

ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН
України»
Лабораторія епігенетики

**К.К. Мідловець, В.В. Корчева, О.І. Шевчук,
О.О. Барсуков**

ТЕОРІЯ І ПРАКТИКА БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Методичні рекомендації студентам по роботі в
молекулярно-біологічній лабораторії**

Під редакцією Д.С. Красенкова

Київ – 2025

УДК 577.112; 577.113; 577.23; 167.2

Під заг.редакцією к.б.н., Красненкова Д.С.

Автори: Мідловець К.К., Корчева В.В., Шевчук О.І., Барсуков О.О.

У посібнику викладені основи методології наукових досліджень та методичні рекомендації щодо їх проведення. Викладено ключові принципи ведення документації внутрішнього обігу, особливу увагу було приділено веденню лабораторного журналу. Надані правила роботи з біологічним матеріалом та зразками, а також технічні аспекти їх зберігання. Наведені способи піпетування та приготування розчинів. Викладено протоколи проведення молекулярно-генетичних і біохімічних експериментів.

Посібник розроблений для студентів-стажерів молекулярно-біологічних лабораторій, також він буде корисним лаборантам та молодим науковцям.

Рецензенти:

Кирик В.М. — д-р мед. наук, старш. наук. співроб., завідувач лабораторії патофізіології та імунології ДУ "Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України"

Атраментова Л.О. — д.б.н., професор, професор кафедри генетики і цитології Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна

Схвалено до видання Вченою радою ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України» (протокол № 1 від 20.02.2025 р.)

ЗМІСТ

Вступ	4
МЕТОДОЛОГІЯ. ЗАГАЛЬНІ ПИТАННЯ	5
Наука та її складові	5
Методологія. Методи та методики	6
Експеримент та дослід	7
Протокол та схема дослідження	8
Лабораторний журнал	11
Каталог реактивів	14
ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ	16
ТЕХНІКА ПІПЕТУВАННЯ	19
ПРАВИЛА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ	22
ПРОТОКОЛИ	23
Забір зразків	23
Попередня підготовка зразків	23
Робота з культурою клітин	25
Молекулярно-генетичні методи	31
Біохімічні методи	42
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	49

ТЕОРІЯ І ПРАКТИКА БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вступ

Лабораторія епігенетики — це структурний підрозділ сектору біології старіння ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України».

До основних завдань лабораторії епігенетики, як і інституту в цілому, належать: планування та проведення фундаментальних та прикладних наукових досліджень з актуальних проблем медичної науки за профілем діяльності з метою одержання нових наукових знань та їх використання для практичних цілей; створення наукового продукту за результатами наукових досліджень (монографії, підручники, довідники, посібники, статті в наукових виданнях тощо) та розроблення методичних документів з впровадження науково-дослідних розробок у практичну діяльність як наукових установ НАМН України, так і закладів охорони здоров'я іншого підпорядкування; провадження діяльності з медичної практики, надання первинної та спеціалізованої медичної, в тому числі і лікувально-діагностичної допомоги населенню на базі структурних підрозділів Клініки Інституту (зі Статуту установи) [1].

Лабораторія епігенетики займається проведенням робіт у галузі генетики та біохімії: вимірювання рівнів експресії генів, довжин теломер, кількості копій мтДНК; визначенням активності ферментів, концентрацій низькомолекулярних маркерів.

У цьому посібнику наведено протоколи методик, які широко використовуються в лабораторній практиці, а також загальні методологічні зауваження, необхідні для організації дослідницької діяльності, які структурують і систематизують роботу наукових співробітників і лаборантів.

МЕТОДОЛОГІЯ. ЗАГАЛЬНІ ПИТАННЯ

Наука та її складові

Наука — це сфера людської діяльності, що спрямована на вироблення та систематизацію нових знань про природу та суспільство.

Всяку видову науку можна розглядати як цілісну систему, що складається з теорії, власної методології та сукупності прикладних досліджень із впровадження отриманих результатів у широку практику [2]. Перша складова являє собою упорядковану сукупність знань про явища та сутність, закономірності їх прояву та закони здійснення. Теорія являє собою зібрання уявлень про об'єкти та предмети дослідження, а також сукупність зв'язків між ними, за допомогою яких вони приведені у взаємозумовлену систему, яка з одного боку показує момент стійкості у пізнавальному процесі, а з іншого — є спрямовувачем подальшого розвитку. І виступає результатом, а не процесом, теоретичного та емпіричного пізнання. Першим займається насамперед філософія, засоби та принципи теоретичного пізнання та пізнання як такого розробляються гносеологією, епістемологією, логікою, філософською методологією та онтологією. Практичні дії складають основу методології даної науки. Методологія науки (не плутати із вже згаданою філософською методологією) є вченням про способи і засоби наукового пізнання, а з тим — про структуру логічних зв'язків згаданих елементів системи. Складаючи підґрунтя емпіричного пізнання дійсності загалом і об'єктів дослідження зокрема, вона організовує експериментальну діяльність, спрямовану на здобуття нових знань.

Розвиток будь-якої науки багато в чому залежить співвідношення фундаментальних і прикладних досліджень, специфіки впровадження результатів дослідницької діяльності

в повсякденну практику. Під фундаментальними дослідженнями розуміються такі, що ставлять за мету отримання нових знань про явища й об'єкти (їх складові, властивості, сторони, особливості) механізми і закони, що керують ними; фундаментальні дослідження створюють теоретичну базу для досліджень прикладних. [3]. Тобто діяльності, яка спрямована на здобуття та використання знань для розв'язання прикладних проблем, що виникають у сфері практичної діяльності людини [4]. Заключним етапом прикладної науково-дослідницької роботи є впровадження її результатів у практику. Така предметна діяльність спрямована на облаштування та перетворення навколишнього світу; усунення розриву між двома станами: існуючим та бажаним [4].

Методологія. Методи та методики

Методологія — це цілісне вчення в рамках власної науки про систему способів і засобів наукового пізнання, елементами якої є методи та конкретні методики.

Метод — це універсальний та теоретично обґрунтований спосіб впливу на заданий об'єкт з метою отримання даних стосовно певного предмету в межах його існування чи перебування. Метод як предмет методології характеризується двома аспектами: сутністю та принципом. Сутність методу полягає в його призначенні, в спрямованості на рішення завдань конкретного типу [2]. Принцип стосується теоретичних засад, що пояснюють механізми його дії. Це хімічне чи фізичне явище, процес чи ефект, покладений основою його дії. Вони включають фізичні, хімічні та математичні закони, на яких заснований метод [2; 5].

Методика — це конкретизація методу, доведення його до перевіреного способу найбільш доцільного виконання роботи

[4]. Між собою вони відрізняється як метричними показниками впливів на об'єкт або досліджуваний матеріал, так і наявністю—відсутністю деяких операцій, які не змінюють експериментальних умов прояву сутності предмета. Зміна причин їх прояву тотожна зміні методу. Докладний опис послідовності дій, прийомів та операцій із зазначенням всіх розмірностей, протяжностей і тривалостей називається протоколом. Під час відпрацювання методики дослідник неухильно дотримується протоколу.

Експеримент та дослід

Експеримент — це спосіб вивчення об'єкту чи явища, що спирається на активний цілеспрямований вплив на сам об'єкт чи на досліджуваний матеріал, шляхом створення точно встановлених, контрольованих і керованих умов, необхідних для виявлення його ознак і властивостей. Такі умови називаються незалежною змінною [12]. Експеримент може проводитись з метою визначення нових якостей об'єкту (дослідницький експеримент); перевірки правильності теоретичних положень (перевіряючий експеримент); демонстрації явища (демонстраційний чи ілюстративний експеримент) [9]. Основною метою експерименту є перевірка теоретичних положень (підтвердження робочої гіпотези), а також більш широкого і глибокого вивчення теми наукового дослідження [10]. Таким чином він виступає засобом досягнення істини та її доведення. Експеримент дає змогу вивчати явища за різноманітних умов, повторювати необмежену кількість разів за незмінних або за різних обставин. Демонстраційний експеримент або такий, що покликаний закріпити на практиці вже отримані та верифіковані результати, називається дослідом.

Протокол та схема дослідження

Протокол дослідження — це документ, який розробляється колективом науковців у процесі первинного ознайомлення з темою подальших досліджень та перед початком безпосередніх робіт у теоретичній та емпіричній площинах.

В першу чергу формулюються наступні складові протоколу дослідження: актуальність, наукова новизна, теоретичне та практичне значення. Актуальність дослідження — це висвітлення проблеми у теоретичній або практичній діяльності людини; виокремлення суперечностей між бажаним і дійсним, усунення яких було б бажаним. Формування лаконічних положень за цим пунктом і низкою наступних вимагає ознайомлення не тільки із змістом проблеми, а й зі ступенем її розробленості, яке потребує первинного аналізу наявних звітів (тез, статей, монографій тощо) з обраної проблематики. Так окреслюються контури наукової новизни роботи. При складанні схеми дослідження цей пункт доповниться переліком запланованих до виконання вперше в історії розроблення цієї тематики експериментів. Теоретична значущість іноді може включатися в пункт наукової новизни; результати дослідження, знаходячи втілення в наукових положеннях, оцінюються за затребуваністю у доступному для огляду майбутньому, маючи на увазі розвиток наукового знання та можливість реінтерпретації отриманих результатів у подальших дослідженнях. Практична значущість визначається за найменш віддаленим у часі впровадженням результатів дослідження в повсякденній діяльності як оцінка очікуваної затребуваності отриманого результату; навіть поза його змісту за умови достовірності та істинності.

Наступний блок протоколу включає в себе мету та завдання, вибір дизайну дослідження. Мета дослідження встановлює його призначення; спрямовує на вироблення суджень про об'єкт

чи предмет дослідження, які б вирішували певну наукову невизначеність [4; 6; 7]. Завдання дослідження — це конкретні питання, на які мають бути отримані відповіді під час виконання теми [4; 6]. Завдання повинні розглядатись як основні етапи наукового дослідження і спрямовані на послідовне досягнення мети дослідження [6]. Виходячи з цих пунктів обирається дизайн дослідження: до/після, тільки/після, дослід/контроль, випадок/контроль.

