

крови в микроциркуляторном звене кровообращения постоперационного рубца, т.к. проведенная по методике П.П. Бакшинского (2001) ОТО на отечественном аппарате ЛАКК-02 позволила идентифицировать нормализацию значений сатурации тестируемого объема крови у больных основной группы наблюдения ($1,57 \pm 0,04$ усл. ед. при $N=1,5-1,7$ усл. ед.), тогда как у пациентов контрольной группы наблюдения (как до окклюзии, так и в процессе окклюзии тестируемого объема крови) названные показатели достигали лишь 80-82% от нормы. Аналогично выглядело итоговое соотношение (по завершению санаторного и поликлинического этапа реабилитации больных из обеих групп) оксигенированных и дезоксигенированных фракций гемоглобина в 1 мл тестируемой крови, что характеризовало рост недоокисленных продуктов обмена в относительно ишемизированных рубцовых тканях больных контрольной группы наблюдения, тогда как подобные процессы в основной группе наблюдения при выписке из здравниц – баз исследования оказались нормализованными. Эти значения оптической тканевой оксиметрии состояли в прямой корреляционной зависимости с показателями иммунологической защиты изучаемых пациентов, когда сниженные (до лечения) концентрации СДЗ⁺ и СД4⁺ расценивались нами как сочтенное участие вышеописанных нарушений сосудистой микроциркуляции в иммунном ответе на наличие воспалительного очага постоперационной рубцовой ткани. При этом следует подчеркнуть, что количество СД4⁺-лимфоцитов, т.е. маркеров Т-хелперных клеток, и количество СД8⁺-лимфоцитов (маркеров Т-супрессорных клеток) под влиянием авторских схем санаторной реабилитации удалось привести к нормальному уровню, тогда как в контрольной группе, где использовались стандартные формы поликлинической реабилитации, эти показатели существенного позитивного изменения не претерпели.

Вывод. По завершению авторского курса санаторной реабилитации пациентов с демпинг-синдромом оперированного желудка у больных основной группы наблюдения ($n=286$, $p<0,05$) объективизирована следующая позитивная динамика ведущих клинико-функциональных характеристик: а) на ЛДФ-граммах имевшееся изначально увеличение перфузии в околурубцовой зоне (от 3 до 6 пф.ед.), снизилось до 0,94 пф.ед. при выписке из здравниц, что свидетельствует о полной компенсации застойных процессов в постоперационной рубцовой ткани; б) количество СД4⁺-лимфоцитов, т.е. маркеров Т-хелперных клеток, и количество СД8⁺-лимфоцитов (маркеров Т-супрессорных клеток) под влиянием авторских схем санаторной реабилитации удалось привести к нормальному уровню; в) при оптической тканевой оксиметрии (ОТО) идентифицирована нормализация значений кислородной сатурации тестируемого объема крови ($1,57 \pm 0,04$ усл. ед. при $N=1,5-1,7$ усл. ед.), тогда как у пациентов контрольной группы наблюдения (как до окклюзии, так и в процессе окклюзии тестируемого объема крови) названный показатель достигал лишь 80-82% от нормы.

Литература

1. Базанов Г.В., Андреев С.Д., Адамян А.А. Эффективность раннего и позднего купирования демпинг-синдрома оперированного желудка // Новый хирургический вестник. 2006. №2. С. 27–31.
2. Виокуров Б.Л. и соавт. Унифицированные методики исчисления длительности аэротерапии и морских процедур на курорте Сочи // Блокнот климатолога. 2002. №6. С. 48–56.

SPASMOLYTIC AND IMMUNOSTIMULATING EFFECT OF NATURAL MINERAL WATER "LAZAREVSKAYA" IN STOPPING EARLY AND LATE THE OPERATED STOMACH DUMPING-SYNDROME

I.L. PENZHOYAN

Research Institute of Neuroorthopaedy and Rehabilitation Medicine, Sochi

After finishing the author's course of sanatorium rehabilitation the basic group patients with a dumping-syndrome of the operated stomach ($n=286$, $p<0,05$) in fact revealed positive dynamics of principle clinical-and-functional characteristics.

Key words: operated stomach syndrome, mineral water "Lazarevskaya", sanatorium correction.

