мережі Internet програмного забезпечення для аналізу даних проточної цитометрії. Програми аналізували за такими параметрами: сумісність з Windows XP, 7, 10; можливість роботи з різними типами файлів, підтримка виробником, наявність адекватного опису можливостей, ціна, наявність пробного періоду, можливості візуалізації у формі Dotplot, Histogram, можливості гейтингу, статистичного аналізу, можливості автоматичного аналізу пакету даних.

Результати. Були відібрані наступні програми обробки даних проточної цитометрії: BD FACSCanto clinical software, BD FACSDiva Software, FlowJO, Cyflogic, FCS Express, WinMDI, Kaluza, FCSalyzer, Flowing Software. Всі вони сумісні з Windows XP, 7, 10 та мають підтримку виробника, за винятком WinMDI, яка працює з Windows 95 та не підтримується. Умовою успішної роботи є адекватне налаштування цитометру при аналізі клітинної популяції. BD FACSCanto clinical software та BD FACSDiva Software є стандартним програмним забезпеченням, що поставляється виробником. Інші програми є альтернативними з демонстраційним періодом, окрім WinMDI та Flowing Software, які є безплатними. Всі програми мають можливість гейтингу та працюють у різних режимах, більше можливостей аналізу має FlowJO. Найбільш повний та зрозумілий опис з відео поясненнями має Flowing Software.

Висновки. Найбільш прийнятним програмним забезпеченням, окрім стандартних програм, що поставляються з цитометром є некомерційна Flowing Software, що може бути застосована для навчання студентів та широкого кола науковців, та професійна комерційна програма FlowJO, що дає більше можливостей для аналізу.

ОЦІНКА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ КЛІТИН ПРИ ПРОТОЧНІЙ ЦИТОМЕТРІЇ, МІКРОСКОПІЇ, КУЛЬТУРАЛЬНИХ ТА БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Прокопюк В.Ю.[1,2], Прокопюк О.С.[1,2], Ткаченко М.О.[1], Шевченко М.В.[1,2], Оніщенко А.І.[1]
[1]Харківський національний медичний університет,Харків, Україна
[2]Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків, Україна
v.yu.prokopiuk@gmail.com

Вступ. Оцінка життєздатності клітин та інтенсивності процесів некрозу й апоптозу є одними з найважливіших параметрів клітинної біології та проточної цитометрії. Саме це дозволяє працювати з життєздатними неушкодженими клітинами. Проте результати різних методів оцінки життєздатності можуть відрізнятися, мати різні властивості та давати похибки. Вибір методу оцінки життєздатності є важливою частиною дослідження.

Метою роботи було порівняння різних методів оцінки життєздатності клітин при проточній цитометрії, мікроскопії, культуральних та біохімічних дослідженнях.

Матеріали та методи. На культурі стовбурових клітин плаценти порівнювали методи оцінки життєздатності та метаболічної активності: застосування барвників трипановий синій, пропідіум йодид, етидіум бромід, 7-аміноактиноміцин D (7AAD), флуоресцеїндиацетат (ФДА), акридин оранж, нейтральний червоний, методи відновлення резазурину, МТТ (3-(4,5-диметілтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід) тест. Життєздатними вважали клітини, що адгезують до пластику при культивуванні, у якості негативного контролю застосовували клітини, девіталізовані етанолом або формальдегідом.

Результати. Виявлено, що найменш точним, але найшвидшим тестом є тест з забарвленням трипановим синім. Застосування акридин оранжу не дозволило отримати стабільні результати. Тести з забарвленням пропідіум йодидом, етидіум бромідом, 7AAD є більш точними, мало відрізняються між собою та можуть бути застосовані при проточній цитометрії та конфокальній мікроскопії. Втім вищезгадані тести, що базуються на виключенні барвника, не дозволяють виділити нежиттєздатні клітини при стабілізації мембран формальдегідом, на відміну від тесту з ФДА, що є позитивним при збережені метаболічних характеристик клітин. Недоліком методу є індикація в діапазоні поширеної мітки FITC (флуоресцеїн ізотіоцианат). Показники МТТ тесту, забарвлення нейтральним червоним та відновлення резазурину залежать не тільки від кількості клітин, але й від метаболічної активності. Найменшу похибку та можливість зберегти клітини життєздатними має тест відновлення резазурину, але він є найбільш часозатратним. Забарвлення нейтральним червоним та МТТ тест можуть бути також використані для візуалізації життєздатних клітин мікроскопічно.