Третя група пунктів протоколу складається з об'єкту, предмету та досліджуваного матеріалу. Об'єкт дослідження — це матеріальна або ідеальна системи [4] в визначеному контексті існування. Частіше трактується як матеріальне тіло, явище або процес (тобто не статичне, а динамічне у походженні чи існуванні — як функція, а не річ), що породжує проблемну ситуацію [4; 6; 7; 8]. В об'єкті виділяється його частина, яка є предметом дослідження. Саме на нього спрямована основна увага науковця, оскільки предмет дослідження визначає тему наукового дослідження [6]. Об'єкт і предмет дослідження, як поняття наукового процесу співвідносяться між собою, як загальне і часткове [4]. Визначення досліджуваного матеріалу відбувається паралельно з вибором методів та методик відповідно до завдань дослідження.

Далі в протокол заносяться дані щодо обраних методів та методик, спрямованих на вирішення поставлених завдань; складається список необхідного обладнання та програмного забезпечення, реактивів та витратних матеріалів, оцінюється їхня кількість. При виборі методів визначаються типи первинних даних, відповідно до яких здійснюється підбір статистичних тестів і форми фіксації наукових даних — таблиці, графіки, гістограми, діаграми, фотографії тощо. Усі способи взаємодії з об'єктами і забраним матеріалом співвідносяться з вимогами біоетики. А також технікою безпеки. На цьому етапі окремо

від протоколу складається схема дослідження з розгорнутими коментарями щодо мети та завдань, обґрунтуваннями розмірів груп та викладками на кількості витратних матеріалів. В них же формується збірка усіх протоколів з посиланнями на оригінальні статті.

Останнім у протоколах дослідження прописується календарний план роботи.

Схема дослідження — це каркас дослідження, сукупність методів, розміщених у послідовності проведення через них об'єктів чи досліджуваного матеріалу від їх введення до формування результатів. Оформлюється у вигляді таблиці, блок-схеми, часової стрічки.

Нерідко для звітів за проведенням експериментом їх барвисто оформляють та ілюструють (приклади в посиланнях) [14; 15; 16; 37]. Аналогічним схемам дослідження матеріалом можна вважати блок-схему для відбору досліджень, включених до систематичного огляду (приклади в посиланнях) [17; 18]. Вона надає структуроване і наочне представлення експерименту, її створення особливо актуальне за наявності кількох гілок дослідження або комбінацій діючих факторів. Схема допомагає організувати експериментальні дії, визначити послідовність етапів, продумати контрольні точки й оцінити можливі ризики або змінні, що впливатимуть на результати. Суттєвим моментом у розробці деяких схемах є зазначення часу, що витрачається на проведення конкретних процедур.

Для значного спрощення сприйняття звіту можна ввести перехресні посилання між текстом і схемою, для чого слід пронумерувати на ній усі етапи. Це допоможе підтримувати зв'язок між записами та загальним планом дослідження, дасть змогу швидко повертатися до схеми для уточнення деталей.

Схема методик допомагають під час їхнього відпрацювання чітко дотримуватися протоколу, що мінімізує ймовірність помилок. А водночас вона дає змогу оптимізувати часові витрати та заздалегідь враховувати тривалість окремих етапів експерименту.

Лабораторний журнал

Лабораторний журнал — це документ внутрішнього обігу закладу виконання дослідження. Як і первинні дані він є його власністю. Його основна функція полягає в систематичній фіксації всіх аспектів лабораторних робіт, включаючи цілі, методики, результати та спостереження [13].

Лабораторний журнал має бути структурований таким чином, щоб усі записи легко знаходилися та могли бути проаналізовані у майбутньому. Це включає правильне оформлення і використання заголовків, дат та інших систематизують елементів. Ведення журналу в такий спосіб дозволяє ефективно організувати процес поточного дослідження, а також спрощує повернення до попередніх експериментів задля повторення, аналізу чи реінтерпретації.

Ведення лабораторного журналу є важливим аспектом наукової роботи, забезпечуючи документування всіх експериментів, спостережень та висновків. Культура ведення лабораторного журналу включає кілька ключових принципів та правил, які допомагають зберегти наукову цілісність та забезпечують відтворюваність результатів.

Основні принципи ведення лабораторного журналу:

1. Точність та повнота.

Всі записи повинні бути точними та повними. Необхідне включення всіх деталей експерименту: як формальних (дата,

тривалість, температура тощо), так і технічних (назва методики, використані реагенти (назва, каталожний код, виробник), параметри обладнання тощо), зразки. Первинні данні дедалі частіше зберігаються на електронних накопичувачах; у цьому разі, в лабораторний журнал заноситься ім'я файлу та її положення.

2. Хронологічний порядок.

Ведення журналу відбувається строго в хронологічному порядку. Кожен запис має бути датований. В окремих випадках бажана нумерація сторінок журналу. Записи повинні робитися під час виконання роботи, а не з пам'яті.

3. Незмінність записів.

Всі записи повинні бути зроблені перманентними чорнилами. Помилки слід виправляти шляхом закреслення неправильної інформації так, щоб вона залишалася читабельною, і додавання правильної інформації поруч. У разі виправлення смислової помилки слід виставити дату виправлення та залишити відповідний коментар.

4. Шаблонність виконання записів.

При постановці експерименту за відпрацьованою методикою записи слід вести шаблоно, це попередить технічні помилки при реалізації та полегшить подальший розгляд його перебігу. Запис слід розпочинати з позначення дати проведення роботи.

5. Конфіденційність.

Лабораторний журнал є конфіденційним документом, особливо якщо він містить інформацію, що стосується пацієнтів патентів або комерційних проектів.

Точність та повнота — це ключові аспекти, які визначають якість ведення лабораторного журналу та забезпечують достовірність та відтворюваність наукових результатів.

Усі записи слід робити тільки в ньому. Виривати з лабораторного журналу аркуші — неприпустимо.

Кожен новий запис у журналі повинен починатися із зазначення дати проведення роботи. Ведення в хронологічному порядку допомагає встановлювати послідовність дій та експериментів, полегшує їх пошук та аналіз інформації. Це допомагає відстежувати, коли було виконано кожен етап експерименту. Ведення записів у строгій послідовності забезпечує цілісність даних і дозволяє точно відновити перебіг експерименту у майбутньому.

При виконанні будь-яких розрахунків у рамках приготування реактивів, попередній підготовці зразків, проведення методики, належить наводити в лабораторному журналі всі обчислення та їхні результати. У хімічних, біохімічних лабораторій для ведення журналу беруть загальний зошит у клітинку, у якому одразу ж нумерують усі сторінки; перші 2 сторінки залишають для змісту, який складають по ходу роботи; результати всіх вимірів або інших операцій записують до журналу, використовуючи ліві сторінки; праві сторінки залишають для розрахунків і записів.

Сукупність даних має бути описана максимально докладно для того, щоб будь-який дослідник, ґрунтуючись на записах журналу, зміг відтворити експеримент в ідентичних умовах та отримати ті самі результати.

Фіксація думок, питань, сумнівів та ідей експериментатора в лабораторному журналі є важливою частиною наукового процесу. Ці записи можуть відігравати ключову роль інтерпретації даних, виявленні можливих помилок. Аналіз таких міркувань можуть призвести до формулювання нових гіпотез, які можна буде протестувати у майбутніх експериментах та дослідженнях. Рекомендується включення всіх спостережень, які не погоджуються з очікуваннями дослідників, навіть ті,

які можуть здатися незначними. Дрібні деталі можуть бути критичними для інтерпретації результатів. Коли в лабораторному журналі описуються труднощі, що виникли при відпрацюванні методики, важливо наголосити на конкретних проблемах та їх рішеннях. Це допомагає не лише в документації та аналізі, а й у запобіганні подібним проблемам у майбутньому.

Додатки та вкладення. Будь-які додаткові матеріали, такі як роздруковки протоколів, даних, графіки або фотографії, повинні бути прикріплені до журналу із зазначенням відповідної дати та короткого опису. За потреби слід ввести для них власну нумерацію для створення системи перехресних посилань усередині журналу. Додатки та вкладення мають бути добре закріпленими.

Однак слід пам'ятати, що точність не тотожна багатослівності.

Журнал повинен зберігатися або безпосередньо на робочому місці, або в іншому відведеному для цього місці; винесення журналу за межі інституту заборонено.

Лабораторний журнал є не лише документом, що фіксує етапи та результати експериментів та досліджень, але й інструментом, який допомагає організувати наукову роботу, забезпечуючи її прозорість, систематичність та відтворюваність.

Ведення наукової документації покликане не тільки виконувати організуючу і дисциплінуючу функцію, а й допомагати вченому бути в порядку перед самим собою.

Каталог реактивів

Каталог реактивів — це документ внутрішнього обігу певного підрозділу закладу виконання дослідження. Його ведення забезпечує неперервну фіксацію наявності та списування реактивів, їхнє фізичне положення в лабораторії.

У деяких випадках можливе зазначення обсягів поточного витрачання. Ведення каталогу передбачає привласнення кожному реактиву власного коду, який наноситься на тару зберігання речовини і записується поряд із найменуванням у документ.

Допускається паралельне ведення каталогу на двох носіях: паперовому та електронному. Перший призначений для швидкого пошуку і негайного включення в роботу. Другий — для інвентаризації та систематизації реактивів.

Паперовий каталог являє собою таблицю, що складається з трьох колонок: код реактиву, назва (комерційна або хімічна номенклатурна) і точна вказівка положення до номера полиці або навіть детальніше. Складання такого каталогу відбувається в процесі описування за заданою схемою реактивів послідовно в кожній кімнаті лабораторії.

Електронний каталог так само має вигляд таблиці, її стовпчики: код реактиву, назва (комерційна або хімічна номенклатурна) вказується двома мовами, формула (за потребою), виробник, каталожний код (код каталогу виробника), маса або об'єм під час надходження і точна вказівка положення до номера полиці або навіть детальніше.

Регулярна актуалізація каталогу дозволить забезпечити ефективне управління запасами, уникнути дублювання закупівель та дотримуватися норм зберігання реактивів, техніки безпеки та правил охорони праці.

ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ

В повсякденній лабораторній практиці приготування розчинів займає особливе положення. Від акуратності та правильності приготування залежить точність притримування протоколів, достовірність результатів експериментів та досліджень в цілому.

