

что подтверждается данными лабораторных и инструментальных методов исследования.

2. На фоне введения аутологичных МСК кроликам с индуцированным циррозом печени наблюдалось улучшение гистологической картины в пораженном органе, что, вероятно, свидетельствует о положительном влиянии клеточной трансплантации на процессы регенерации в печени при лечении экспериментального цирроза.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. The Epidemiology of Cirrhosis in the United States: A Population-based Study / S. Scaglione [et al.] // *J Clin Gastroenterol.* — 2015. — № 49(8). — P. 690–696.
2. Стволовые клетки в регенеративной медицине: достижения и перспективы / А. Н. Лызикив [и др.] // *Проблемы здоровья и экологии.* — 2015. — № 3 (45). — С. 4–9.
3. Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis / V. Volarevic [et al.] // *Stem Cells.* — 2014. — Aug 22. doi: 10. — P. 1002–1818.

4. Морфометрические параметры регенерации печени при частичной гепатэктомии и трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в эксперименте / А. Г. Скуратов [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук.* — 2016. — № 4. — С. 57–65.

5. *Constantinou, C. Modeling liver fibrosis in rodents / C. Constantinou, N. Henderson, J. P. Iredale // Methods Mol Med.* — 2005. — № 117. — P. 237–250.

6. Модель токсического поражения печени у кроликов / А. Н. Лызикив [и др.] // *Проблемы здоровья и экологии.* — 2015. — № 2. — С. 45–50.

7. Сравнительная характеристика экспериментального моделирования токсического поражения печени у крыс и кроликов / А. Н. Лызикив [и др.] // *Актуальные проблемы медицины: сборник научных статей Республиканской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 25-летию основания учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет» (Гомель, 5–6 ноября 2015 года) / А. Н. Лызикив [и др.]. — Элект. текст. данные (объем 20,1 Мб). — Гомель: ГомГМУ, 2015. — С. 596–598.*

8. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P. A. Zuk [et al.] // *Mol Biol Cell.* — 2002. — Vol. 13(12). — P. 4279–4295.

9. *Автандилов, Г. Г. Медицинская морфометрия / Г. Г. Автандилов. — М.: Медицина, 1990. — 383 с.*

*Поступила 15.02.2017*

УДК 616.153.922:57.086.13]:599.323.4

## ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ХРАНЕНИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС НА СОДЕРЖАНИЕ ХОЛЕСТЕРОЛА

*С. С. Осочук*

**Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет**

Холестерол подвергается окислению в большей степени, чем полиненасыщенные жирные кислоты, что может привести к искажению результатов, полученных при замораживании сыворотки крови. Целью работы было исследование влияния низкотемпературного хранения сыворотки на показатели ее холестеролового профиля. Сыворотку крови лабораторных крыс делили на три порции. В 1-й порции определяли холестероловый профиль коммерческими наборами «Cormay Diana» в день ее получения. 2 и 3 порции обрабатывали после 3- и 7-дневного хранения при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Статистический анализ проводился в системе R 3.3.1. Для анализа повторных измерений использовали непараметрический критерий Квейд с поправкой по методу Бонферрони. По результатам проведенного исследования сделан вывод о статистически значимом влиянии замораживания сыворотки крови на результаты анализа холестеролового профиля крови и обсуждены возможные механизмы выявленных отличий.

Ключевые слова: холестерол, определение, хранение, ошибка.

## THE EFFECT OF LOW-TEMPERATURE STORAGE OF RAT SERUM ON THE CONTENT OF CHOLESTEROL

*S. S. Asachuk*

**Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University**

Cholesterol is oxidized to a greater extent than polyunsaturated fatty acids, which may distort the results in freezing of blood serum. The aim of the work was to study the effect of low-temperature storage of serum on the indices of its cholesterol profile. The blood serum of laboratory rats was divided into 3 portions. The profile of cholesterol in the first portion was determined with commercial kits Cormay-Diana on the day when it was received. The second and third portions were processed after 3 and 7 days of storage at a temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$ . The statistical analysis was performed in the system R 3.3.1. The non-parametric Quade criterion with the Bonferroni correction was used for the analysis of the repeated measurements. According to the results of the carried out study we made a conclusion about the statistically significant effect of blood serum freezing on the result of the analysis of the cholesterol profile of blood and discussed possible mechanisms of the identified differences.

Key words: cholesterol, identification, storage, error.