Висновки. Скринінгова оцінка життєздатності клітин може бути проведена шляхом забарвлення трипановим синім з наступним уточненням більш надійним методом, відповідно до цілі дослідження.

ПЕРЕВАГИ ТА НЕДОЛІКИ ПРОТОЧНОЇ ЦИТОМЕТРІЇ У ПОРІВНЯННІ З МЕТОДОМ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

О.О. Салун, О.Л. Павлова, О.О. Гайдукова, А.О.Мінаєва
Кафедра Загальної практики – Сімейної медицини, медичного факультету ХНУ ім. В.Н.Каразіна, м. Харків, Україна

Актуальність: Проточна цитометрія — це сучасна технологія швидкого вимірювання характеристики клітин, їх органел і процесів, які в них відбуваються. Вона являє собою ефективний підхід до вирішення багатьох важливих завдань біології клітини, імунології та клітинної інженерії.

Метою даного дослідження є визначення переваг і недолік проточної цитометрії (ПЦ) в порівнянні з імуноферментним аналізом (ІФА).

Матеріали та методи: Дана робота являє собою огляд наукових досліджень і робіт, які входять в наукові бази, такі як Web of Science.

Результати: Метод ІФА дозволяє виявляти, навіть в мінімальних концентраціях будь-яку речовину, на яку здатна відреагувати імунна система. ІФА порівняно простий в проведенні, досить швидкий і може застосовуватися в режимі Cito! для експрес-діагностики. ІФА — високочутливий і надійний, якщо антиген в зразку є, він буде виявлений, саме той антиген, який шукає дослідник. ПЦ використовується для вивчення гетерогенних популяцій клітин, та вона дозволяє аналізувати субпопуляції клітин. Цей метод не тільки набагато швидше, ніж інші варіанти, але і надає докладні дані. Значною перевагою методу ПЦ у порівнянні з ІФА є можливість аналізувати внутрішньоклітинну експресію антигенів, що досліджуються, у субпопуляціях клітин, що є неможливим за умов використання ІФА.

Використання ПЦ для вивчення однорідних популяцій клітин дозволяє завжди виділяти будь-яку неоднорідність. ПЦ також дозволяє видалити будь-які уламки або мертві клітини при наданні остаточних даних. Цей рівень точності перевершує конкуренцію. Недоліком даного методу є його ціна в порівнянні з альтернативами.

Висновки: Основною перевагою ПЦ у порівнянні з ІФА є можливість аналізу експресії поверхневого або внутрішньоклітинного антигену на рівні клітини з можливістю дискримінації субпопуляцій, які цікавлять дослідників. У той час, ІФА дозволяє лише оцінити вміст розчинених молекул у біологічних рідинах.

ПРОЦЕСИ ЕРИПТОЗУ У ВАГІТНИХ З ПЛАЦЕНТАРНОЮ ДИСФУНКЦІЄЮ НА ТЛІ ГЕСТАЦІЙНОГО ДІАБЕТА

Д.Ю.Тертишник, В.В.Лазуренко, І.Б.Борзенко
Кафедра акушерства та гінекології №2
Харківський національний медичний університет
м.Харків, Україна