Кілька суттєвих зауважень щодо приготування розчинів:

1. низку хімічних сполук, передусім неорганічні солі, випускають і зберігають у формі кристалогідратів; у такому разі, якщо концентрація задається у формі молярності (моль/л, М), то слід розуміти, що йдеться саме про кристалогідрат, тобто до розрахунків слід приймати молярну масу солі з кристалізованою водою; і навпаки, коли концентрація задається у формі мг/мл, то в обчисленнях слід робити додаткові дії визначення маси саме солі без кристалізованої води, яка власне і зазначена у співвідношенні мг/мл;

2. для зважування обов'язково використовується спеціальний папір — завдяки гладкій поверхні дає змогу переносити наважки реактиву на ваги та до ємності розчинення.

3. доведення об'єму розчинника слід проводити з урахуванням даних про масу і густину, а не за мітками лабораторного посуду.

У протоколах іноді прописуються рецептури розчинів, найчастіше це стосується багатокомпонентних систем, для яких приведення концентрацій непрактичне, проте здебільшого ставлять саме певні розмірності, які потребують самостійного проведення розрахунків. Особливо часто використовуються такі позначення: v/v, w/v та w/w.

v/v: об'ємне співвідношення речовини А до розчину речовини А до розчину.

w/v: масове співвідношення речовини до об'єму розчину речовини до об'єму розчину.

w/w: масове співвідношення речовини А до розчину речовини А до розчину.

Об'ємна концентрація виражається у % v/v (об'єм/об'єм). Використовується для рідин, щоб показати відношення об'єму розчиненої речовини до загального об'єму розчину.

Концентрація (v/v) = (Загальний об'єм розчину / Об'єм розчиненої речовини) $\times$ 100%.

Прикладом використання такої форми позначення можуть слугувати розчини спиртів.

Масова концентрація виражається у % w/v (маса/об'єм) або концентрація у % m/v. Використовується для опису маси, переважно твердої речовини, розчиненої в заданому об'ємі розчину.

Концентрація (w/v) = (Маса розчиненої речовини / Об'єм розчину) $\times$ 100%.

Прикладом використання такої форми позначення можуть слугувати розчини неорганічних солей (фізіологічний розчин — 0,9% NaCl готується шляхом розчинення 0,9 г NaCl в 100 мл води), деяких антибіотиків (0,05% хлоргексидин — 100 мл препарату містять розчину хлоргексидину диглюконату 20 % — 0,25 мл).

Масова частка виражається у % w/w (маса/маса). Використовується для твердих речовин, показує відношення маси розчиненої речовини до загальної маси розчину (суми мас всіх компонентів.).

Концентрація (w/w) = (Маса розчиненої речовини / Загальна маса розчину) $\times$ 100%.

Прикладом використання такої форми позначення можуть слугувати розчини неорганічних солей.

Розведення спиртів — одна з важливих операцій у хімічній та біохімічній лабораторній практиці. Для цього використовують таблицю Фертмана [11], яка показує об'єми води та етанолу, необхідних для приготування розчинів із заданою концентрацією етанолу у відсотках за обсягом (Табл. 1).

Таблиця 1.

Таблиця для одержання спирту різної міцності при 20°C

Міцність спирту, що розводиться (1000 об'ємів)	Бажана міцність розведеного спирту													
	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%	70%	75%	80%	85%	90%	
35 %	167													
40 %	335	144												
45 %	505	290	127											
50 %	674	436	255	114										
55 %	845	583	384	229	103									
60 %	1017	730	514	344	207	95								
65 %	1189	878	644	460	311	190	88							
70 %	1360	1027	774	577	417	285	175	81						
75 %	1535	1177	906	694	523	382	264	163	76					
80 %	1709	1327	1039	812	630	480	353	246	153	72				
85 %	1884	1478	1172	932	738	578	443	329	231	144	68			
90 %	2061	1630	1306	1052	847	677	535	414	310	218	138	65		
95 %	2239	1785	1443	1174	956	779	629	501	391	295	209	133	64	

Цифра в місці перетинання горизонтального і вертикального рядків вказує об'єм води при 20°C, який варто додати до 1000 об'ємів спирту наявної міцності при 20°C для отримання потрібного розведення.

ТЕХНІКА ПІПЕТУВАННЯ

Піпетування — це лабораторна техніка, яка використовується для точного вимірювання та перенесення певних об'ємів рідин за допомогою спеціального інструменту — піпетки або механічного дозатору (смплера).

У біологічних лабораторіях молекулярно–генетичної, біохімічної, цитологічної спрямованостей використовуються піпетки Пастера, механічні дозатори та дозатори–контролери різних об'ємів.

Піпетки Пастера — це переважно одноразові пластикові піпетки, що використовуються для перенесення невеликих об'ємів рідин. У лабораторних задачах, що вимагають високої точності, їх використання не допускається. При роботі з органічними розчинниками слід звернути увагу на можливе забруднення стокових та робочих розчинів через поступове розчинення корпусу піпетки такими речовинами.

Механічні дозатори (samplers) — це механічні або електронні прилади, які призначені для автоматичного або напівавтоматичного відбору та дозування рідин. Найчастіше використовують одноканальні мікропіпетки з конструкцією типу повітряного витіснення (air displacement pipettes), у яких під час натискання на кнопку поршня виставлений за допомогою спеціального регулятора фіксований об'єм повітря витісняється з робочого каналу, а при її відпусканні в наконечник мікропіпетки засмоктується відповідний об'єм рідини.

Дозатори–контролери (pipette fillers) — це електронні прилади для перенесення відносно великих об'ємів рідин. В біологічних лабораторіях використовуються переважно при заміні поживного середовища культури клітин. Наконечниками цих дозаторів слугують градуйовані піпетки.

Декілька загальних моментів щодо роботи з механічним дозатором та техніки пікетування:

1. Наконечники продаються в пакетах, вежах (tower stacked) або власних штативах. Здебільшого, вони універсальні, тобто вони підходять не тільки для мікропіпеток, а й для штативів різних виробників.

2. Заповнення штатива завжди проводять у рукавичках, чи то набір наконечників із пакета, чи то заміна порожньої стійки (racks) штатива на нову з набору вежі.

3. Наконечник має щільно прилягати до посадкового конуса смплера, що досягається легким, але впевненим, натисканням смплера під час його приєднання. Одна рука тримає мікропіпетку строго вертикально, друга — притримує короб штатива.

4. Після виставлення об'єму проводиться забір рідини. Спершу слід натиснути до першого упору кнопку поршня, далі під прямим кутом до поверхні розчину наконечник занурити в рідину. У деяких випадках у міру забору рідини та зменшення її об'єму в ємності слід поступово занурювати наконечник, залишаючи приблизно однакову відстань від його кінця до межі розділу фаз. Це запобігатиме забору повітря, надмірному налипанню рідини на зовнішню поверхню наконечника та захопленню матеріалу, непризначеного для наступних етапів методики.

5. Після занурення слід плавно відпустити кнопку поршня. Не допускається контакт набраної рідини з фільтром наконечника.

6. Таким же поступовим рухом наконечник витягується з рідини, сам же смплер підіймається над ємністю. Не допускається перевертання смплера носиком догори: це запобігатиме потраплянню всередину рідини, пилу або інших часточок.

7. Після відбору рідини слід оглянути наконечник. Рідину, що пристала, знімають об внутрішні стінки ємності.

8. Випускаючи рідину, слід доторкнутися наконечником до стінки приймальної посудини. Залежно від методики і типу ємності натискають до першого (плоскодонний, імунологічний, планшет для спектрофотометрії) або до другого упору (пробірки різних типів і виконань, планшети з напівсферичним або конічним дном, серологічні).

9. Для запобігання перехресному забрудненню використовують нові наконечники для кожного зразка, особливо при приготуванні розчину (стокового або робочого) або реакційної суміші. Це одноразовий витратний матеріал. Наконечник зазвичай видається без прямого контакту, за допомогою натискання кнопки скидача наконечника.

Серійне піпетування призначене для багаторазового дозування одного і того ж об'єму рідини. Відрізняється від описаного вище способу збереження кнопки поршня в положенні першого упору після виймання наконечника з рідини до занурення його в робочий розчин для нового її забору.

Пухирці повітря в реакційній суміші збиваються трьома способами (інколи в комбінації): розмішуванням на мініцентрифусі–вортексі у двох режимах, постукуванням пальцем по пробірці та повітряним потоком другого упору.

Утилізація наконечників як і пробірок здійснюється скиданням наконечника у спеціальні (настільні) смітнички. Важливим моментом є відсутність рідини у перших та закрита кришка у других.

ПРАВИЛА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зберігання та облік зразків відіграють важливу роль у забезпеченні їх цілісності та достовірності результатів досліджень. Правильна організація цього процесу гарантує відповідність роботи в лабораторії встановленим стандартам і виключає ризик втрати чи псування матеріалів. Їх порушення може призвести до унеможливлення проведення методики або до хибнонегативних чи хибнопозитивних результатів експерименту.

Зберігання зразків здійснюється з суворим дотриманням правил, які вказуються зазвичай у протоколах методик забору, попередньої підготовки та аналізу зразків. Залежно від типу зразка і тривалості зберігання підбирають один з чотирьох температурних режимів: $+4^{\circ}\text{C}$ (холодильник), -20°C (морозильна камера), -80°C (кельвінатор, ULT freezer) і -196°C (сосуди Дьюара).

Зразки зберігаються переважно у пробірках різних типів та об'ємів: біологічні пробірки, вакуутайнери, пробірки типу Falcon та типу Eppendorf, кріопробірки. Підписування здійснюється або перманентним маркером, або на окремому папірці, який подальше закріплюється на ємності зі зразком попередньо розтягнутою герметизуючою плівкою PARAFILM. На ємності зазначається вся необхідна інформація: номер зразка, його тип (DNA, RNA, cDNA, PBMCs тощо) дата забору; за необхідністю: концентрація, номер циклу заморожування–розморожування тощо. При формуванні наборів зразків для сумісного зберігання позначення наносяться на пакети zip-lock, бажаним також є вкладання паперової картки в сам пакет. При заморожуванні зразків застібка не має бути закритою до упору — це попередить розрив пакета.