УДК: 579.2:579.61:616.6-07

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА

М.А.ОРЛИНА, И.С. НЕМОВА, Н.И. ПОТАТУРКИНА-НЕСТЕРОВА*

Диагностика микоплазмозов культуральным методом часто вызывает затруднение ввиду сложности культивирования возбудителей. Полимеразная цепная реакция позволяет значительно повысить показатели обнаружения микоплазм. Целью настоящей работы явилось сравнение эффективности полимеразной цепной реакции с различными методиками выделения ДНК *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* у больных с урогенитальными инфекциями. Показано, что в случае выделения ДНК с использованием сорбента, по сравнению с фенольно-хлороформным преципитирующим методом экстракции, наблюдался максимальный продукт амплификации, что свидетельствует о наиболее полном экстрагировании ДНК из бактерий. Данный метод полимеразной цепной реакции был наиболее эффективным при диагностике урогенитальных инфекций микоплазменной этиологии.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, ДНК, микоплазмы, амплификация, праймеры, урогенитальные инфекции, хронический уретрит, аднексит, эндоцервицит, кольпит.

В течение последних лет, несмотря на значительное расширение арсенала фармакологических средств, методов диагностики, лечения и т.п., частота воспалительных заболеваний органов малого таза не имеет тенденции к снижению [8,9,10].

В настоящее время недопустимо основывать диагностику генитальных инфекций на основании только одного метода и только по результатам выявления какого-либо одного микроорганизма, который потенциально может быть возбудителем воспалительного процесса [7,8].

Одним из ведущих методов современной лабораторной диагностики является *полимеразная цепная реакция* (ПЦР). Она чрезвычайно чувствительна и специфична, ей свойственна высокая технологичность и надежность, возможность количественного определения патогена в исследуемом материале. ПЦР-диагностика превышает чувствительность культурального метода, но ее результаты могут существенно варьировать в зависимости от применяемой методики исследования [4,5,11]. Особую ценность эта реакция имеет при выявлении возбудителей, которых трудно идентифицировать другими методами.

Затруднения в диагностике часто возникают при выявлении этиологии *урогенитальных инфекций* (УИ), представляющих собой значительную медико-социальную проблему. Одним из ведущих возбудителей УИ являются микоплазмы [6]. *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* вызывают 15-25% случаев острого и хронического негонекоккового уретрита, а также эндометрит, хориоамнионит, эпидидимит, вызывая нарушения репродуктивной функции, патологии беременности и плода [2]. Однако, диагностика микоплазменных инфекций часто затруднена в связи со сложностью их культивирования на питательных средах [3,12], а выявление антител к микоплазмам далеко не всегда дает полезную информацию [1].

Целью исследования – сравнение эффективности ПЦР-диагностики микоплазм классическим методом выделения ДНК с использованием сорбента и фенольно-хлороформным преципитирующим методом экстракции ДНК.

Материалы и методы исследования. Изучено 268 образцов исследуемого материала, полученного у пациентов с острым и хроническим уретритом (41,7%), аднекситом (13,8%), эндоцервицитом (26,8%) и кольпитом (18,2%). Микробиологическую диагностику производили культуральным методом с использованием питательных сред «Микоплазма-50» и «Микоплазма-АЧ ФГУ» (НИИЭМ им Пастера) [3].

Из полученных культур микоплазм выделяли 67 образцов ДНК *M. hominis*, 46 – *M. genitalium*, 155 – *U. urealyticum*. Выделение ДНК проводили с использованием оптимизированных коммерческих наборов: «Проба ГС» и «Проба НК» производства ООО «ДНК-Технология» (г. Москва), «Пробоподготовка универсальная для выделения ДНК» ООО «ИзоГен» (г. Москва), «ДНК-Экспресс» и «Выделение ДНК из биопроб» НПФ «Литех» (г. Москва) и «ДНК-сорб-А-М – вариант 100» «ИнтеЛабСервис» (г. Москва). Выделение ДНК проводили по методике НПФ «Литех» (г. Москва).

