

***БУКОВИНСЬКИЙ
МЕДИЧНИЙ
ВІСНИК***

1'2002

ЧЕРНІВЦІ

Міністерство охорони здоров'я України
Буковинська державна медична академія

**БУКОВИНСЬКИЙ
МЕДИЧНИЙ
ВІСНИК**

Український науково-практичний журнал
Заснований у лютому 1997р.

ТОМ 6

№ 1

Редакційна колегія:

головний редактор В.П.Пішак

О.В.Алексееенко, Ю.Т.Ахтемійчук (відповідальний секретар), Л.О.Безруков, Т.М.Бойчук, О.І.Волошин, В.О.Калугін, М.Ю.Коломоєць (заступник редактора), Р.Б.Косуба, І.Ф.Мещишен, В.Ф.Мислицький, В.С.Прокопчук, Р.В.Сенютович, І.Й.Сидорчук (перший заступник редактора), В.К.Ташук (відповідальний секретар), Г.І.Ходоровський, О.М.Юзько

Наукові рецензенти: проф. Л.О.Безруков, проф. Р.В.Сенютович, проф. В.К.Ташук

Чернівці: БДМА, 2002

P.1243-1249. 5. Clozel M., Kuhn H., Baumgartner H.R. Procoagulant activity of endotoxin-treated human endothelial cells exposed to native human flowing blood // *Blood*. – 1989. – V.73, №3. – P.729-733. 6. Lundahl T.H., Petersson J., Fagergerg I.H. et al. Impaired platelet function correlates with multiorgan dysfunction. A study of patients with sepsis: Pap. Workshop Platelet Activ. during 31st Annu. Meet. Eur. Soc. Clin. Invest., Kiel, March, 1997 // *Platelets*. – 1998. – V.9, № 3-4. – P.223-225. 7. Ostermann H., Bohler H. Pathophysiologie und Diagnostik der Gerinnungs-aktivierung bei Sepsis // *Anesthesiol. und Intensivmed.* – 1999. – V.40, № 11. – P.796-799. 8. Robbie L.A., Dummer S., Booth N.A. et al. Plasminogen activator inhibitor 2 and urokinase-type plasminogen activator in plasma and leucocytes in patients with severe sepsis // *Brit. J. Haematol.* – 2000. – V.109, № 2. – P.342-348. 9. Tarpey M.M., Cunningham M.K., Connelly S.M. Endotoxin and group B streptococcus increase thromboxane A₂ synthesis in vascular endothelium // *Anesthesiology*. – 1988. – V.69, № 3A. – P.207-209. 10. Vries I., Deventer S.J.H., Debets J. et al. Endotoxin-induced cytokines in human septicemia / Endotoxin: Proc. Int. Symp. Endotoxins, Satell. Symp. 4th Int. Conf. Immunopharmacol., Tochigi-Ken, May 11 – 13, 1988. – New York, London, 1990. – P.635-640. 11. Warr T.A., Rao V.M., Rapaport S.I. Disseminated intravascular coagulation in rabbits induced by administration of endotoxin or tissue factor: Effect of anti-tissue factor antibodies and measurement of plasma extrinsic pathway inhibitor activity // *Blood*. – 1990. – V. 75, №7. – P.1481-1489.

THE INFLUENCE OF ENDOTOXIN SAL. TYPHIMURIUM ON THE ARACHIDONATE OXYDATIVE METABOLISM, HEMOSTASYS AND FIBRINOLYSYS IN ALBINO RATS

I.R.Mysula, Ya.Ya.Bodnar, M.M.Korda

Abstract. It was demonstrated on albino rats that after the influence of endotoxin Sal. typhimurium oxydative metabolism of the arachidonic acid in the myocardium is changed and TxB₂ and LTB₄ are formed. At the same time the hypercoagulative blood shifts are combined with an increase of angiotensin II content in the blood plasma.

Key words: endotoxin, heart, eicosanoids, hemostasis, angiotensin II.