#### **Введение**

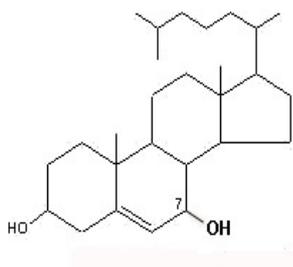
Практически каждому врачу-клиницисту знакома ситуация, когда результаты лабора-

торного анализа одного и того же пациента, полученные с небольшим временным интервалом или без него из одной и той же или раз-

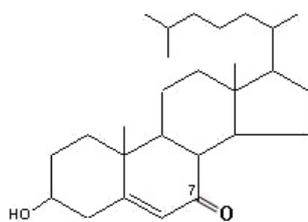
личных лабораторий, в значительной степени не совпадают. Неточность и несопоставимость результатов лабораторных анализов не дают адекватно оценить состояние пациента, установить диагноз заболевания, назначить соответствующее лечение и его мониторинг. Кроме того, недостоверность результатов анализов не позволяет создавать межлабораторные базы данных, что негативно сказывается на медицинской статистике, снижает финансовую эффективность отрасли в целом.

Достоверность лабораторных данных зависит от ряда субъективных и объективных факторов, влияние которых должно быть либо сведено к нулю, либо учтено при оценке результатов анализа [1]. К объективным факторам можно отнести обычно не учитываемые внешние воздействия на физико-химические и биологические процессы, дающие «разброс» результатов, существенно превышающий возможные методические ошибки. К таким факторам относят совокупность событий на Солнце, в солнечном ветре, магнитосфере, ионосфере, термосфере, геосфере, которые могут влиять как на процессы жизнедеятельности, так и на воспроизводимость результата при лабораторном анализе. Совокупность указанных процессов получила название «космическая погода» [2]. Для уменьшения степени воздействия данного фактора лабораторные исследования рекомендуется проводить в триплетах (от лат. *triplex* — «тройной»). К сожалению, в связи с неэкономичностью исследования в триплетах все большее количество исследований в лабораторной практике проводится в одном экземпляре. Экономическая целесообразность, являющаяся по отношению к получаемому результату субъективным (устраняемым) фактором, накладывает отпечаток и на время обработки биологического материала. Так, большинство коммерческих наборов для определения клинико-лабораторных показателей крови рассчитано на проведение от 30 до 100 исследований. При этом поток пациентов с назначением таких исследований ограничен несколькими пациентами в сутки. В таких случаях в целях

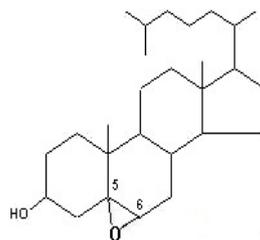
удешевления стоимости одного исследования полученные образцы сыворотки (плазмы) крови замораживаются и хранятся до обработки при температуре от  $-20$  до  $-80$  °С. Длительность хранения варьирует в зависимости от интенсивности потока пациентов, направляемых на исследование данного показателя крови. Особенно актуальным данный вопрос становится при проведении многократных отсроченных по времени исследований у одного и того же пациента с целью мониторинга его состояния в зависимости от рекомендаций лечащего врача. Одним из таких направлений является профилактика атерогенеза, основанная на мониторинге и коррекции холестерина в крови. В настоящее время одним из наиболее часто используемых в клинико-лабораторной практике наборов для определения количества холестерина (ХС) в крови являются наборы производителя PZ S. A. Cormay (Польша, Республика Беларусь). В основе метода лежит окисление холестерина холестеролоксидазой (КФ 1.1.3.6) в холест-4-ен-3-он с образованием перекиси водорода, которая в реакции с 4-аминоантипирином и фенолом, катализируемой пероксидазой (КФ 1.11.1.7), преобразуется в воду и окрашенный в красный цвет хинонимин. О содержании ХС судят по оптической плотности хинонимина. Для определения содержания общего ХС (ОХС) его эфиры предварительно разрушаются холестеролэстеразой (КФ 3.1.1.13). Таким образом, в коммерческих наборах используются 3 различных фермента, обладающих различной субстратной специфичностью. Специфичность холестеролоксидазы (КФ 1.1.3.6) во многом определяется липидным окружением холестерина [3], изменение которого способно повлечь за собой модификацию активности фермента. Известно, что при замораживании и размораживании биологических тканей липиды подвергаются по меньшей мере 2-разовому свободнорадикальному окислению [4]. В ходе такого окисления образуются, в том числе, окисленные формы ХС, основными из которых (по неполному перечню) являются:



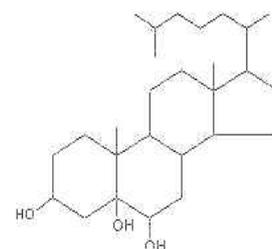
7α-ОН или 7β-ОН холестерол



7кето-холестерол



С5 и С6 окиснированные производные 5,6α или 5,6β эпоксиды



Следует учитывать, что ХС подвержен свободнорадикальному окислению в гораздо большей степени, чем полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) [5]. По этой причине замораживание и размораживание проб неминуемо приведет к накоплению окисленных форм ХС и, как следствие, к изменению активности их взаимодействия с активным центром фермента. Такая же ситуация может развиваться и для холестеролэстеразы (КФ 3.1.1.13) при свободнорадикальной модификации эфиров холестерина. При активации свободнорадикального окисления замороженной пробы окисление ХС холестеролоксидазой может быть не единственным источником пероксида [6], что может быть причиной ложного увеличения концентрации холестерина при оценке данным методом. Кроме того, в модельных системах, исследовавших скорость разрушения пероксида водорода в дистиллированной воде в зависимости от глубины ее замораживания, показано, что наибольшая щелочность воды и количество пероксида было при 77К, с понижением температуры скорость разрушения пероксида возрастала и существенно зависела от состава воды [7], что также свидетельствует о возможности ошибки при использовании данного метода для обработки замороженных образцов сыворотки (плазмы) крови.

#### **Цель работы**

Оценить влияние замораживания плазмы крови разной продолжительности на количество общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП), детектированных наборами, наиболее часто используемыми в клинических лабораториях, и построить компьютерную 3D-модель взаимодействия окисленного и неокисленного холестерина с активным центром холестеролксидазы.

#### **Материал и методы**

Для исследования влияния длительности замораживания на содержание ХС сыворотки крови использованы 10 белых неимбредных лабораторных крыс-самцов, содержащихся на стандартном рационе питания вивария УО «Витебский государственный медицинский университет» (УО «ВГМУ»).

Для получения сыворотки крови в утренние часы проводили декапитацию животных под эфирным наркозом. Кровь забирали в чистые пробирки и для образования сгустка выдерживали 15 минут в холодильнике при температуре +4 °С. Образовавшийся сгусток отделяли от сыворотки двукратным 10-минутным центрифугированием при 3000 об/мин в рефрижераторной центрифуге РС 6 при температуре +4 °С. Сыворотку разливали в пластиковые пробирки и разделяли на 3 группы. В 1-й группе исследуемые показатели определяли в день забора биологического материала. Сыворотку 2-й и 3-й групп замораживали при температуре -20 °С. Холестероловый профиль определяли через 3 (2-я группа) и 7 (3-я группа) дней. Для определения количества ОХС, ХС ЛПВП и ТГ использовали коммерческие наборы производителя PZ S. A. Cormay (Польша, Республика Беларусь). Количество ХС липопротеинов очень низкой плотности (ХС ЛПОНП) и ХС липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) проводили расчетным методом [8].

Поскольку распределение исследуемых признаков статистически значимо отличалось от нормального (согласно тесту Шапиро-Уилка), для анализа повторных измерений использовался непараметрический критерий Квейд с поправкой по методу Бонферрони. Статистический анализ проводился в системе R 3.3.1.

Для построения 3D-модели взаимодействия окисленного и неокисленного холестерина с активным центром холестеролксидазы использовалась модель, полученная при помощи анализа кристаллической структуры холестеролксидазы, с использованием метода дифракции рентгеновских лучей [9]. Трехмерное моделирование связывания субстратов холестеролксидазы (5,6- $\alpha$ -эпоксихолестерола и холестерина) с активным центром фермента производилось при помощи подпрограммы AutoDock Vina 1.1, интегрированной в программный комплекс LigandScout 4.09.3 (номер лицензии 77165810860672707145).

#### **Результаты и обсуждение**

Описательные статистики для липидного профиля крови представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Описательные статистики для липидного профиля крови

Показатели	Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.
Общий холестерол (ОХС), мМ/л						
После отбора проб	1,7	1,95	2,3	2,31	2,67	2,9
3 дня хранения	1,8	2,025	2,2	2,17	2,37	2,5
7 дней хранения	1,8	2,075	2,4	2,4	2,62	3,1
Триацилглицериды (ТГ), мМ/л						
После отбора проб	0,67	0,80	1,2	1,19	1,52	1,9
3 дня хранения	0,7	0,87	1,2	1,21	1,45	1,9
7 дней хранения	0,77	0,92	1,15	1,19	1,375	1,8