Для проведения амплификации использована коммерческая стандартная лиофилизованная реакционная смесь с оптимизиро-

* ГОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», 432970 г. Ульяновск, ул. Л.Толстого, 42, e-mail: nemova_irina@bk.ru

ванной для классической схемы ПЦР буферной системой производства ООО «ИзоГен» (г. Москва). НПФ «Литех» (г. Москва).

С целью электрофоретической детекции применяли 2,3% агарозный гель и коммерческие наборы производства ООО «ДНК-Технология» (г. Москва) (ПОЛИМИК УР и ПОЛИМИК МК).

Отбор проб микоплазм проводили в одноразовые полипропиленовые пробирки «Эппендорф» объемом 1,6 мл. Материал из колоний микоплазм помещали 500 мкл стерильного 0,9% NaCl, осаждали при 12000 об./мин на центрифуге «Эппендорф» (Cyclotemp-202, Россия). Осадок ресуспендировали и разводили в буфере, содержащем 2,5мМ MgCl₂ 0,01% желатин, до конечной концентрации 10⁴ КОЕ/мл. Культуры лизировали при помощи коммерческого набора «ДНК-Экспресс» (НПФ «Литех», г. Москва) для термического клеточного лизиса. Хранение образцов перед использованием осуществляли при 4°C.

Для процесса амплификации использовали приборы «Терцик» производства ООО «ДНК-Технология» (г. Москва) с активным регулированием внутри реакционной смеси, что позволяет не только добиться стабильной температуры (±0,1°C), но и проводить сам процесс в более короткие сроки.

Проведение амплификации состояло из трех этапов: денатурации ДНК при 94°C, отжига праймеров на денатурированной ДНК и элонгации (синтеза новой цепи с помощью фермента Таq-ДНК-полимеразы, наибольшая активность которого проявляется при 72°C).

В работе применяли: классический метод выделения ДНК с использованием сорбента (первый метод) и фенольно-хлороформный преципитирующий метод экстракции ДНК (второй метод).

Праймеры для идентификации *M genitalium* CCACTCGA GCCAAGGCCAAGGCCCTC-20,2 и CTACGGGGAAAGCGGGGA-20, для *M. hominis* P-120 CTCCCAGAACCGGCTCACC и P-56 TGGGCGGACCCCTCATGCCAG, *U.urealyticum* Ur5-GCGCAGGCGGGTTGAAGTTTGGT-3.

Ur2-5GCCCTATCCCGAACTGAGTAAC-3 были выбраны на основании нуклеотидной последовательности в GenBank L08642 и использованы для амплификации фрагмента генов G37 и G317 микоплазм длиной 215 и 713 н.п. соответственно. Для подбора праймеров были использованы программы Gene Runner Version 3.05 и Primer Blast (ресурсы GeneBank).

На этапе детекции продукты амплификации ПЦР (20мкл) анализировали электрофоретически, для чего были использованы готовые агарозные гели, содержащие 2,3% агарозы и бромистого этидия. Электрофоретический буфер также входил в состав коммерческого набора.

Анализ электрофореграмм проводили с помощью видеосистемы Gel Imager и программного обеспечения Gel Analyzer, что позволило документировать и обрабатывать видеозображение фореграмм в УФ-излучении при длине волны 254 нм.

Статистическую обработку данных проводили при помощи программы «Statistica for Windows».

Результаты и их обсуждение. Исследование 268 клинических образцов ДНК выявило наличие в них *M. hominis*, *M. genitalium* и *U. urealyticum*. в 92 (34,3%) случаях (рис.1).

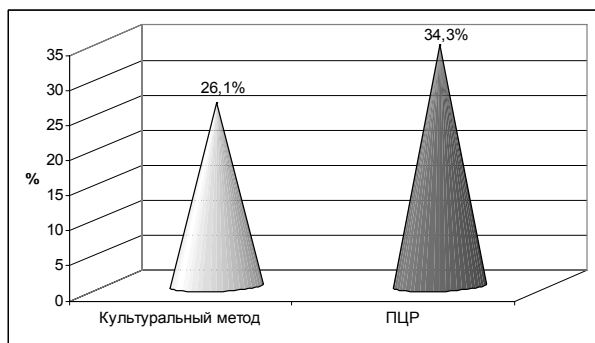


Рис. 1. Показатели инфицированности пациенток микоплазмами, выявленными культуральным методом и ПЦР