I.Ya.Horbachevsky State Medical Academy (Ternopil)

Надійшла до редакції 5.12.2001 року

УДК 616-002.5-076.5:577.21

В.В.Николаевский, Ю.И.Бажора

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАТОГЕННЫХ МИКОБАКТЕРИЙ МЕТОДОМ RAPD-АНАЛИЗА

Кафедра клинической иммунологии, генетики и медицинской биологии (зав. – проф.Ю.И.Бажора)
Одесского государственного медицинского университета

Резюме. С целью установления эффективности применения ПЦР-генотипирования с произвольными праймерами (RAPD) для идентификации видов атипичных микобактерий проведено исследования внутриродового ПЦР-полиморфизма ДНК референтных штаммов возбудителей туберкулеза и атипичных микобактерий. С помощью компьютерных программ математической обработки данных RAPD-анализа установлены кластеры видов, определены межвидовые генетические дистанции.

Ключевые слова: атипичные микобактерии, туберкулез, микобактериозы, молекулярная диагностика, генотипирование.

Вступление. Несмотря на то, что микобактерии изучаются уже более 100 лет, до сих пор не существует единого мнения о спектре возбудителей туберкулеза человека. В настоящее время установлено, что к их числу принадлежат микобактерии, относящиеся к видам *Mycobacterium tuberculosis* (человеческий вид), *M.bovis* (бычий вид) и *M. africanum* (промежуточный вид), который зарегистрирован главным образом на африканском континенте [8].

Нередко, однако, при легочной патологии, а также при других заболеваниях у больных выделяются иные, так называемые атипичные виды микобактерий. Долгое

время вопрос об их патогенности и этиологической роли в развитии заболеваний человека оставался открытым, да и сейчас весьма далек от окончательного разрешения. Во многом это объясняется разнообразием микобактерий, а также сложностью их таксономической идентификации. По данным ряда авторов [1,3,5,9], в группу атипичных микобактерий медленно растущие нехромогенные (не образующие пигмента) *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*; *M. malmoense*, фотохромогенные (образующие желтый пигмент на свету) *M. kansasii* и *M. marinum*, скотохромогенные (образующие желтый пигмент в темноте) *M. scrofulaceum*, а также быстро растущие *M. fortuitum* и некоторые другие.

Изучение атипичных микобактерий позволило сделать вывод о том, что многие из них являются возбудителями заболеваний человека. Имеется большое количество сообщений о том, что микобактерии вызывают заболевания легких и дыхательных путей, кожные воспаления, язвы, гранулемы и абсцессы [9], лимфадениты [11, 14], болезни глаза и орбиты [13] и другие. Такие заболевания, согласно последнему (десятому) пересмотру Международной классификации болезней, называются микобактериозами (рубрика А31). Нередко они имеют неблагоприятный прогноз, с трудом поддаются терапии, характеризуются длительным бактериовыделением, частыми рецидивами [3,11,15].

Большинство исследователей [1,9,11,15] подчеркивает несомненную связь микобактериозов с состоянием иммунной системы больного. Как правило, атипичные микобактерии вызывают заболевания у лиц с первичными и вторичными иммунодефицитами, в том числе при применении иммунодепрессантов у больных после трансплантации органов.

Выявляемость атипичных микобактерий при патологии легких, кожи и лимфоузлов колеблется в среднем от 3-5% в Европе, США и Японии до 25% и более от общего количества выявленных микобактерий (в Африке). При этом в развитых зарубежных странах наблюдается четкая тенденция к увеличению выявляемости атипичных микобактерий, при этом снижается число случаев туберкулеза. Среди выявленных микобактерий преобладают представители комплекса *M. avium-M. intracellulare* (от 70% до 95%), значительно реже встречаются *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. fortuitum*, *M. xenopi* [3,15]. Единичные находки зарегистрированы для ряда других микобактерий, например, *M. szulgae*. В странах СНГ, и в частности, в Украине, выявляемость атипичных микобактерий крайне невысока, что, по-видимому, связано с несовершенством методов диагностики и отсутствием заинтересованности врачей и лаборантов.

К сожалению, вопросы диагностики, лечения и профилактики микобактериозов в нашей стране остаются нередко вне поля зрения не только врачей общей практики, но и фтизиопульмонологов. Выявляемость атипичных микобактерий составляет не более 2-3% от общего количества микобактерий.