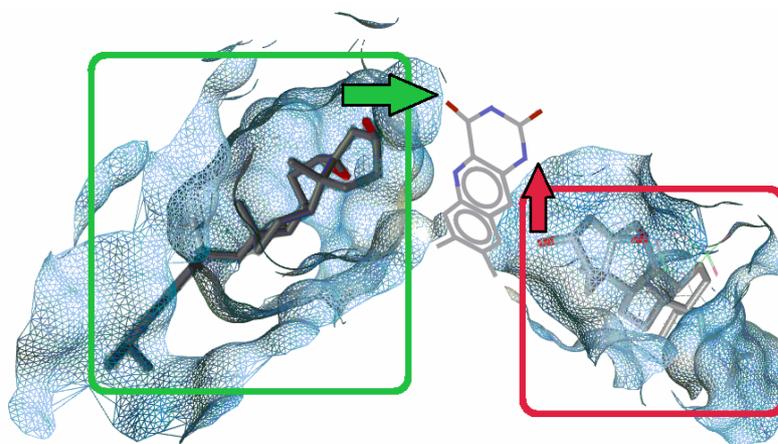
Окончание таблицы 1

Показатели	Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.
Холестерол ЛПВП (ХС ЛПВП), мм/л						
После отбора проб	0,81	0,875	1,15	1,11	1,3	1,4
3 дня хранения	0,8	1,1	1,15	1,17	1,27	1,6
7 дней хранения	0,94	1,13	1,2	1,22	1,3	1,5
Холестерол ЛПНП (ХС ЛПНП), мм/л						
После отбора проб	0	0,33	0,65	0,66	0,97	1,4
3 дня хранения	0	0,11	0,6	0,44	0,67	0,82
7 дней хранения	0,12	0,41	0,59	0,63	0,83	1,24

В ходе проведенного анализа было установлено (таблица 1), что концентрация ОХС и ХС ЛПНП статистически значимо изменялась ( $p = 0,038$  и  $p = 0,019$ ) в зависимости от времени хранения. Апостериорный анализ показал, что концентрация ОХС имела статистически значимые отличия между 3-м и 7-м днем хранения ( $p = 0,036$ ), в то время как по уровню концентрации холестерина в ЛПНП наблюдались различия между пробами: незамороженной и хранившейся в течение 3 дней ( $p = 0,040$ ), а также хранившимися 3 и 7 дней ( $p = 0,045$ ). Отсутствие синхронности в выявленных изменениях могут обуславливаться ограничениями расчетного метода определения содержания

ХС ЛПНП [10] или факторами, связанными с «космической погодой» [2].

На возникновение различий в полученных результатах могли повлиять и стерические взаимодействия окисленного ХС с активным центром холестеролоксидазы (КФ 1.1.3.6). Такая точка зрения подтверждается проведенным трехмерным моделированием взаимодействия холестерина и 5,6- $\alpha$ -эпоксистерола с активным центром холестеролоксидазы (рисунок 1). В левой части рисунка отображен активный центр фермента, в котором располагается молекула холестерина, ориентированная функциональными группами по направлению к ФАД.



**Рисунок 1 — Трехмерная модель взаимодействия холестерина (слева) и 5,6- $\alpha$ -эпоксистерола (справа) с активным центром холестеролоксидазы. Холестерол располагается в активном центре фермента, 5,6- $\alpha$ -эпоксистерол — в области, прилегающей к активному центру; по центру модели располагается ФАД**

Окисленный холестерол (5,6- $\alpha$ -эпоксистерол) приобретает новые центры связывания, отдаленные от активного центра, что приводит к нарушению его взаимодействия с ФАД и, как следствие, как минимум — к росту  $K_m$ .

Таким образом, стерические взаимодействия между холестеролоксидазой и окисленными формами холестерина способны изменить активность фермента, что неминуемо скажется на конечной продукции перекиси водорода и конечном результате исследований. Не исклю-

чено, что такая же картина нарушений стерических взаимодействий может наблюдаться и с другими ферментами, входящими в диагностический набор. Учитывая, что перекись водорода может образоваться при свободнорадикальном окислении не только из холестерина, но и иных соединений [5], замороженная проба на момент обработки холестеролоксидазой может уже иметь повышенное количество пероксида водорода, а его количество может в значительной степени зависеть от состава ис-

следуемой сыворотки. Таким образом, конечный результат исследования ХС будет во многом определяться факторами замораживания, размораживания и длительности хранения. При этом результат может быть как завышен за счет свободнорадикального окисления компонентов сыворотки (плазмы) крови и продукции пероксида водорода, так и занижен как результат нарушения стерических взаимодействий окисленных форм холестерина с ферментами диагностического набора.