Вступ. Гестаційний діабет (ГД) — це гіперглікемічний стан, вперше виявлений при вагітності, який сприяє підвищенню ризиків перинатальної захворюваності та смертності, можливості розвитку цукрового діабету у матері та розладів в розвитку дитини. ГД представляє порушення вуглеводного обміну, яке, якщо його не діагностувати та неадекватно лікувати, призводять до ускладнень вагітності, загрозливих життю матері та плода, ГД призводить до мимовільного переривання вагітності, аномалій розвитку плода, макросомії, прееклампсії, антенатальній загибелі плода, гіпоглікемії новонароджених, гіпербілірубінемії. Відомо, що підвищений рівень глікозильованого гемоглобіну (HbA1c) на протязі першого триместру вагітності прямо пропорційний кількості розвитку ембріопатій (аненцефалії, мікроцефалії, вад серця, нирок та інш.). Наявність ГД у вагітної є значним фактором ризику розвитку плацентарної дисфункції. Плацентарна дисфункція (ПД) - патофізіологічний феномен, що веде до порушення здатності плаценти підтримувати адекватний й достатній метаболізм між матір'ю та плодом, що пов’язано із порушенням функцій плаценти (транспортної, трофічної, ендокринної, метаболічної), які зумовлені морфо-функціональними змінами за ініціації розладів матково-плацентарної перфузії. Роль ериптозу – запрограмованої клітинної смерті еритроцитів – у хворих на ГД та ПД вивчено недостатньо.

Мета дослідження — вивчення інтенсивності процесів ериптозу у вагітних з плацентарною дисфункцією та гестаційним цукровим діабетом для уточнення патогенезу ПД та її ранньої діагностики.

Матеріали та методи. Досліджено 60 вагітних, які поділені на групи: 20 з ГД, 20 — з ПД, 20 — контрольна група. Ериптоз визначався за допомогою проточної цитометрії з використанням анексин V, який було мічено флуорохромом флуоресцеїнізотіоционатом (FITC Annexin V, Becton Dickinson, США). Цей метод дозволяю ідентифікувати молекули фосфатидилсерину у зовнішньому шарі мембрани еритроцитів, транслокація яких назовні спостерігається при ериптозі. Оцінювали відсоток анексин V-позитивних клітин та значення середньої інтенсивності флуоресценції FITC в еритроцитах. Статистична обробка проведена за допомогою програми Statistica 6.0.

Результати дослідження. Проведені дослідження із застосуванням проточної цитометрії продемонстрували, що в групі з ПД показники ериптозу, що досліджуються, вірогідно не змінюються ($p>0,05$). В той же час було виявлено вірогідне зниження інтенсивності процесів ериптозу при ГД в порівнянні з контролем ($p<0,05$), про що свідчить зменшення значень відсотка анексин V-позитивних клітин та значення середньої інтенсивності флуоресценції FITC.

Висновки. Зміни інтенсивності процесів ериптозу за даними проточної цитометрії у вагітних з ГД вказують на перспективність використання цього маркеру для ранньої діагностики ПД та прогнозування перинатальних ускладнень.

ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ЭРИПТОЗА МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ: МИНИ-ОБЗОР

А.С. Ткаченко
Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины
Харьковский национальный медицинский университет
Харьков, Украина

Известно, что запрограммированная клеточная смерть характерна не только для ядросодержащих клеток, но и для эритроцитов. Этот процесс носит название эриптоз и активируется в ответ на целый ряд факторов: энергодефицит, гиперосмолярный стресс, гиперпродукция активных форм кислорода (АФК) и окислительный стресс, увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция, наличие малярийных плазмодиев, действие ксенобиотиков, в первую очередь лекарственных средств. Морфологически эриптоз характеризуется сморщиванием клеток, блеббингом мембраны и транслокацией молекул фосфатидилсерина (ФС) из внутреннего слоя фосфолипидной мембраны в ее наружный слой. Транслокация ФС является ключевым событием эриптоза и опосредуют захват эриптозных клеток макрофагами (эфероцитоз) для их элиминации из кровотока. Активация эриптоза сопровождается повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+}, что приводит к открытию Ca^{2+}-чувствительных калиевых каналов, снижению внутриклеточного хлорида калия и сморщиванию эритроцитов.Следует отметить, что триггером открытия кальциевых каналов могут выступать АФК. Помимо этого, накопление церамида, который представляет собой сфинголипид, состоящий из жирной кислоты и спирта сфингозина, может выступать в роли триггера эриптоза. Увеличение содержания церамида приводит к повышенной хрупкости клеточной мембраны, что снижает жизнеспособность клеток. Это обуславливает эффективность использование определения содержания церамидов в качестве индикаторов эриптоза.