ПРОТОКОЛИ

Обладнання: сэмплери (Thermo Fisher Scientific, США), одноразові наконечники, мікропробірки типу Eppendorf, біологічні пробірки (5 мл), пробірки типу Falcon (15 та 50 мл), культуральні флакони, камера Горяєва та покривні скельця, центрифуга (ELMI CM-6M), мініцентрифуга-вортекс «Мікроспін» FV-2400 (Biosan, Латвія), магнітна мішалка з підігрівом MS400 (Bante), шейкер, термостат типу «Драй-блок» TDB-120 з блоком А-103 (Biosan, Латвія), центрифуга (Eppendorf 5424, Німеччина), настільна центрифуга при 4°C з охолодженням (Eppendorf 5417R, Австрія), ампліфікатор Bio-RAD Chromo4, термостат, ламінарна шафа, витяжна шафа, мікроскоп.

Nota bene! Для оптимального використання центрифуги необхідно правильно встановити RCF (відносну відцентрову силу), яка вимірюється в g, або RPM (оберти за хвилину).

1.1. Забір зразків

Кров пацієнтів відбирають по 4 мл у вакутайнери з антикоагулянтом K₂EDTA. Потім зразки переміщують в кельвінатор з температурою –80°C для тривалого (більше 1 тижня) зберігання.

1.2. Попередня підготовка зразків

1.2.1. Попередня підготовка зразків. Отримання PBMCs

Плазму та PBMCs від клітин крові відокремлюють не пізніше, ніж через 30 хв. після забору крові.

1. У біологічні пробірки наливають по 2 мл Histopaque (Sigma, H8889-100ML, USA), обережно по стінці нашаровують кров (2–3 мл).

2. Центрифугування 800 g протягом 30 хв.

3. Еритроцитарна маса опускається, плазма лишається вгорі, RBCs у вигляді білого прошарку знаходиться між ними. Відбирають плазму; потім — RBCs у окрему мікропробірку типу Eppendorf із 1 мл PBS.

4. Перемішують вміст пробірки з RBCs.

5. Центрифугування 800 g протягом 30 хв.

6. Збирають надосадову рідину.

7. Заморожують клітин в кельвінаторі з температурою – 80°C для тривалого (більше 1 тижня) зберігання.

1.2.2. Попередня підготовка зразків. Очищення плазми крові

Очищення плазми здійснюється після її розмороження шляхом центрифугування 10 000 g протягом 15 хв. при 4°C. Після чого в окрему мікропробірку типу Eppendorf переносять над осадову рідину (очищену плазму).

1.2.3. Попередня підготовка зразків. Отримання гемолізату

Отримання гемолізату проводиться шляхом осмотичного гемолізу цільної крові дистильованою водою 1:9 (v/v) та одноразовим циклом заморожування [19; 20].

Приготування гемолізату з еритроцитарної маси передбачає доведення її об'єму до 4 мл фізіологічним розчином з наступними стандартними операціями.

1.2.4. Лізис RBMCs

Лізис RBMCs проводиться у PBS у співвідношенні 1:1 (v/v) на льоду шляхом механічного розтирання. Після лізису вони поміщаються у PBS у співвідношенні 1:19 (v/v).

1.3. Робота з культурою клітин

1.3.1. Загальні питання дотримання стерильних умов

Робота в культуральному боксі передбачає суворе дотримання умов стерильності. Які, з одного боку, попереджають негативний вплив чинників фізичної, хімічної та біологічної природи на співробітників лабораторії, а з іншого — запобігають контамінації культур.

Робота в культуральному боксі здійснюється співробітникам, одягненими відповідно до виконуваного типу робіт, а саме: халат, рукавички без пудри, маска, шапочка, змінне взуття. Усі елементи робочого костюма, за винятком останнього, є одноразовими; взуття за межі передбоксу не виноситься. Перед початком роботи слід обробити приміщення, а також поверхню ламінарного боксу УФ-лампю не менше 30 хвилин.

Приступаючи до роботи слід обробити руки (в рукавичках) 70% етанолом: перший раз під час входу в бокс, другий раз — перед безпосереднім початком роботи в ламінарі. Після вимкнення УФ-лампи ламінарного боксу потрібно увімкнути витяжку та обробити дезінфікуючим розчином робочу поверхню в напрямку від задньої стінки до себе. При внесенні витратних матеріалів, інструментів, флаконів із біоматеріалом їхні поверхні або поверхні їхніх упаковок так само слід обробити 70%

етанолом. Під час роботи в ламінарному боксі руки слід тримати на відстані 10–20 см від переднього краю.

1.3.2. Інактивація FBS

1. Температура водяної бані доводиться до 56°C. Для інактивації FBS вона не повинна бути вищою за 57,5°C і нижчою за 54,5°C.

2. Внесення пляшки з FBS у нагріту воду таким чином, щоб рівень води покривав весь об'єм FBS.

3. Перемішування FBS кожні 5 хвилин.

4. Через 30 хвилин пляшку дістають із води.

5. Після вирівнювання температури FBS з кімнатною, роблять аліквоти у стерильних умовах.

6. Зберігають FBS при температурі –20°C до закінчення терміну придатності.

1.3.3. Розморожування культури клітин

Реактиви: DMEM.

1. Перед початком роботи реактиви потрібно поставити в термостат з температурою 37°C.

2. Внесення 15 мл підігрітого поживного середовища (DMEM) у флакон (площа поверхні 75 см²) з розрахунку на подальше культивування клітин, враховуючи щільність посадки певної клітинної лінії.

3. Флакон з DMEM поміщається у CO₂-інкубатор.

4. Внесення 10 мл повного середовища в стерильну 15 мл центрифужну пробірку типу Falcon.

5. Зразки дістають з судів Дьюара, де клітинні лінії зберігаються у рідкому азоті.

6. Розморожують зразки у воді з температурою 37°C до появи крижинки округлої форми, що вільно плаває. Далі розморожування йде при температурі 20°C.

7. Використовуючи стерильну піпетку Пастера, вміст кріопробірки зі зразком переносять у пробірку типу Falcon з 10 мл DMEM. Це роблять у ламінарному боксі, попередньо обробивши кріопробірку 70% етанолом.

Nota bene! Для меншого пошкодження клітин, техніка перенесення вмісту кріопробірки полягає у наступному: піпеткою Пастера відбирається приблизно 0,5 мл DMEM (з пробірки типу Falcon), обережно додається до вмісту кріопробірки, після чого зразок з невеликою кількістю поживного середовища переноситься у пробірку типу Falcon (для центрифугування).

8. Центрифугування при 200 g/rcf (1000 об/хв) протягом 4 хв.

9. Після центрифугування пробірки типу Falcon, попередньо обробивши 70% етанолом, повертають у ламінарним бокс та видаляють надосадову рідину. Осад ресуспендують в 1 мл підігрітого середовища.

10. Клітинну суспензію переносять у флакон для культивування. Для рівномірного розподілу культури клітин флакон акуратно нахилиють у різні боки, не допускаючи контакту середовища з фільтром на кришці флакону. Та переносять у CO₂-інкубатор з температурою 37°C та рівнем CO₂ у 5%.

1.3.4. Пасажування культури клітин

Пасажування здійснюється в рамках ведення культури для заміни поживного середовища та контролю чисельності клітин.

Реактиви: DPBS, FBS, DMEM, розчин трипсину.

1. Перед початком роботи реактиви потрібно поставити в термостат з температурою 37°C.

2. Внесення 15 мл підігрітого поживного середовища (DMEM) у флакон (площа поверхні 75 см²) з розрахунку на подальше культивування клітин, враховуючи щільність посадки певної клітинної лінії.

3. Флакон з DMEM поміщається у CO₂-інкубатор.

4. За допомогою дозатора-контролера з культурального флакона з клітинами видаляється поживне середовище, частина середовища (10 мл) переноситься в пробірку типу Falcon.

5. Додається 5 мл DPBS (з розрахунку на флакон з площею поверхні 75 см²) та омивається поверхня культивування, після чого розчин видаляється.

6. Додається 0,7–3 мл розчину трипсину та омивається поверхня культивування.

7. Інкубація протягом 3 хв. при 37°C в термостаті. Перевірка проводиться кожні 30 с.

Nota bene! Кінець трипсинізації визначається округленням клітин та їх відкріпленням від культуральної поверхні, що визначається за допомогою світлової мікроскопії.

8. Додається у половинному об'ємі розчину трипсину FBS (0,35 мл). По закінченню інкубування флакон струшується постукуваннями по бічним стінкам або додається 3х об'єм

поживного середовища з FBS (відлитого у пункті 2) по відношенню до об'єму трипсину.

9. Плавним ресуспендуванням, змити залишки клітин на стінці культурального флакону, використовуючи серологічну піпетку та піпет-дозатор.

10. Перенесення у чисту пробірку типу Falcon вмісту культурального флакону.

11. Центрифугування 200 g 4 хв. Після чого відбирають надосадову рідину.

12. Ресуспендування клітин в 1 мл DMEM.

13. Підрахунок клітин. Для цього використовують камеру Горяєва. Покривне скло камери Горяєва притирають до камери за допомогою краплі етанолу до появи ньютонівських кілець. Суспензію клітин вносять під покривне скло навпроти полів підрахунку клітин (2 або 4). Підраховують кількість клітин у 25 великих квадратах сітки та визначають середню кількість клітин на поле. Число клітин в 1 мл вихідної суспензії розраховують за формулою: $N = \bar{n} \times 2,5 \times 10^5$, де N — кількість клітин в 1 мл суспензії; $\bar{n}$ — середнє арифметичне кількості клітин в 4 полях; 2,5 — коефіцієнт камери Горяєва; 10^5 — множник для отримання кількості клітин в 1 мл.

14. Відбирається відповідний об'єм суспензії з кількістю клітин з розрахунку на щільність посадки відповідної клітинної лінії і переноситься у підготовлений культуральний флакон (пункт 2-3).

1.3.5. Заморожування культури клітин

Реактиви: DPBS, FBS, DMEM, розчин трипсину, DMSO.

1. Перед початком роботи реактиви потрібно поставити в термостат з температурою 37°C.

2. За допомогою дозатора-контролера з культурального флакона з клітинами видаляється поживне середовище, частина середовища (10 мл) переноситься в пробірку типу Falcon.

3. Додається 5 мл DPBS (з розрахунку на флакон з площею поверхні 75 см²) та омивається поверхня культивування, після чого розчин видаляється.