В последнее время одним из наиболее перспективных методов лабораторной диагностики инфекционных заболеваний является ДНК-диагностика методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Геноспецифическая ПЦР с парой праймеров, фланкирующих строго определенный фрагмент генома возбудителя туберкулеза оказалась высокоэффективной при диагностике легочных и внелегочных форм туберкулеза [2,4,7]. Однако, при этом главное внимание уделялось выявлению типичных возбудителей туберкулеза. Между тем, существует значительное количество разновидностей ПЦР, которые позволяют выявить геномный полиморфизм организмов, провести таксономическую дифференцировку, определить устойчивость и чувствительность к различным препаратам, прогнозировать тяжесть течения заболевания. К таким методам относятся методы генотипирования организмов со случайными праймерами (Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD), анализ микросателлитных повторов (Simple Sequence Repeats -SSR, Inter-simple Sequence Repeats -ISSR) и ряд других. Одним из наиболее простых и доступных для широкого, в том числе клинического применения, является RAPD-анализ.

Цель работы. Выявить генетический RAPD-полиморфизм среди типичных и атипичных микобактерий и определить диагностическую ценность метода для практической дифференцировки выделенных штаммов микроорганизмов.

Материал и методы. В работе использовались чистые паспортизированные культуры штаммов микобактерий – возбудителей туберкулеза (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* *valee*) и атипичных микобактерий комплекса *M. avium-M. intracellulare*.

Микроорганизмы пересеивались на яичную питательную среду Левенштейна-Иенсена и культивировались при 37°C в течение 4 недель. Выросшие колонии снимались с агара и помещались в буфер ТЕ.

Выделение ДНК производилось согласно протоколу обработки материала в наборе

«Амплитуб» (г.Москва) с дополнениями и изменениями. При этом колонии суспендировались в 50 мкл 2%-ного раствора детергента Тритон X-100 и инкубировались при 95°C в течение 1 часа. Содержимое пробирки центрифугировали в течение 15 мин при 12000 об/мин. После центрифугирования осадок удалялся, а супернатант, представляющий собой клеточный лизат с бактериальной ДНК, использовали в качестве матрицы для ПЦР в объеме 2,5 мкл на пробу.

В качестве праймеров для RAPD-анализа использовались произвольные (случайные) праймеры № 19 и 45 (длина соответственно 19 и 21 нуклеотидов), любезно предоставленные для работы сотрудниками отдела молекулярной и радиационной биофизики Санкт-Петербургского института ядерной физики РАН. Ранее [6] было показано, что эти праймеры пригодны для исследования широкого круга микроорганизмов, включая патогенные бактерии и грибы.

Амплификация производилась в объеме 25 мкл, при этом каждая проба включала по 0,3 мкМ праймера, буфер, по 2,5 мкМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата, 1 ед термостабильной полимеразы Taq и 2,5 мкл подготовленной ДНК-матрицы. Амплификация включала 35 циклов.

Продукты амплификации анализировались путем электрофореза в 1,5 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Электрофореграммы фиксировались путем фотографирования на пленку «Микрат-300» через красный светофильтр x10. Математическая обработка результатов и сравнение электрофоретических паттернов производилось с помощью программы «Trees», позволяющей определить степень сходства и различия геномов микроорганизмов.

Результаты исследования и их обсуждение. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК различных видов микобактерий приведена на рис. 1. Визуальное сравнение паттернов атипичных микобактерий (дорожки 2,3, 7, 8) с паттернами возбудителей туберкулеза человеческого (дорожки 5, 10) и бычьего видов (дорожки 1,4, 6,9) свидетельствует о различиях в структуре ДНК туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий, выявляемых методом RAPD-анализа. При этом достаточно четкие различия наблюдаются как при использовании праймера № 19, так и при использовании праймера № 45. Последний выявляет большее количество фрагментов в высоко- и среднемoleкулярной областях (400...900 пар нуклеотидов) (дорожки 7,8,9, 10), а первый – в более низкомолекулярной области – 100...300 пар нуклеотидов (дорожки 1,3,4).