Результаты ПЦР-анализа микоплазм показали, что использование видоспецифических праймеров позволяет дифференцировать виды *M. hominis*, *M. genitalium* и *U. urealyticum*. В ряде случаев

ДНК из клинических образцов реагировала с праймерами на два или три указанных вида возбудителей одновременно, что указывает на их возможную ассоциацию. В виде моноинфекций микоплазмы выявлены у 62 пациенток (23,1%), в виде ассоциаций – у 93 человек (34,7%). Наиболее частыми ассоциантами являлись *M. hominis* и *U. urealyticum* (62%), а также *M. hominis* и *M. genitalium* (36%). У 2% больных женщин были обнаружены ассоциации, включающие *M. hominis*, *M. genitalium* и *U. urealyticum*.

Анализ выявляемости возбудителей при воспалительных заболеваниях урогенитального тракта показал, что *M. hominis* культуральным методом была выявлена у 95 больных (35,8%). Из них микоплазмы обнаружили у 41 больной уретритом (43,2%), у 22 (23,1%) – эндцервицитом, у 12 (12,6%) – аднекситом и у 20 (21,1%) – кольпитом (табл. 1).

Таблица 1

Показатели выявления микоплазм у пациенток с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта культуральным методом и ПЦР

Возбудители	Заболевания							
	Уретрит		Цервицит		Аднексит		Кольпит	
	Культуральный метод	ПЦР	Культуральный метод	ПЦР	Культуральный метод	ПЦР	Культуральный метод	ПЦР
<i>M. hominis</i>	41 (43,2%)	61 (94%)	22 (23,1%)	42 (65%)	12 (12,6%)	22 (34%)	20 (21,1%)	30 (46%)
<i>M. genitalium</i>	-	54 (83%)	-	28 (43%)	-	12 (17%)	-	10 (15%)
<i>U. urealyticum</i>	43 (16%)	63 (23%)	26 (9%)	44 (16%)	18 (6%)	28 (10%)	20 (7%)	32 (12%)

Далее было проведено сравнительное изучение результатов ПЦР при подготовке проб ДНК к амплификации: классическим методом выделения ДНК с использованием сорбента (1 метод) и фенольно-хлороформным преципитирующим методом экстракции ДНК (2 метод). Проведенные исследования показали, что в случае выделения ДНК с использованием сорбента наблюдался максимальный продукт амплификации, что свидетельствует о наиболее полном экстрагировании ДНК из бактериальных клеток. Ни в одном случае с использованием сорбента не было выявлено ингибирования реакции, что также имеет важное значение при оценке результатов (табл. 2).

Таблица 2

Результаты выявления микоплазм методом ПЦР при воспалительных заболеваниях урогенитального тракта (%)

Возбудители	Варианты ПЦР	
	Классический метод ПЦР с использованием сорбента	Фенольно-хлороформный метод
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	47	-
<i>Mycoplasma hominis</i>	35	-
<i>Mycoplasma genitalium</i>	18	-

При амплификации ДНК классическим методом с использованием сорбента (рис. 2) было установлено, что амплифицируемые фрагменты ДНК содержали в 12 пробе 500 пар нуклеотидных оснований (п.о.), в 14 пробе – 200 п.о., в 18 пробе – 528 п.о., в 22 пробе – 500 п.о., что соответствует положительному результату.

Полученные результаты свидетельствовали не только о положительных результатах содержания копий ДНК в исследуемом материале, но и позволили определить их количественные показатели.

1-3 «Проба ГС» (НПФ «ДНК-Технология»), 4-6 «Пробоподготовка универсальная для выделения ДНК» (ООО «ИзоГен»), 7-9 «Выделение ДНК из биопроб» (НПФ «Литех»), 10-12 «ДНК-сорб-А-М – вариант 100» («ИнтеЛабСервис»), 16-18 «ДНК-Экспресс» (НПФ «Литех»), 19-21 «Проба НК» (НПФ «ДНК-Технология»), 1,4,7,10,13,16,19 – отрицательные контроли (в качестве пробы денонизированная вода), 2,5,8,11,17,20 – отрицательные контроли (в качестве пробы – буферные растворы наборов для растворения выделенных, ДНК- соответственно наборам), 3,6,9,12, 14,18,21,22- аликвота выделенной ДНК *M.hominis*.