4. Додається 0,7–3 мл розчину трипсину та омивається поверхня культивування.

5. Інкубація протягом 3 хв. при 37°C в термостаті. Перевірка проводиться кожні 30 с.

Nota bene! Кінець трипсинізації визначається округленням клітин та їх відкріпленням від культуральної поверхні, що визначається за допомогою світлової мікроскопії.

6. Додається у половинному об'ємі розчину трипсину FBS (0,35 мл). По закінченню інкубування флакон струшується постукуваннями по бічним стінкам або додається 3х об'єм поживного середовища з FBS (відлитого у пункті 2) по відношенню до об'єму трипсину.

7. Плавним ресуспендуванням, змити залишки клітин на стінці культурального флакону, використовуючи серологічну піпетку та піпет-дозатор.

8. Перенесення у чисту пробірку типу Falcon вмісту культурального флакону.

9. Центрифугування 200 g 4 хв. Після чого відбирають надосадову рідину.

10. Ресуспендування клітин в 1 мл DMEM.

11. Підрахунок клітин.

12. Центрифугувати клітинну суспензію 200 g/rcf (1000 об/хв) протягом 4 хв.

13. Приготування кріосередовища, яке складається з 10% розчину DMSO в FBS.

14. Видалення надосадової рідини.

15. Поступове внесення по краплі кріосередовища в об'ємі, відповідному для подальшого заморожування $1-1,5 \times 10^6$ клітин на кріопробірку.

16. Ресуспендування осаду в кріосередовищі.

17. Аліквотування підготовленої до заморожування культури клітин.

18. Кріопробірки поміщаються спочатку у холодильник на $+4^{\circ}\text{C}$ на 1 годину, потім переносяться у морозильник на -20°C на 2 години, потім в кельвінатор. Наступного дня кріопробірки заморожуються у рідкому азоті.

1.4. Молекулярно-генетичні методи

1.4.1. Виділення ДНК

Для виділення ДНК із лейкоцитів застосовується метод фенол-хлороформної екстракції [20].

Реактиви: лізуючий буфер (5мМ Tris-HCl, pH 7,6, 25 мМ етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA), pH 8,0), 5М NaCl, 10% додецилсульфат натрію (sodium dodecyl sulfate, SDS), протеїназа К (New England Biolabs, США), 3М ацетат натрію, pH 7,5, суміш 25:24:1 фенол : хлороформ : ізоаміловий спирт (фенол — Thermo Fisher Scientific, США; хлороформ — Lotte, Корея; ізопропанол — INEOS, Німеччина), 70% етанол, деіонізована вода.

Протокол виділення ДНК:

1. Розморожують зразків крові при 20°C .

2. Вносять 300 мкл цільної крові кожного зразка у пробірки типу Eppendorf об'ємом 1,5 мл. Готували розчин для лізису на усі зразки за схемою, наведеною у таблиці (Табл. 2).

Таблиця 2.

Рецептури розчину для лізису				
Компонент, мкл	1	6	10	13
Буфер для лізису	300	1800	3000	3300
SDS	66	396	660	858
Протеїназа К	1	6	10	13

3. Додають в пробірки типу Eppendorf з пробами по 366 мкл розчину для лізису. Інкують пробірки при 55°C протягом 2 год.

4. Інкують зразки протягом 10 хв. при 95°C. Обережно відкривають кришки пробірок типу Eppendorf від себе для скидання надлишкового тиску.

5. Центрифугування при 12 000 g 10 хв., потім відбирають супернатант у нові підписані пробірки типу Eppendorf, а осад викидали. Якщо осаду не було або було мало, то працюють з цими ж пробірками.

6. Додають 66 мкл ацетату натрію (3М, рН 7.5), перемішують.

7. Додають рівний об'єм суміші (~ 600 мкл) 25 : 24 : 1 відповідно фенол : хлороформ : ізоаміловий спирт. Обережно перемішують інвертуванням, поки розчин не ставав однорідним.

8. Центрифугування при кімнатній температурі зі швидкістю 12 000 g 10 хв. Відбирають верхню фазу у чисті пробірки типу Eppendorf. Додають рівний об'єм хлороформу ~600мкл.

9. Центрифугування при кімнатній температурі зі швидкістю 12 000 g 10 хв. У чисті пробірки типу Eppendorf вносять по 20 мкл 5M NaCl і відбирають у них верхню фазу.

10. Додають 1 об'єм холодного (-20°C) ізопропанолу. Змішують, перевертаючи пробірку типу Eppendorf, принаймні, 30 секунд. Під час цього можна спостерігати формування видимої маси мутних ниткоподібних ДНК. Якщо осад не було видно через фрагментацію ДНК, зразок залишають при -20°C протягом 2-х год. або на ніч, щоб осадити ДНК перед центрифугуванням. За необхідності можна зберігати при температурі -20°C до подальшого використання.

11. Центрифугування при кімнатній температурі на максимальних обертах 30 хв. Як невеликий білий осад на дні пробірки типу Eppendorf має бути видимим ДНК.

12. Декантування супернатанту. Осад ДНК залишають на дні пробірки типу Eppendorf.

13. Промивають осад ДНК з 1 мл 70% етанолу кілька разів. Центрифугування при кімнатній температурі при 5000 g 1 хв.

14. Видалення більшості супернатанту та просушування осаду при 65°C , але важливо не пересушити, адже зневоднення ДНК може викликати денатурацію.

15. Для регідратації ДНК сухий осад ресуспендують у 50 мкл деіонізованої H_2O . За великих концентрацій, ДНК продовжуватиме розчинятися протягом 1–2 днів.

16. Зберігають при 4°C протягом тижня, або довготривало при -20°C .

Якість зразків ДНК оцінюють шляхом перевірки його спектрів поглинання, обчислюючи коефіцієнт поглинання при 260–280 нм, оптимальне значення якого становить 1,8–2,0. Дуже низьке його значення ($<1,6$) може свідчити про значне забруднення білком, а дуже високе ($> 2,0$) — про значне

забруднення РНК. Використовують спектрофотометр для мікрооб'ємів 0,5–2,0 мкл (DeNovix, США).

1.4.2. Виділення РНК

Для виділення РНК з культури клітин НЕК-293 застосовується метод екстракції хаотропними солями.

Реактиви: TRIReagent (суміш гуанідинтіоціанату і фенолу) (Invitrogen, США), хлороформ (Lotte, Корея), 100% ізопропанол (INEOS, Німеччина), 75% етанол, RNA buffer.

Протокол виділення РНК:

1. Розморожують зразки у воді з температурою 37°C до появи крижинки округлої форми, що вільно плаває. Далі розморожування йде при температурі 20°C. Переміщують зразок у пробірку типу Eppendorf.

2. Центрифугування при 5000 g 7,5 хв., потім видаляють супернатант.

3. Додають до осаду 400 мкл TRIReagent та перемішують на мініцентрифугі-вортексі у двох режимах.

4. Інкубація протягом 5 хв. при температурі 20°C.

- 5 (за потреби). Центрифугування при 12 000 g 10 хв. при 4°C.

Nota bene! Осад — це ДНК та інші погано розчинні біополімери та молекули. Супернатант — це РНК.

6. Додають 80 мкл хлороформу. Змішують вручну перевертанням пробірки типу Eppendorf.

7. Інкубація протягом 15 хв. при температурі 20°C.

8. Центрифугування при 12 000 g 15 хв. при 4°C, потім відбирають верхню фазу до чистої пробірки типу Eppendorf.

Nota bene! Кінчик наконечника сэмплера має знаходитись майже на межі розділу фаз рідина — газ.

9. До отриманих ~ 150 мкл зразка додають 200 мкл 100% ізопропанолу та перемішують на мініцентрифугі-вортексі у двох режимах, останній протягом 10 с.

Nota bene! Об'єм 100% ізопропанолу має бути в 2 рази меншим, ніж об'єм TRIReagent.

10. Інкубація протягом 7 хв. при температурі 20°C.

11. Центрифугування при 12 000 g 8 хв. при 4°C (або за кімнатної температури 20–25°C), потім видаляють супернатант.

12. Додають 400 мкл 75% етанолу (холодний), трохи промивають осаду перевертаннями пробірки типу Eppendorf.

Nota bene! 75% етанол для виділення РНК має зберігатися в холодильнику при 4°C.

13. Центрифугування при 7500 g 5 хв. при 4°C (або за кімнатної температури 20–25°C)

14. Підсушування осаду (це РНК) у термоблоці при 37°C під витяжкою.

15. Додають 50 мкл RNA Buffer та перемішують на мініцентрифугі-вортексі у двох режимах

Якість зразків РНК оцінюють шляхом перевірки його спектрів поглинання, обчислюючи коефіцієнт поглинання при 260–280 нм, оптимальне значення якого становить ~2,0. Використовують спектрофотометр для мікрооб'ємів 0,5–2,0 мкл (DeNovix, США).

1.4.3. Визначення відносної середньої довжини теломер

Визначення довжин теломер лейкоцитів проводиться за методом Monochrome Multiplex Quantitative PCR Telomere Length Measurement (MMqPCR), що був запропонований R.Cawthon [21]. Сутність методу полягає у визначенні відносної середньої довжини теломер [22]. Метод полягає в застосуванні пари теломерних праймерів, які містять mismatches, що унеможлиблює додавання полімеразою нуклеотидів у разі утворення димерів праймерів.

Протокол MMqPCR [22]:

1. Приготування реакційної суміші, до складу якої входять наступні реактиви (надана рецептура на один зразок):

- 5М бетаїн (4 мкл),
- праймери telg і telc (кінцева концентрація 450 нмоль кожна), а також пара альбуміну праймери albu та albd (кінцева концентрація кожного 250 нмоль) (2 мкл кожного; сумарно — 4 мкл),
- вода деіонізована (5,8 мкл),
- 25 mM MgCl₂ (1 мкл),
- (2,5 ×) MasterMix (4 мкл) (Solis BioDyne HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (no ROX), 5×, Estonia),
- барвник SYBR Green I (0,2 мкл).

Порядок внесення: бетаїн, праймери, вода, MgCl₂, MasterMix, SYBR Green I.

1.1. Nota bene! Розчин SYBR Green I не має бути старішим за 2 тижні.

1.2. Nota bene! Приготування робочого розчину барвника SYBR Green I передбачає розведення комерційного stock reagent

($\times 10\ 000$) до ($\times 100$). Після приготування розмішати на мініцентрифузі-вортексі у двох режимах.