Принимая во внимание все вышеизложенное очевидно, что определение транслокации ФС, а также детекция увеличенного цитозольного уровня Ca^{2+}, гиперпродукции АФК и высокого содержания церамида в клетках, позволяет эффективно оценить интенсивность процессов эриптоза. «Золотым стандартом» оценки интенсивности процессов эриптоза является использования аннексина V, меченного флуоресцеинизотиоцианатом (Annexin V FITC). К преимуществам данного метода является его относительная дешевизна, доступность, простые протоколы пробоподготовки, удобство постсортировочного анализа, универсальность. В то же время анализ генерации АФК, содержания церамида и внутриклеточного кальция методами проточной цитометрии могут использоваться в качестве вспомогательных методом, в том числе и для уточнения механизмов активации эриптоза в конкретно взятом случае.

ОЦЕНКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Н.В. Чуешова[1], Т.В. Потылкина[2], Е.А. Шубенок[1],Е.С. Чуешова[2]
[1]Отдел устойчивости биологических систем, Институт радиобиологии НАН Беларуси, г. Гомель, Беларусь
[2]Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, Беларусь

Введение. Изучение уникальных свойств мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) является перспективным направлением клеточной биологии и медицины. Основываясь на знании о высокой чувствительности стволовых клеток к влиянию различных стресс-факторов, например, воздействие ионизирующего и электромагнитного излучений, курение и т.д., представляется актуальной разработка комплексной оценки морфофункционального состояния ММСК.

Цель исследования. Комплексная оценка морфофункциональной активности ММСКкрасного костного мозга лабораторных животных с применением методов проточной цитометрии.

Материалы и методы. Тканевым источником ММСК являлся красный костный мозгбедренной кости лабораторных животных – самцов крыс линии Вистар в возрасте 4 мес. Аспират красного костного мозга самцов, полученный путем вымывания содержимого бедренной кости раствором фетальной телячьей сыворотки, разделяли путем центрифугирования на градиенте плотности Histopaque-1077. Образовавшееся кольцо ММСК отмывали в PBS-буфере путем щадящего центрифугирования. Проводили анализ клеточного цикла ММСК, их апоптотической активности, микроядерный тест, а также анализ на наличие одно- и двунитевых разрывов ДНК. Измерения проводили на проточном цитометре Cytomics FC 500 (BeckmanCoulter, США).

Результаты. Известно, что пролиферация клеток происходит под воздействием внеклеточных факторов роста и изучение клеточного цикла может являться диагностическим маркером некоторых патологических состояний организма. Зафиксированные ММСК в ледяном 70% этаноле окрашивали раствором, содержащим Propidium iodide (PI) 50 мкг/мл и RNaseA 40 мкг/мл. Подсчитывали процентное содержание клеток, находящихся в G_0/G_1, S, G_2/M фазах.

Тест на наличие микроядер в ММСК является универсальным маркером нарушения клеточного деления или фрагментации ядра во время апоптоза. ММСК обрабатывали пермеабилизирующим раствором, содержащим RNaseA 40 мкг/мл, затем клетки окрашивали раствором, содержащим Ethidium bromide 25 мкг/мл. Подсчитывали количество микроядер на 10 000 ядер.

Во время апоптоза происходит нарушение асимметрии мембранных фосфолипидов, в результате чего наблюдается перемещение фосфотидилсерина на внешнюю сторону мембраны, который связывается с Annexin-V. Суспензию ММСК окрашивали раствором Annexin-V-FITC и PI (50 мкг/мл). Анализировали четыре вида клеток: 1. An^-PI^- – живые клетки; 2. An^+PI^- – ранняя стадия апоптоза; 3. An^+PI^+ – поздняя стадия апоптоза; 4. An^-PI^+–некроз.

Апоптоз сопровождается многочисленными разрывами нитей ДНК под воздействием эндонуклеаз.На первой стадии суспензию клеток подвергали кислотной денатурации, а затем добавлялибуферный раствор, содержащий 6 мг/мл акридинового оранжевого – метахроматический краситель при связывании с двухцепочечной ДНК, испускает зеленую флуоресценцию, а с денатурированной ДНК с одно- и двунитевыми разрывами– флуорохром испускает красную флуоресценцию.