Выделение тотальной ДНК фенольно-хлороформным преципитирующим методом ДНК показало, что полосы электрофореграммы не четкие, что свидетельствует о деградации ДНК (рис.3).

1-3 «Проба ГС» (НПФ «ДНК-Технология»), 4-6 «Пробоподготовка универсальная для выделения ДНК» (ООО «ИзоГен»), 7-9 «Выделение ДНК из биопроб» (НПФ «Литех»), 10-12 «ДНК-сорб-А-М – вариант 100» («ИнтеЛабСервис»), 13-15 «ДНК-Экспресс» (НПФ «Литех»), 16-17 «Проба НК» (НПФ «ДНК-

Технология), 1,4,7,10,13 – отрицательные контроли– деионизированная вода, 2,5,8,11,14,16 – отрицательные контроли – буферные растворы наборов для растворения выделенных ДНК-соответственно наборам, 3,6,9,12,15,17- культура .M.hominis.

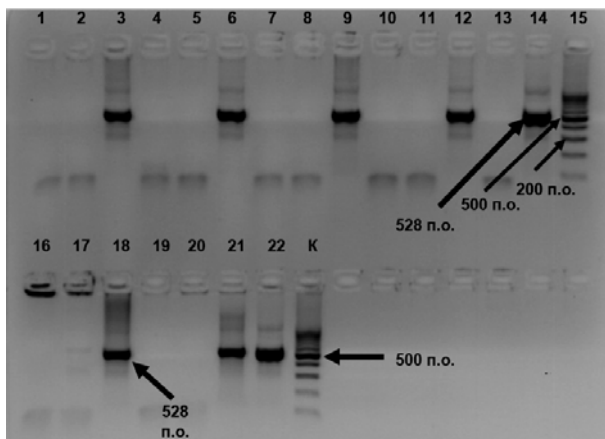


Рис.2. Электрофореграмма полученных продуктов амплификации в агарозном геле

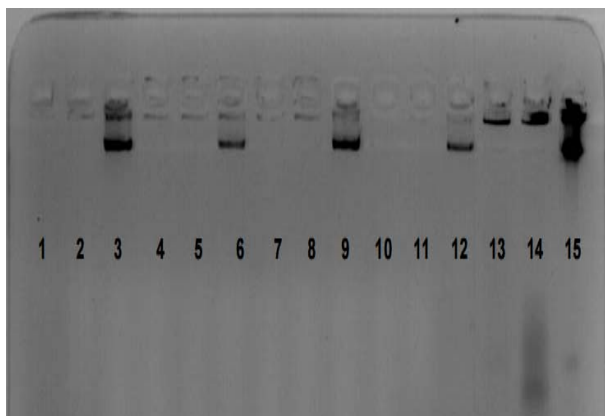


Рис.3. Электрофореграмма тотальной ДНК после этапа выделения:

Выводы. Выявляемость ДНК микоплазм с помощью ПЦР была значительно выше, чем культуральным методом. Амплификация ДНК классическим вариантом с использованием сорбента позволяет более точно оценить полноту сохранения ДНК, чем фенольно-хлороформный преципитирующий метод экстракции ДНК после термического лизиса клеток. При экстракция ДНК сорбентом наблюдается максимальный продукт амплификации, свидетельствующий о наиболее полном экстрагировании ДНК из бактериальных клеток. Ни в одном случае с использованием сорбента не было выявлено ингибирование реакции, кроме того, все коммерческие наборы с применением сорбентов от разных производителей давали сопоставимые результаты.

На электрофореграмме тотальной ДНК после термического лизиса клеток и фенольно-хлороформный преципитирующей экстракции ДНК образуются следы деградации ДНК и наличия примеси. Эти продукты не отражаются на процессе амплификации ДНК *M. hominis*, *M. genitalium* и *U. urealyticum*, но могут играть роль ингибиторов при работе с биологическим материалом от пациентов. Таким образом, методику выделения ДНК необходимо выбирать исходя из конкретных потребностей эксперимента и наличия реагентов и времени.