Учитывая вышеизложенное, можно заключить, что для снижения ошибок в определении клинико-лабораторных показателей необходима разработка стандартных процедур забора, хранения и обработки биологического материала во всех клинических лабораториях, что подразумевает систему аккредитации клинико-лабораторной службы.

#### **Выводы**

1. Замораживание сыворотки крови искажает конечный результат исследования содержания общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности.

2. Искажение результатов может быть обусловлено нарушением взаимодействия окисленных форм холестерина с активным центром ферментов, включенных в диагностический набор.

#### **БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. *Меньшиков, В. В.* Аналитическая достоверность клинической лабораторной информации и роль эталонов в ее обеспечении / В. В. Меньшиков // Клиническая лабораторная диагностика. — 2012. — № 12. — С. 52–61.
2. Исследование свободнорадикальных процессов в организме крыс на фоне изменения состояния внешней среды / К. В. Кулакова [и др.] // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. — 2010. — Т. 1, № 4. — С. 100–108.
3. *Kreit, J.* Cholesterol oxidase: physiological functions / J. Kreit, N. S. Sampson // FEBS J. — 2009. — Vol. 276, № 23. — P. 6844–6856.
4. *Белоус, А. М.* Биохимическая модификация липидов биомембран как причина гибели клеток при низкотемпературном консервировании / А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, Т. П. Бондаренко // Криобиология и криомедицина. — 1978. — № 4. — С. 3–6.
5. *Xu, L.* Free radical oxidation of cholesterol and its precursors: Implications in cholesterol biosynthesis disorders / L. Xu, N. A. Porter // Free Radic. Res. — 2015. — Vol. 49, № 7. — P. 835–849.
6. Хавкин, Э. Органические перекиси, их получение и реакции / Э. Хавкин. — М., Ленинград: Химия, 1961. — 536 с.
7. *Логинова, О. Н.* Влияние условия замораживания водной среды на скорость разложения пероксида водорода при участии ионов железа(II) / О. Н. Логинова, Н. А. Казанцева // Химия, биология, биотехнологии в современном мире, теория и практика — Москва, 26–30 июня 2013 г.: сб. матер. междунар. конф. и е-симпозиума; [ред. соп. : Г. В. Печурина (пред.) и др.]. — С. 110–113.
8. *Friedewald, W. T.* Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge / W. T. Friedewald, R. I. Levy, D. S. Fredrickson // Clinical Chemistry. — 1972. — Vol. 18, № 6. — P. 499–502.
9. Электронный ресурс. — Режим доступа: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1COY>. — Дата доступа: 21.11.2016.
10. *Кузьменко, В. В.* Повышение точности расчетных показателей холестерина (липопротеинов низкой плотности) в сыворотке крови / В. В. Кузьменко, Р. Г. Скворцова, И. А. Мирошниченко // Сибирский медицинский журнал. — 2010. — № 6. — С. 87–89.

*Поступила 30.12.2016*

УДК 616.681-018-092.18/-092.19-092.9 (отред)

### **ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТКАНЕЙ СЕМЕННИКОВ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР**

*К. А. Кидун, Е. К. Солодова, Т. С. Угольник*

**Гомельский государственный медицинский университет**

Стресс оказывает неблагоприятное воздействие на мужскую репродуктивную систему. Целью работы было изучить морфологические изменения в тканях семенников крыс линии Вистар при хроническом стрессе по Ortiz. В семенниках крыс после перенесенного стресса было выявлено полнокровие сосудов, уменьшение диаметра ИСК, отслоения сперматогенного эпителия от базальной мембраны, а также изменения в сперматогенном эпителии деструктивного характера, вплоть до развития некроза.

Ключевые слова: семенники, крысы, стресс, сперматогенный эпителий.

### **THE EFFECTS OF CHRONIC STRESS ON THE MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TESTICULAR TISSUES OF WISTAR RATS**

*K. A. Kidun, E. K. Solodova, T. S. Ugochnik*

**Gomel State Medical University**

Stress has an unfavorable effect on male reproductive system. The aim of the work was to study the morphological changes in testicular tissues of Wistar rats in chronic stress according to Ortiz. We detected hyperemia of vessels, reduction of the diameter of seminiferous tubules, exfoliation of the seminiferous epithelium from the basement membrane, and also destructive changes in the seminiferous epithelium including development of necrosis in the testis of the rats after stress.

Key words: testis, rats, stress, seminiferous epithelium.

#### **Введение**

Сперматогенез является одним из наиболее динамичных процессов в организме чело-

века и наиболее чувствительным к действию повреждающих факторов вследствие его высокой пролиферативной активности. Различные