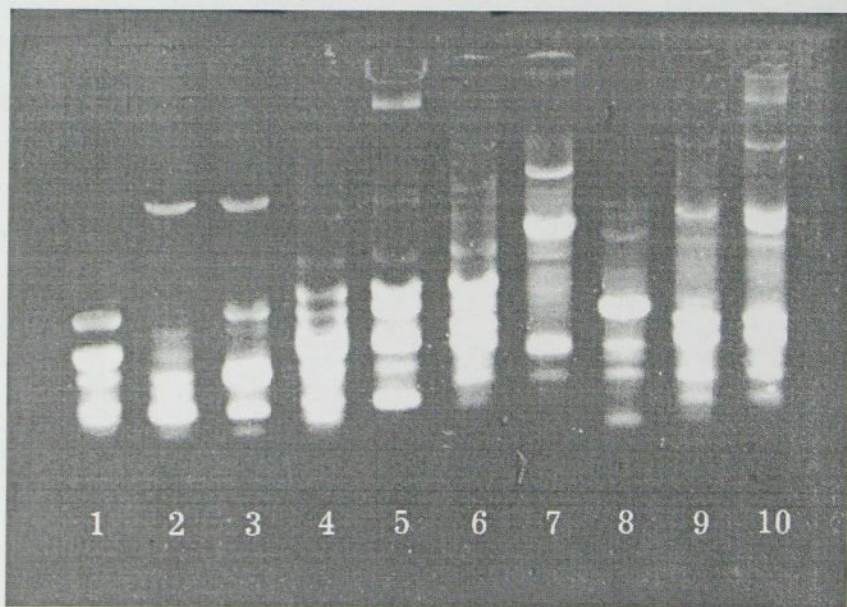


Рис.1. Электрофореграмма продуктов RAPD-амплификации ДНК микобактерий различных видов

1. *Mycobacterium bovis vaele*; 2. *Mycobacterium intracellulare*; 3. *Mycobacterium avium*
 4. *Mycobacterium bovis*; 5. *Mycobacterium tuberculosis*; 6. *Mycobacterium bovis vaele*;
 7. *Mycobacterium intracellulare*; 8. *Mycobacterium avium*; 9. *Mycobacterium bovis*;
 10. *Mycobacterium tuberculosis*
- Дорожки 1-5 - праймер № 19; дорожки 6-10 – праймер № 45

Результаты математического анализа полученных электрофореграмм при помощи программы «Trees» приведены на рис. 2 и 3.

Из приведенных схем генетических дистанций очевидны прежде всего различия между геномами исследованных микроорганизмов. Особенно большие генетические дистанции наблюдаются между возбудителями туберкулеза, объединенными в один кластер, с одной стороны, и атипичными микобактериями – с другой. Весьма четко это видно при использовании праймера № 19 (генетическая дистанция бо-

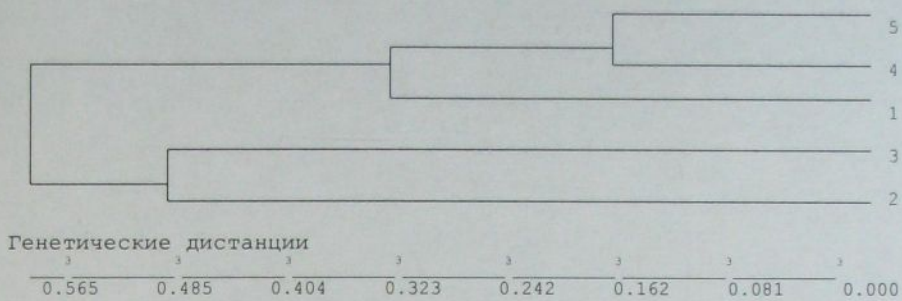


Рис.2. Результаты анализа генетических дистанций и родства между возбудителями туберкулеза и атипичными микобактериями с помощью праймера №19

1. *Mycobacterium bovis vaele*; 2. *Mycobacterium intracellulare*; 3. *Mycobacterium avium*; 4. *Mycobacterium bovis*; 5. *Mycobacterium tuberculosis*.