1.3. *Nota bene!* Приготування робочого розчину праймерів передбачає розведення комерційних в наступних рецептурах:

Alb = 2 albd + 2 albu + 96 H₂O

Tel = 4 telu + 4 telc + 92 H₂O.

Після приготування розмішати на мініцентрифузі-вортексі у двох режимах.

1.4. *Nota bene!* Перед внесенням у реакційну суміш потрібно перемішати на мініцентрифузі-вортексі у двох режимах наступні реактиви: бетаїн, праймери та барвник. А також самі зразки.

Список праймерів, які використовували для ММqPCR, наведено у табл. 3.

Таблиця 3

Список праймерів для ММqPCR	
Праймери	Послідовність нуклеотидів праймера
telg	5'– ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT –3'
telc	5'– TGTTAGGTATCCSTATCCSTATCCSTATCCSTATCCCTAA CA–3'
albd	5'– GCCCCGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGGAAAAGCATGGT CGCCTGTT– 3'
albu	5'– CGGCGGCGGGCGGCGCGGGCTGGGCGGAAATGCTGCAC AGAATCCTTG–3'

2. Для постановки ММqPCR у планшети по 8 мікропробірок, сумісних з ампліфікатором Bio-RAD Chromo4, вносять 19 мкл реакційної суміші і 1 мкл ДНК зразка.

2.1. *Nota bene!* Перед рознесення реакційної суміші по мікропробірках типу Eppendorf готується негативний контроль (No-Template Control (NTC), Negative Control): спочатку вноситься 1 мкл H_2O , потім — 19 мкл реакційної суміші.

2.2. *Nota bene!* Після приготування кінцевого розчину потрібно перемішати на мініцентрифугі-вортексі у двох режимах.

2.3. *Nota bene!* Усі зразки аналізуються в серіях по три випробування (у триплетах (triplicates)).

3. Профіль термоциклювання був наступним:

1 цикл $95^{\circ}C$ – 15 хв.;

2 цикли: $95^{\circ}C$ – 15 с та $49^{\circ}C$ – 15 с;

40 циклів: $95^{\circ}C$ – 15 с, $62^{\circ}C$ – 10 с, $74^{\circ}C$ – 15 с, $84^{\circ}C$ – 10 с, $88^{\circ}C$ – 15 с;

56 циклів від $70^{\circ}C$ по 5 с при кроці в $0,5^{\circ}C$ з отриманням сигналу на кожному етапі.

4. Для формування калібрувальної кривої ММqPCR проводять для чотирьох концентрацій еталонної ДНК (у двох примірниках), які охоплюють діапазон 27-кратних серійних розведень [23]. Далі шляхом корегування порога (threshold) вибирають значення R^2 для калібрувального регресійного лінійного рівняння: для теломер $R^2 > 0,99$, для альбуміна $R^2 > 0,98$. Далі порогові числа циклів (cycle threshold (Ct)) підставляються в регресійне рівняння в логарифмічній формі. Для кожного триплету вираховують середнє значення.

Криві ампліфікації генерується програмним забезпеченням OpticonMonitor 3. Для цього після термоциклювання та збору

вихідних даних за допомогою програмного забезпечення OpticonMonitor 3 для кожної постановки будують дві стандартні криві: для теломерного сигналу (T) і для гена сигналу однокопійного гена (single-copy gene, scg) альбуміну (S) [22; 23; 24]. Відносну довжину теломер розраховують як відношення T/S, де T — число теломерних повторів, а S — число повторів гену альбуміну [25–29].

1.4.4. Визначення відносної кількості копій мтДНК

Для визначення кількості копій мтДНК (Mitochondrial DNA Copy Number, mtDNA-CN) був застосований метод MMqPCR.

Протокол MMqPCR [30; 31]:

1. Приготування реакційної суміші, до складу якої входили наступні реактиви (надана рецептура на один зразок):

- 5M бетаїн (4 мкл),
- праймери D-loop_MPLX_F і D-loop_MPLX_R (кінцева концентрація 450 нмоль кожна), а також пара альбуміну праймери albu та albd (кінцева концентрація кожного 250 нмоль) (2 мкл кожного; сумарно — 4 мкл),
- вода деіонізована (5,8 мкл),
- 25 mM MgCl₂ (1 мкл),
- (2,5 ×) MasterMix (4 мкл) (Solis BioDyne HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (no ROX), 5×, Estonia),
- барвник SYBR Green I (0,2 мкл).

Порядок внесення: бетаїн, праймери, вода, MgCl₂, MasterMix, SYBR Green I.

1.1. Nota bene! Розчин SYBR Green I не має бути старішим за 2 тижні.

1.2. Nota bene! Приготування робочого розчину барвника SYBR Green I передбачає розведення комерційного stock reagent

($\times 10\ 000$) до ($\times 100$). Після приготування розмішати на мініцентрифузі-вортексі у двох режимах.

1.3. *Nota bene!* Приготування робочого розчину праймерів передбачає розведення комерційних в наступних рецептурах:

Alb = 2 albd + 2 albu + 96 H₂O

D-loop_MPLX = 4 D-loop_MPLX_F + 4 D-loop_MPLX_R + 92 H₂O.

Після приготування розмішують на мініцентрифузі-вортексі у двох режимах.

1.4. *Nota bene!* Перед внесенням у реакційну суміш потрібно перемішати на мініцентрифузі-вортексі у двох режимах наступні реактиви: бетаїн, праймери та барвник. А також самі зразки.

Список праймерів, які використовували для MMqPCR, наведено у табл. 4.

Таблиця 4

Список праймерів для qPCR

Праймери	Послідовність нуклеотидів праймера
albd	5'– GCCCCGCCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGGAAAAGCATG GTCGCCTGTT–3'
albu	5'–CGGCGGCGGGCGGCGGGCTGGGCGGAA ATGCTGCACAGAATCCTTG–3'
D- loop_MPL X_F	5'–ACGCTCGACACACAGCACTTAAACACATCTCTGC–3'
D- loop_MPL X_R	5'– GCTCAGGTCATACAGTATGGGAGTGRGAGGGRAAAA– 3'

2. Для постановки MMqPCR у планшети по 8 мікропробірок, сумісних з Bio-RAD Chromo4, вносять 19 мкл реакційної суміші і 1 мкл ДНК зразка.

2.1. *Nota bene!* Перед рознесення реакційної суміші по мікропробірках типу Eppendorf готується негативний контроль (No-Template Control (NTC), Negative Control): спочатку вноситься 1 мкл H₂O, потім — 19 мкл реакційної суміші.

2.2. *Nota bene!* Після приготування кінцевого розчину потрібно перемішати на мініцентрифугі-вортексі у двох режимах.

2.3. *Nota bene!* Усі зразки аналізуються в серіях по три випробування (у триплетах (triplicates)).

3. Профіль термоцилювання був наступним:

1 цикл 95°C – 15 хв.;

2 цикли: 95°C – 15 с та 49°C – 15 с;

40 циклів: 95°C – 15 с, 62°C – 10 с, 74°C – 15 с, , 83°C – 10 с, 88°C – 15 с;

66 циклів від 65 °C по 30 с при кроці в 0,5°C з отриманням сигналу на кожному етапі.

4. При формуванні калібрувальної кривої проводять qPCR для чотирьох концентрацій еталонної ДНК (у двох примірниках), які охоплюють діапазон 27-кратних серійних розведень [23]. Далі шляхом корегування порога (threshold) вибирають значення R² для калібрувального регресійного лінійного рівняння: для мітохондрій R² > 0,99, для альбуміна R² > 0,98. Далі порогові числа циклів (cycle threshold (Ct)) підставляються в регресійне рівняння в логарифмічній формі. Для кожного триплету вираховують середнє значення.

Криві ампліфікації генеруються програмним забезпеченням OpticonMonitor 3. Для цього після термоцилювання та збору

вихідних даних за допомогою програмного забезпечення OpticonMonitor 3 для кожної постановки будують дві стандартні криві: для мітохондріального сигналу (M) і для гена сигналу однокопійного гена (single-copy gene, scg) альбуміну (S) [22; 23; 24]. Відносну кількість копій мтДНК розраховують як відношення M/S, де M — число мітохондріальних повторів, а S — число повторів гену альбуміну [25-29].

1.5. Біохімічні методи

1.5.1. Визначення концентрація білка в плазмі

Аналіз концентрації білку проводять за методом Бредфорда з незначними модифікаціями [34].

1. Готують робочий розчин Бредфорда шляхом змішування 0,02 г Coomassie Brilliant Blue G-250 з 50 мл 95% етанолу та 100 мл 85% (w/v) фосфорної кислоти та доведення об'єму до 1 л дистильованою водою.

2. Розбавляють плазму фосфатним буфером у 100 разів.

3. В окрему мікропробірку типу Eppendorf вносять 8 мкл розведеної плазми та 692 мкл реактиву Бредфорда, ретельно перемішують і залишити на 5 хв.

4. У лунки мікротитрувального планшета внести по 175 мкл реакційної суміші та виміряти оптичну щільність при довжині хвилі 595 нм.

5. Визначити концентрацію білка за калібрувальним графіком. Стандартні розчини мають бути приготовлені на основі різних концентрацій (в мг/мл) бичачого сироваткового альбуміну, змішаного з 0,9% буфером NaCl; далі будують калібрувальну криву.

Виміри проводяться за допомогою спектрофлуорометра Varioscan.

1.5.2. Визначення концентрація білка в PBMCs

Аналіз концентрації білку проводиться за методом Бредфорда з незначними модифікаціями [34].

1. Готують робочий розчин Бредфорда шляхом змішування 0,02 г Coomassie Brilliant Blue G-250 з 50 мл 95% етанолу та 100 мл 85% (мас./об.) фосфорної кислоти та доведення об'єму до 1 л дистильованою водою.

2. У лунки мікротитрувального планшета внести по 2 мкл лізату PBMCs та 173 мкл реакційної суміші з загального об'єму.

3. Витримати 5 хв. за кімнатної температури.

4. Виміряти оптичну щільність при довжині хвилі 595 нм.