Литература

1. Дмитриев А. Г. Лабораторная диагностика бактериальных урогенитальных инфекций. М.: Медицинская книга, 2003. 336 с.
2. Карамова А. Э. Значение микоплазм в развитии воспалительных заболеваний урогенитального тракта, генетические аспекты резистентности к антибиотикам, тактика ведения больных. Автореф. канд. мед. наук. Москва, 2003. 19 с.

3. Красноженов Е.П. Микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний. Ростов н / Дону: Феникс, 2006. 252 с.

4. Лашин С.А. и др. Корреляции оперонной структуры с длиной генома у 14 видов микоплазм // Вестник ВОГиС. 2009. Том 13. №1. С. 84–89.

5. Методические указания МУ 1.3.1888-04. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности, Москва. 2004.

6. Прилепская В.Н., Кисина В.И., Соколовский Е.В. К вопросу о роли микоплазм в урогенитальной патологии. Гинекология. 2007. №1.

7. Савичева А.М. Лабораторная диагностика и терапия репродуктивно значимых инфекций // Лечащий врач. 2008. № 3.

8. Фофанова И.Ю. Роль генитальной условно-патогенной микрофлоры в акушерстве и гинекологии // Гинекология. 2008. №2. С 1–2.

9. Яглов В.В., Прилепская В.Н. Воспалительные заболевания органов малого таза в практике врача-гинеколога. Гинекология. 2007. №

10. Brotman RM, Erbelding EJ, Jamshidi RM, et al. Findings associated with recurrence of bacterial vaginosis among adolescents attending sexually transmitted diseases clinics. J.Pediatr Adolesc Gynecol. 2007 Aug; 20(4):225–31.

11. Ferris M.J., Maszjal A., Martin D.H. Use of species-directed 16S rRNA gene PCR primers for detection of Atopobium vaginae in patients with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol. 2004; 42:5892–4.

12. Schwiertz A, Taras D, Rusch K, Rusch V. Throwing the dice for the diagnosis of vaginal complaints? Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2006 Feb 17;5:4, 1–7.

EFFICIENCY OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN DIAGNOSTICS OF UROGENITAL INFLAMMATION DISEASES

M.A. ORLINA, I.S. NEMOVA, N.I. POTATURKINA-NESTEROVA

Ulyanovsk State University

Mycoplasmosis diagnostics by means of cultural method often causes difficulties difficulty due to complexity of causative agent cultivation. Polymerase chain reaction (PCR) helps to increase the indices of mycoplasma detection considerably. The purpose of this work is to compare PCR efficiency with various means of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* DNA isolation among the patients with urogenital infections (UI). It was demonstrated that in case of DNA isolation using sorbent, the maximum amplification product was observed in comparison with phenol-chloroform precipitation method of extraction. It testifies to more complete DNA extraction from bacteria. Such a PCR method was most effective while diagnostics of UI mycoplasma etiology.

Key words: polymerase chain reaction, DNA, *Mycoplasma*, amplification, primers, urogenital infections, chronic urethritis, adnexitis, endocervicitis, colpitis.

УДК. 615. 065:616-092.9

ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ ПОБОЧНЫХ ЭФФЕКТОВ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Т.В. УЛАНОВА, В.И. ИНЧИНА, Е.В. СЕМЕНОВА, А.В. СЕМЕНОВ*

Исследование проводилось на белых половозрелых крысах. В течение эксперимента животные внутримышечно получали дексаметазон в дозе 0,8 мг/кг один раз в день в течение 15 дней. Исследуемое соединение – фумарат 3-гидроксипиридина вводили параллельно с дексаметазоном в течение 15 дней в дозе 50 мг/кг перорально. Оценивались уровень глюкозы в сыворотке крови, малонового диальдегида, активность каталазы и морфологическая структура коркового слоя надпочечников. Было установлено, что исследуемое соединение корректирует такие побочные эффекты глюкокортикоидов как гипергликемия и атрофия коры надпочечников, а также проявляет выраженную антиоксидантную активность.

Ключевые слова: глюкокортикоиды, гипергликемия, атрофия коры надпочечников, производное 3-гидроксипиридина.

* Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, 430000 г. Саранск, ул. Большевикская, 68