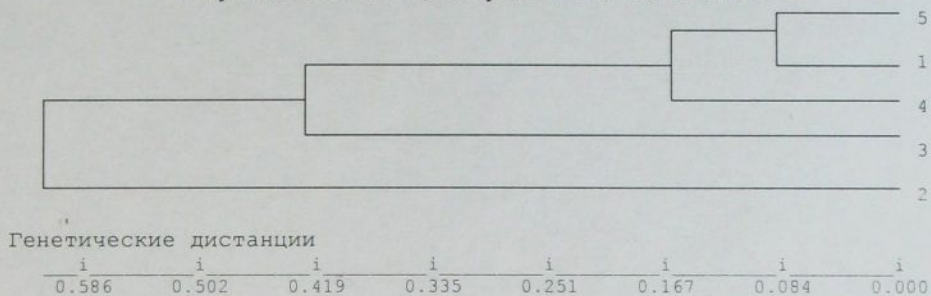


Рис.3. Результаты анализа генетических дистанций и родства между возбудителями туберкулеза и атипичными микобактериями с помощью праймера №45

1. *Mycobacterium bovis vaele*; 2. *Mycobacterium intracellulare*; 3. *Mycobacterium avium*; 4. *Mycobacterium bovis*; 5. *Mycobacterium tuberculosis*.

лее 0,565). Напротив, большее сходство наблюдается внутри кластера типичных микобактерий (дистанция 0,348). При использовании праймера № 45 также выделяется кластер типичных микобактерий – возбудителей туберкулеза человеческого и бычьего видов (дистанция 0,173). Наибольшие различия, по данным RAPD-анализа с праймером № 45, наблюдаются между видом *M.intracellulare* и остальными видами (дистанция более 0,586).

Весьма интересным является то, что при использовании обоих праймеров более близкое родство показано для человеческого и одного из подвидов бычьего вида, чем внутри бычьего вида. Это дает информацию для углубленного изучения генетической гетерогенности внутри вида *M.bovis*.

Таким образом, с помощью математической обработки патернов RAPD-анализа микобактерий различных видов удалось выявить четкие различия между группами типичных и атипичных микобактерий с одной стороны, а также межвидовые различия внутри групп – с другой. Это указывает на то, что RAPD-анализ применим для идентификации патогенных микроорганизмов и, в частности, для дифференцировки видов возбудителей туберкулеза и атипичных микобактерий – возбудителей микобактериозов человека. Использование RAPD-анализа с последующим определением генетических дистанций и кластеризацией представляется перспективным не только для видоидентификации патогенных микроорганизмов, но и для выявления внутривидовых групп сцепления, различающихся по лекарственной устойчивости, тяжести течения вызванного ими заболевания и т.д. Важнейшим преимуществом данного метода является его высокая точность и специфичность, так как исследования проводятся на материале ДНК микроорганизмов.

Выводы.

1. RAPD-анализ с произвольными праймерами позволяет выявить различия в строении генома различных видов микроорганизмов, определить межвидовые генетические дистанции и эффективно идентифицировать и дифференцировать различные виды атипичных микобактерий.

2. Выявление геномного полиморфизма патогенных микроорганизмов с последующим анализом методами кластеризации позволяет установить внутривидовые группы сцепления, коррелирующие с клинически значимыми свойствами микроорганизмов.

Литература. 1. Вильдерман А.М., Чебанова О.К. Микобактериозы и туберкулез у лиц с ВИЧ-инфекцией // Терапевт. архив. – 1991. – Т.63. – №11. – С.139-144. 2. Зигангирова Н.А. Полимеразная цепная реакция в диагностике хронических инфекций // Клини. лаб. диагностика. – 1998. – №9. – С.23-25. 3. Лопу-