Выводы. Проточная цитометрия является современным высокоинформативным методом оценки морфофункционального состояния ММСК, который позволяет разносторонне анализировать как популяцию клеток, так и каждую клетку в отдельности.

L-АРГІНІН ТА АМІНОГУАНІДИН НОРМАЛІЗУЮТЬ ПРОДУКЦІЮ АКТИВНИХ ФОРМ ОКСИГЕНУ У ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВІ МИШЕЙ З АНТИФОСФОЛІПІДНИМ СИНДРОМОМ

О. З. Яремчук
Кафедра медичної біохімії, Тернопільський національний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна

Мета роботи – оцінити вплив L-аргініну та аміногуанідину на рівень продукції активних форм оксигену (АФО) у лейкоцитах крові вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c з антифосфоліпідним синдромом (АФС).

АФС моделювали за допомогою кардіоліпіну. Дослідних тварин розділили на 10 груп: I, Ia (контроль) – тварини без АФС; II, IIa – тварини з експериментальним АФС; III, IIIa – тварини з АФС, яким вводили L-аргінін (L-Arg, 25 мг/кг); IV, IVa – тварини з АФС, яким вводили аміногуанідин (AG, 10 мг/кг); V, Va – тварини з АФС, яким вводили L-Arg у комбінації з AG. Через 10 діб з моменту підтвердження АФС тварин I–V груп виводили з експерименту, а самок Ia–Va груп спарювали із самцями та виводили з експерименту на 18-й день вагітності. Вміст АФО в лейкоцитах крові оцінювали, використовуючи 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетат у кінцевій концентрації 25 мкмоль/л (Гузик М. М. та ін., 2013). Інтенсивність випромінювання досліджуваних зразків реєстрували за каналом FL1 (515–535 нм) протокового цитофлуориметра CoulterEpics XL («BeckmanCoulter», США), який оснащено аргоновим лазером (λзбудж.=488 нм). Перерозподіл між різними типами лейкоцитів оцінювали за величиною прямого (FS, розмір клітин) та бічного світлорозсіювання (SS, гранулярність клітин).

Встановлено зниження продукування АФО у гранулоцитах та агранулоцитах вагітних та невагітних мишей з АФС. Встановлено перерозподіл між двома основними типами лейкоцитів у невагітних та вагітних мишей за умов АФС із переважанням гранулоцитів. За застосування L-Arg мишам з АФС встановлено подальше зростання кількості гранулоцитів, проте у вагітних мишей, яким вводили L-Arg, кількість гранулоцитів зменшувалася на 23 %, кількість агранулоцитів збільшувалася на 34 % . Введення AG мишам з АФС не впливало на кількість гранулоцитів та агранулоцитіву крові. Встановлено зростання вмісту АФО у гранулоцитах та агранулоцитах мишей з АФС, яким вводили окремо L-Arg чи AG. Комбіноване введення L-Arg та AG мишам з АФС на відміну від їх окремого застосування, більшою мірою зумовлювало нормалізацію вмісту АФО у гранулоцитах та агранулоцитах та відновлення рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів до рівня контролю.

Отже, встановлено зниження продукування АФО у гранулоцитах та агранулоцитах вагітних та невагітних мишей за умов АФС, що сприяє дисфункції імунокомпетентних клітин і синтезу аутоантитіл, ініціації розвитку аутоімунних захворювань. Максимально позитивний вплив L-аргініну та аміногуанідину встановлено при їх комбінованому застосуванні мишам з АФС.