5. Визначити концентрацію білка за калібрувальним графіком. Стандартні розчини мають бути приготовлені на основі різних концентрацій (в мг/мл) бичачого сироваткового альбуміну, змішаного з 0,9% буфером NaCl щоб побудувати калібрувальну криву.

Виміри проводяться за допомогою спектрофлуорометра Varioscan.

1.5.3. Визначення активності LDH

Визначення активності LDH проводиться за допомогою комерційного набору (High Technology, Inc., HTI-L7572-120, HTI-L7572-600, HTI-L7572-340, HTI-L7572-540) для PBMCs та плазми. Виміри проводяться за допомогою спектрофлуориметра Varioscan та виражається у U/l. Потім нормалізують для загального вмісту білка.

1.5.4. Визначення активності SOD

Активність супероксиддисмутази (SOD, EC 1.15.1.1) у плазмі крові визначають непрямим спектрофотометричним методом, який заснований на реакції супероксидозалежного окиснення кверцетину, в лужному середовищі, в присутності тетраметилетилендіаміну [19; 32].

Використовують кверцетин, SOD (Sigma S9697-15KU, США) з активністю 2000-5000 units/mg білку.

Реактиви:

PBS, тетраметилетилендіамін (TEMED), EDTA розчин 0,5 М, кверцетин, диметилсульфоксид (ДМСО).

Визначення активності SOD проводиться за наступною методикою:

1. Приготування розчину кверцетину в ДМСО (437,5 мкМ).
2. Приготування розчину TEMED в PBS (25 мкл TEMED, 2,8 мкл EDTA на 10 мл готового розчину).

3. У 2 мікропробірки типу Eppendorf вносять по 8 мкл плазми, розбавляють 460 мкл PBS. Один витримують 1 год. при температурі 76°C для інактивації SOD, в іншому вимір роблять негайно.

4. Як контрольний зразок використовують 468 мкл PBS.

5. Вносять в мікропробірку типу Eppendorf 500 мкл розчину TEMED і 32 мкл розчину кверцетину, перемішують.

6. Виміряють оптичну густину при довжині хвилі 406 нм з інтервалом 20 хвилин.

7. Повторяють виміри з інактивованим зразком.

8. Обчислюють відсоток інгібування окислення кверцетину за формулою $\frac{D_{406}^k - D_{406}}{D_{406}^k} \times 100\%$, де D_{406}^k — різниця оптичних щільностей у контрольній пробі, D_{406} — різниця оптичних щільностей в досліджуваному зразку.

9. Знаходять різницю відсотка інгібування свіжою та інактивованою плазмою. За отриманим значенням визначають активність SOD, використовуючи калібрувальну криву.

Виміри проводяться по 4 зразка у триплетах на партію.

Виміри проводяться за допомогою спектрофлуориметра Varioscan та виражали у U/ml. Потім нормалізували для загального вмісту білка.

1.5.5. Визначення активності CAT

Для визначення активності каталази крові (EC 1.11.1.6) використовують метод, який заснований на за реакції залишкового пероксиду водню з молібдатом амонію [19; 20].

Використовують CAT (Sigma, C9322-1G, США) з активністю 2500 units/mg білку, молібдат амонію, PBS, пергідроль 60%.

Хід роботи:

1. Приготування 4% розчину молібдату амонію і 7 мМ розчину перекису водню (32 мкл 60% пергідролію на 10 мл PBS, готується безпосередньо перед початком вимірів).

2. Підготування гемолізат крові в кінцевому об'ємі 100 мкл.

3. Розморожують гемолізат та розбавляють PBS у співвідношенні 1:3.

4. Вносять в мікропробірку типу Eppendorf по 48 мкл PBS, додають по 2 мкл розведеного гемолізату (підсумкове розведення 1:1000).

5. Додають по 250 мкл розчину перекису, ретельно перемішуючи строго однаковий час.

6. Через 5 хв. після початку вносять перекис в такій же послідовності і з тим же інтервалом вносять 250 мкл розчину молібдату амонію, перемішують, залишають на 5 хв.

7. Мікропробірки типу Eppendorf відцентрифугуюють для видалення бульбашок кисню.

8. Вносять по 120 мкл реакційної суміші в лунки мікротитрувального планшета, вимірюють світлопоглинання за довжини хвилі 405 нм.

9. Визначають активність каталази в реакційній суміші калібрувальної кривої, перераховують на цільну кров відповідно до робочим розведенням.

Виміри проводяться по 8 зразків у триплетах на партію.

Виміри проводяться за допомогою спектрофлуориметра Varioscan та виражали у U/ml.

1.5.6. Визначення відносної концентрації AGEs

Визначення відносної концентрації AGEs в плазмі крові проводяться за наступним протоколом [34]:

1. В лунки планшета наливають по 100 мкл плазми. Виміри проводяться в режимі флуоресценції (збудження 355 нм, зчитування 440 нм).

2. Визначення концентрації відбувається за калібрувальним графіком.

Інтенсивність флуоресценції визначають за допомогою спектрофлуориметра Varioscan і виражають у відносних одиницях (arbitrary units, AU).

Потім нормалізують для загального вмісту білка [33].

1.5.7. Визначення концентрації GSH/GSSG

За стандартною методикою оцінюють вміст GSH/GSSG у плазмі крові в присутності імідазолової сполуки [34; 35]. Реактиви: буфер (0,1M розчин Na_2HPO_4), о-фталевий альдегід (OPA, розчин в метанолі 1 мг/мл), буферизований формалін (1:4 (v/v) 37% формаліну на 0,1M Na_2HPO_4 , обов'язково

свіжоприготовлений), розчин EDTA в буфері (10 мкл/мл (0,1M Na_2HPO_4 та 5 mM EDTA)).

1. Наливають в окрему мікропробірку типу Eppendorf 10 мкл плазми.

2. Додають 100 мкл буферизованого формаліну, перемішують, витримують 5 хв. за кімнатної температури.

3. Додають 1 мл розчину EDTA і 100 мкл розчину ОРА, перемішати, залишають в темряві на 45 хв.

4. Вносять у лунки планшета по 150 мкл. Виміряють у режимі флуоресценції (збудження 345, зчитування 425).

5. Визначають концентрацію за калібрувальним графіком.

Виміри проводяться по 8 зразків у триплетах на партію.

Виміри проводяться за допомогою спектрофлуориметра Varioscan та виражали у μM .

1.5.8. Визначення концентрації MDA

Концентрацію ТВА-активних продуктів виміряють за допомогою реакції нагрівання малонового діальдегіду (MDA) з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТВА) у кислому середовищі з утворенням забарвленого триметинового комплексу з максимумом флуоресцентного випромінювання при $\mu = 530$ нм в умовах світлове збудження від $\mu = 484$ нм [20; 36].

Реактиви: малоновий діальдегід (MDA), трихлороцтова кислота (ТСА), бутанол, соляна кислота 37%, 2-тіобарбітурова кислота (ТВА), диметилсульфоксид (ДМСО).

1. Приготування розчину ТВА в ДМСО (1 г на 10 мл) і 20% водний розчин ТСА.

2. Наливають в мікропробірку типу Eppendorf 40 мкл плазми, 310 мкл води, 150 мкл розчину ТСА, 40 мкл розчину ТВА, ретельно перемішують, залишають на 1 год. при температурі 95°C.

3. Охолоджують суміш до кімнатної температури, додають 30 мкл HCl та 600 мкл бутанолу, ретельно перемішують на вортексі (не менше 15 с) та відцентрифугують при 10 000 g протягом 15 хвилин.

4. Вносять в лунки флуориметричного планшета по 150 мкл бутанолової фракції, виміряють інтенсивність флуоресценції (збудження 484 нм, зчитування 530 нм).

5. Калібрувальну криву отримують, використовуючи замість плазми водний розчин MDA в діапазоні 10-1000 мкМ.

Виміри проводяться за допомогою спектрофлуориметра Varioscan та виражаємо в μM .

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Instytut herontologhii imeni D.F. Chebotarova Natsionalnoi akademii medychnykh nauk Ukrainy [D.F.Chebotarev State Institute of Gerontology NAMS of Ukraine]. Statut derzhavnoi ustanovy Identification code 01897908 (2016) (Ukraina). <https://www.geront.kiev.ua/wp-content/uploads/2022/01/ig-statut.pdf>
2. Tryhuba, O.V., Shvets, O.V., Yalovskyi, P.M., Klak D.S., Pasevych, M.O. & Starukh, P.V. (Red.). (2024). *Osvitni innovatsii: nova tekhnika vykladannia metodologhii molekuliarnoi tsytohenetyky* [Educational innovations: new teaching techniques methodologies of molecular cytogenetics]. *Litteris et Artibus: Novi horyzonty : zbirnyk materialiv Vseukrainskoi naukovo-praktychnoi konferentsii. Vypusk IX, 31 zhovtnia 2024 roku*. Kremenets: VTs KOHPA im. Tarasa Shevchenka [in Ukrainian].
3. Grabchenko A.I., Fedorovych V.O. & Garashchenkov Ya.M. (2009). *Metody naukovykh doslidzhen* [Methods of scientific research]. Kharkiv: Vydavnytstvo NTU "KhPI" [in Ukrainian].
4. Pushkar, A.Y. & Potrashkova, L.V. (2009). *Osnovy naukovykh doslidzhen ta orhanizatsiia naukovo-doslidnytskoi diialnosti* [Fundamentals of scientific research and organization of scientific research activities]. Kharkiv: Vydavnytstvo KhNEU [in Ukrainian].
5. Kukharchuk, R.P. (Red.). (2024). *Skladannia tablyts yak efektyvnyi instrument vykladannia tem z metodologhii molekuliarnoi tsytohenetyky* [Making tables as an effective tool for teaching topics in molecular cytogenetics methodology]: *Zbirnyk tez dopovidei uchasnykiv III Vseukrainskoi naukovo-praktychnoi internet-konferentsii z mizhnarodnoi uchastiu «III Shklovski chytannia «Problemy suchasnykh pryrodnycho-matematychnykh nauk ta metodyk yikh vykladannia», 30–31 zhovtnia 2024 roku*. Hlukhiv [in Ukrainian].

6. Vazhynskiy, S. E. & Shcherbak, T. I. (2016). *Metodyka ta orhanizatsiia naukovykh doslidzhen* [Methodology and organisation of scientific research]. Sumy: Vydavnytstvo SumDPU imeni A.S. Makarenka [in Ukrainian].