хов Л.В., Эйдельштейн М.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т.2. – №3. – С.96-106. 4. Полимеразная цепная реакция с универсальными праймерами для изучения геномов / Булат С.А., Кабоев О.К., МIRONENKO Н.В. и др. // Генетика. – 1992. – Т.28, N.5. – С.19-28. 5. Радюк С.Н., Мацевич Г.Р. Полимеразная цепная реакция в диагностике туберкулеза // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №7. – С.11-13. 6. Туберкулез. Руководство для врачей / А.Г.Хоменко, В.И.Литвинов, И.Г.Маракуша и др.: под ред. А.Г.Хоменко. – М.: Медицина, 1996. – 496 с. 7. Cutaneous infections due to nontuberculous mycobacteria: histopathological review of 28 cases / Bartralot R., Pujoi R.M., Garcia-Patos V. et al. // J. Cutan. Pathol. – 2000. – Vol.27, N.3. – P.124-129. 8. Diagnosis, therapy and prognosis of atypical mycobacterial infections – results of retrospective study / Probst G., Apfel T., Schulz V. et al. // Pneumologie. – 1994. – Vol.48, N.9. – P.711-717. 9. Dual infection with atypical mycobacteria and Mycobacterium tuberculosis causing cervical lymphadenopathy in a child / Ganesan S., Thirowall A., Brewis C. et al. // J.Laryngol.Otol. – 2000. – Vol.114, N.8. – P.649-651. 10. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis / Morris S., Bai G.H., Suffys P. et al. // J. Infect Dis. – 1995. – Vol.171, N.4. – P.954-960. 11. Periocular atypical mycobacterial infections / Chang W.J., Tse D.T., Rosa R.H.J., Muller D. // Ophthalmology. – 1999. – Vol.106, N.1. – P.86-90. 12. Preoperative diagnosis of Mycobacterium avium lymphadenitis in two immunocompetent children by polymerase chain reaction of gastric aspirates / W.H.Haas, B. Amthor, G.Engelmann et al. // Pediatric Infectious Disease Journal. – 1998. – Vol.17, N.11. – P.1016-1020. 13. Sakatani M. Nontuberculous mycobacteriosis; the present status of epidemiology and clinical studies // Kekkaku. – 1999. – Vol.74, N.4. – P.377-384. 14. Simple and rapid identification of different species of Mycobacteria by PCR / Sechi L.A., Dupre I., Sanguinetti M. et al. // Mol.Cell Probes. – 1999. – Vol.13, N.2. – P.141-146.

RAPD-ANALYSIS IN THE IDENTIFICATION OF ATYPICAL MYCOBACTERIA

V.V.Nickolaevsky, Yu.I.Bazhora

Abstract. To determine the efficacy of applying PCR genotyping with random primers (RAPD) for the purpose of identifying atypical mycobacteria species the intra-genus PCR polymorphism of DNA of certified tuberculosis agents and atypical mycobacteria strains was studied. Computer assisted programs of mathematical processing of the RAPD analysis data allowed to establish clusters of species, determine interspecies genetic distances.

Key words: atypical mycobacteria, tuberculosis, mycobacterioses, molecular diagnostics, genotyping.

State Medical University (Odessa)

Надійшла до редакції 6.06.2001 року

УДК 611.611

М.А.Падалица

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЧЕЧНЫХ ЧАШЕЧЕК У ДЕТЕЙ МЛАДШЕГО ВОЗРАСТА

Кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии (зав. – проф. М.П.Бурых)
Харьковского государственного медицинского университета

Резюме. Верхняя почечная чашечка наибольшее анатомическое образование в структуре чашечно-лоханочного комплекса детей младшего возраста. Установлена средней силы обратная коррелятивная связь между общим объемом чашечно-лоханочного комплекса и объемом верхней и передней средней почечных чашечек.

Ключевые слова: почка, чашечно-лоханочный комплекс, почечная чашечка.

Вступление. В последние годы интенсивно изучаются различные аспекты анатомии чашечно-лоханочного комплекса (ЧЛК) почки и почечных чашечек (ПЧ) человека зрелого и пожилого возраста применительно к выполнению органосохраняющих операций. В предыдущих работах описаны морфометрические характеристики ПЧ новорожденных и детей грудного возраста [1-4].

Цель исследования. Изучить морфометрические характеристики почечных чашечек у детей младшего возраста.