Зміст

A.I. Bezrodna. Investigation by flow cytophluorymetry of the state of rat hepatocytes under the influence of xenobiotics in a subacute experiment 4

U. Kökbaş. Flow cytometry using areas in Turkey 5

A.O. Mazanova, O.O. Lisakovska, O.O. Makarova, I.O. Shymanskyi, M.M. Veliky. Flow cytometric determination of diabetes-related and RANK-mediated oxidative damage to bone marrow cells and evaluation of the effect of vitamin D_3 treatment 6

I. Myrgorodska. Fluorescence activated cell sorting in bottom-up synthetic biology 7

A. Onishchenko, A. Tkachenko, S. Yefimova, U. Kökbaş, I. Vyshnytska, V. Prokopyuk, P. Maksimchuk. UV light-pretreated $GdYVO_4:Eu^{3+}$ nanoparticles promote ROS generation in leukocytes 8

A.Tkachenko, O. Nakonechna, T. Chumachenko, V. Prokopiuk. Food additive E407a does not enhance lipopolysacchride-induced reactive oxygen species generation in peripheral blood mononuclear cells 9

I.A. Vyshnytska, G. Uzoekwe. High complexity flow cytometry application in the measurable residual disease 10

Н.А.Абдулаєва, О.І.Каліновська, В.І.Черепова. Інтенсивність процесів ериптозу при цереброваскулярних захворюваннях у вагітних 11

О.О.Алєксєєва, О.А.Лященко, О.Б.Овчаренко. Значення ериптозу в діагностиці аномальних маткових кровотеч 12

Є.Д.Андросов. Проблеми розділення й ідентифікації клітин 13

Д.О. Бутов, М.О. Ткаченко, Т.С. Бутова. Перспективи використання проточної цитометрії при діагностики туберкульозної інфекції 14

Т.І. Коваленко, М.В. Лахно. Застосування проточної цитометрії з візуалізаційним аналізом у дослідженні впливу трансмембранних білків IFITM на M. tuberculosis 15

О.В. Кудокоцева, И.И. Ломакин. Метод проточной цитометрии в клеточной терапии 16

Н.І. Макєєва, В.В. Андрущенко, В.В. Поляков. Особливості окислювального стресу у дітей з бронхіальною астмою 17

І.В. Новікова, І.М.Медвєдєва. Роль лабораторних методів дослідження в трансплантації солідних органів 18

О.В. Павлович, Т.О. Юрчук, М.П. Петрушко. Можливості проточної цитофлуоріметрії для оцінки пошкоджень сперматозоїдів чоловіків з різним станом сперматогенезу, спричинених кріоконсервуванням 19

Д. Погожих, Р. Блашик, К. Фигейредо. Проточная цитометрия в оценке потенциала клинического применения мегакариоцитов, полученных из ИПСК 20

Т.М. Попова, О.А. Наконечна, О.В. Тіщенко, Л.С. Кривенко. Вплив електронних сигарет на інтенсивність генерації активних форм кисню в лейкоцитах щурів 21

В.Ю. Прокопюк, В.Л. Ткаченко, С.Н. Тонкошкур, А.І. Оніщенко. Порівняння

програмного забезпечення для проточної цитометрії 22

В.Ю. Прокопюк, О.С. Прокопюк, М.О. Ткаченко, М.В. Шевченко, А.І. Оніщенко. Оцінка життєздатності клітин при проточній цитометрії, мікроскопії, культуральних та біохімічних дослідженнях 23

О.О. Салун, О.Л. Павлова, О.О. Гайдукова, А.О.Мінаєва. Переваги та недоліки проточної цитометрії у порівнянні з методом імуноферментного аналізу 24

Д.Ю.Тертишник, В.В.Лазуренко, І.Б.Борзенко. Процеси ериптозу у вагітних з плацентарною дисфункцією на тлі гестаційного діабета 25

А.С. Ткаченко. Оценка интенсивности эриптоза методом проточной цитометрии: мини-обзор 26

Н.В. Чуешова, Т.В. Потылкина, Е.А. Шубенок,Е.С. Чуешова. Оценка морфофункционального состояния мультипотентных мезенхимных стромальных клеток методом проточной цитометрии 27

О.З. Яремчук. L-аргінін та аміногуанідин нормалізують продукцію активних форм оксигену у лейкоцитах крові мишей з антифосфоліпідним синдромом 29

Наукове видання

Харківський національний медичний університет

Збірник тез
Науково-практичної онлайн-конференції з міжнародною участю «Проточна цитометрія в експериментальній та клінічній медицині»