7. Birta, H.O. & Burhu, Yu.H. (2014). *Metodolohiia i orhanizatsiia naukovykh doslidzhen* [Methodology and organisation of scientific research]. Kyiv: Vyd-vo «Tsentr uchbovoi literatury» [in Ukrainian].

8. Shchvets, F.D. (2016). *Metodolohiia ta orhanizatsiia naukovykh doslidzhen* [Methodology and organisation of scientific research]. Rivne: Vydavnytstvo Natsionalnyi universytet vodnoho hospodarstva ta pryrodokorystuvannia [in Ukrainian].

9. Ivanchenko, A.V. (2012). *Naukovi doslidzhennia za temoiu mahisterskoi roboty* [Scientific research on the topic of master's thesis]. Dniprodzerzhynsk: Vydavnytstvo DDTU [in Ukrainian].

10. Stoiatska H.M. (2016). *Metodolohiia naukovykh pravovykh doslidzhen* [Methodology of scientific legal research]. Dnipro: Vydavnytstvo DNIPROPETROVSKYI DERZhAVNYI UNIVERSYTET VNUTRISHNIKh SPRAV [in Ukrainian].

11. Kosiachenko, N.M., Zubrytska, T.R., Burianova, V.V., Marchuk, O.S. & Moroz O.H. (2023). *Tekhnolohiia likiv: u pytanniakh ta vidpovidiakh* [Drug technology: in questions and answers]. Zhytomyr: Vyd-vo «Ruta» [in Ukrainian].

12. Atramentova, L.O. & Utevska, O.M. (2007). *Statystychni metody v biologii* [Statistical methods in biology]. Kharkiv: Organizational and publishing department of the Scientific and Methodological Center of V. N. Karazin Kharkiv National University [in Ukrainian].

13. Atramentova L.O. (2023). *Zovsim prosto. Pro planuvannia biolohichnoho doslidzhennia ta analiz danykh* [Quite simply. About planning a biological study and data analysis]. Kharkiv: Vyd-vo NTMT [in Ukrainian].

14. Md, S., Abdullah, S., Alhakamy, N. A., Shaik, R. A., Eldakhakhny, B. M., Omar, U. M., Eid, B. G., Ansari, A. R., Alamoudi, A. J., Rizg, W. Y., Riadi, Y., Venkateswaran, S. P., & Rashid, M. A. (2022). Development and Evaluation of *Ginkgo biloba*/Sodium Alginate Nanocomplex Gel as a Long-Acting Formulation for Wound Healing. *Gels (Basel, Switzerland)*, 8(3), 189. <https://doi.org/10.3390/gels8030189>
15. Hällqvist, J., Bartl, M., Dakna, M., Schade, S., Garagnani, P., Bacalini, M. G., Pirazzini, C., Bhatia, K., Schreglmann, S., Xylaki, M., Weber, S., Ernst, M., Muntean, M. L., Sixel-Döring, F., Franceschi, C., Doykov, I., Śpiewak, J., Vinette, H., Trenkwalder, C., Heywood, W. E., ... Mollenhauer, B. (2024). Plasma proteomics identify biomarkers predicting Parkinson's disease up to 7 years before symptom onset. *Nature communications*, 15(1), 4759. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48961-3>
16. Castelo Rueda, M. P., Zanon, A., Gilmozzi, V., Lavdas, A. A., Raftopoulou, A., Delcambre, S., Del Greco M, F., Klein, C., Grünewald, A., Pramstaller, P. P., Hicks, A. A., & Pichler, I. (2023). Molecular phenotypes of mitochondrial dysfunction in clinically non-manifesting heterozygous PRKN variant carriers. *NPJ Parkinson's disease*, 9(1), 65. <https://doi.org/10.1038/s41531-023-00499-9>
17. Khan, Z., & Ali, S. A. (2018). Oxidative stress-related biomarkers in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Iranian journal of neurology*, 17(3), 137–144.
18. Cruickshank, T. M., Reyes, A. R., & Ziman, M. R. (2015). A systematic review and meta-analysis of strength training in individuals with multiple sclerosis or Parkinson disease. *Medicine*, 94(4), e411. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000411>
19. Góth L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica chimica*

acta; international journal of clinical chemistry, 196(2-3), 143–151.
[https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90067-m](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90067-m)

20. Cherska M., Krasnienkov D., Guryanov V., Kukharskyy V., Tronko1 N., Kondratiuk V. & Zabuga O. (2020). Telomere length, telomerase activity and oxidative stress in elderly with chronic cerebrovascular diseases. *Problems of Endocrine Pathology*, 2, 81-88. <https://doi.org/10.21856/j-PEP.2020.2.10>

21. Cawthon R. M. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic acids research*, 37(3), e21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1027>

22. Krasnienkov D.S., Gorodna O.V., Kaminska T.M., Podolskiy V.V., Podolskiy VI.V., Nechyporenko M.V., Antypkin Yu.G., & Livshits L.A. (2022). Analysis of the relative average long telomere of women's leukocytes, who were sick with COVID-19. *Cytology and Genetics*, 56(6), 526–529. <https://www.doi.org/10.3103/S0095452722060056>

23. Cherska, M., Kondratiuk, V., Kukharskyy, V., Krasnienkov, D., & Guryanov, V. (2020). Association of telomere shortening with the state of the autonomic nervous and antioxidant systems in elderly patients with cerebral atherosclerosis and type 2 diabetes. *Endokrynologia*, 25(2), 110-118. <https://doi.org/10.31793/1680-1466.2020.25-2.110>

24. Yehorova, M. S., Krasnenkov, D. S., Gurianov, V. G., Kondratiyk, V. Y., & Tronko, N. D. (2019). Study of the diagnostic significance of telomere length and telomerase activity in patients with cerebral atherosclerosis and type 2 diabetes mellitus. *Clinical Endocrinology and Endocrine Surgery*, (4), 62–72. <https://doi.org/10.30978/CEES-2019-4-62>

25. Kolyada, A.K., Vaiserman, A.M., Krasnenkov, D.S., & Karaban' I.N. (2016) Studies of Telomere Length in Patients with Parkinson's Disease. *Neurosci Behav Phys*, 46, 344–347. <https://doi.org/10.1007/s11055-016-0239-4>

26. Krasnienkov, D. S., Khalangot, M. D., Kravchenko, V. I., Kovtun, V. A., Guryanov, V. G., Chizhova, V. P., Korkushko, O. V., Shatilo, V. B., Kukharsky, V. M., & Vaiserman, A. M. (2018). Hyperglycemia attenuates the association between telomere length and age in Ukrainian population. *Experimental gerontology*, 110, 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.06.027>
27. Sorochynska, K., Sych, N., Duda, A., Kulebyakina, K., Krasnienkov, D., Vaiserman, A., & Vatlitsov, D. (2018). Dynamics of Telomere Length and Telomerase Activity in the Human Fetal Liver at 5-12 Weeks of Gestation. *Stem cells international*, 2018, 1385903. <https://doi.org/10.1155/2018/1385903>
28. Tronko, N., Cherska, M., Kukharsky, V., Krasnienkov, D., & Guryanov, V. (2020). High activity of telomerase, parasympathetic and superoxide dismutase — the cause of telomere shortening in patients with cerebral atherosclerosis and diabetes mellitus. *The Scientific Heritage*, 50(2), 63–70.
29. Yehorova, M. S., Krasnienkov, D. S., Gurianov, V. G., Kondratiuk, V. Y., & Kuharskiy V. M. (2019). RELATIONSHIP OF TELOMERE LENGTH, TELOMERASE ACTIVITY, AND OXIDATIVE STRESS MARKERS IN PATIENTS WITH CEREBRAL ATHEROSCLEROSIS AND TYPE 2 DIABETES. *Clinical and Preventive Medicine*, (3-4), 117-127. [https://doi.org/10.31612/2616-4868.4\(10\).2019.06](https://doi.org/10.31612/2616-4868.4(10).2019.06)
30. Hsieh, A. Y. Y., Budd, M., Deng, D., Gadawska, I., & Côté, H. C. F. (2018). A Monochrome Multiplex Real-Time Quantitative PCR Assay for the Measurement of Mitochondrial DNA Content. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 20(5), 612–620. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.05.001>
31. Matviichuk, A., Yerokhovych, V., Ilkiv, Y., Krasnienkov, D., Korcheva, V., Gurbych, O., Shcherbakova, A., Botsun, P., Falalyeyeva, T., Sulaieva, O., & Kobyliak, N. (2024). HbA1c and leukocyte mtDNA levels as major factors associated with post-

COVID-19 syndrome in type 2 diabetes patients. *Scientific reports*, 14(1), 25533. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77496-2>

32. Kostyuk, V. A., & Potapovich, A. I. (1989). Superoxide--driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochemistry international*, 19(5), 1117–1124.

33. Dozio, E., Vettoretti, S., Caldiroli, L., Nerini-Molteni, S., Tacchini, L., Ambrogi, F., Messa, P., & Corsi Romanelli, M. M. (2020). Advanced Glycation End Products (AGE) and Soluble Forms of AGE Receptor: Emerging Role as Mortality Risk Factors in CKD. *Biomedicines*, 8(12), 638. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8120638>

34. Marchenko, O. Y., Rudenko, N. M., & Krasnienkov, D. S. (2024). MicroRNAs and Oxidative Stress Markers as Additional Diagnostic Criteria for Coronary Heart Disease. *Ukrainian Journal of Cardiovascular Surgery*, 32(1), 10-19. [https://doi.org/10.30702/ujcvs/24.32\(01\)/MR013-1019](https://doi.org/10.30702/ujcvs/24.32(01)/MR013-1019)

35. Mokrasch, L. C., & Teschke, E. J. (1984). Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a specific fluorometric assay. *Analytical biochemistry*, 140(2), 506–509. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90201-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90201-x)

36. Tukozkan Nurten, Erdamar Husamettin & Seven Ilgin (2006). Measurement of total Malondialdehyde in Plasma and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid Assay. *Firat medical*, 111[2]: 88-92.

37. Zhao, Y., Chen, Y., & Yan, N. (2024). The Role of Natural Products in Diabetic Retinopathy. *Biomedicines*, 12(6), 1138. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12061138>