

Cojocari L., *Răspândirea afecțiunilor pulmonare nespecifice cronice în Moldova* // Actualități în epidemiologia, depistarea, diagnosticul și tratamentul tuberculozei și bolilor pulmonare nespecifice, Chișinău, 2002, p. 75-78 (0,2).

9. Соловьев К.И., *Структура хронической неспецифической патологии органов дыхания и её распространённость по результатам эпидемиологического исследования* // X-й национальный конгресс по болезням органов дыхания, Санкт-Петербург, 2000, с.376.

10. Чучалин А.Г, Аверьянов А.В, Антонова И.В, Черняев А.Л., *Концепция развития пульмонологической помощи населению Российской Федерации (2004-2008 гг.)* // Пульмонология, том. I, 2004, с. 34-37.

### Rezumat

Pentru studierea factorilor de risc în dezvoltarea bolilor nespecifice ale aparatului respirator (BNAR) la adulți a fost întocmită la începutul studiului o anchetă, care a prevăzut acumularea informației despre simptomele BNAR, fumat, prezența anamnezei alergice, factorii socioeconomiци. În studiu au fost incluși locuitori din mediile urban (or. Chișinău) și rural (s. Rudi). În total au fost completate 3809 anchete.

Factorii favorizanți de dezvoltare a BNAR evidențiați sunt fumatul, patologia asociată rinofaringiană, infecțiile acute recidivante ale căilor respiratori.

### Summary

For the study of the risk factors in the development of nonspecific diseases of the respiratory tract (NDRT) in adults there was worked out an inquiry at the beginning of the study, which foresaw the accumulation of information about NDRT symptoms: smoking, presence of allergy history and socio – economic factors. The study included inhabitants of the urban area (Chisinau city) and rural area (Rudi village). The total number of the completed inquiries was 3809.

The highlighted risk factors, favorable for the NDRT development, are: smoking, rhynopharyngeal pathology, the severe recidivates infections of the respiratory tract.

## EXTRACȚIA ADN GENOMIC UMAN DIN SÂNGE DECONGELAT

**Victor Popescu**<sup>1</sup>, dr. în biologie, cercet. științ., **Angela Gavriliuc**<sup>1</sup>, dr. în biologie, cercet. științ., **Igor Cemortan**<sup>3</sup>, dr. în biologie, conf., **Diana Manea**<sup>1</sup>, dr. în medicină, cercet. științ., **Andrei Ichim**<sup>1</sup> dr. în medicină, cercet. științ., **Valeriu Istrati**<sup>2</sup>, dr. h., în medicină prof. univ., Laboratorul de Genetică<sup>1</sup>, USMF “Nicolae Testemițanu”<sup>2</sup>, USMF “Nicolae Testemițanu”<sup>3</sup>

Se știe că ADN-ul genomic uman poate fi extras din sânge prin diferite metode. Printre procedeele cele mai simple, care permit obținerea ADN-ului genomic, de o puritate înaltă este și metoda propusă de J.Grimberg și colab., 1989. Acesta, fiind nontoxic, este un procedeu avantajos și pentru operator, deoarece exclude utilizarea fenolului și a cloroformului pentru purificarea ADN. Metoda respectivă permite extragerea ADN-ului genomic din cantități relativ mici de sânge. În plus, metoda lui J.Grimberg se caracterizează prin eficiență înaltă, rapiditate și fezabilitate la costuri joase, fiind recomandată în literatura de specialitate pentru procesarea sângelui uman recoltat proaspăt (L.Kirby, 1990).

În prezenta lucrare, pentru a preciza condițiile de efectuare a operațiunii în vederea extragerii de ADN genomic uman din 1 ml sânge decongelat, a fost aplicată metoda elaborată de J.Grimberg.

**Materiale și metode.** Extracția ADN genomic uman a fost realizată din sânge după 3 luni de păstrare la temperatura de -20 °C. Pentru aceasta am aplicat metoda lui J.Grimberg, precizată și

adaptată la condițiile laboratorului nostru. Purity ADN-ului obținut după extracție s-a evaluat prin spectrofotometrie UV convențională (L.Kirby, 1990).

**Rezultate și discuții.** Pentru stabilirea eficienței metodei, am efectuat extracții repetate de ADN din sânge venos, recoltat de la diferite persoane, utilizând în calitate de anticoagulant soluție 0,5 M EDTA [0,05 ml EDTA (0,5 M) / ml sânge]. De fiecare dată flaconul-recipient a fost inversat pentru a se amesteca sângele cu agentul anticoagulant. Pentru păstrare de lungă durată (peste 48 de ore) sângele a fost pus în congelator.

În prealabil, am preparat soluțiile tampon, care asigură liza celulelor sangvine și a nucleilor, CLB și PLB. Soluția tampon CLB conține: 0,32 M zaharoză, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100. Compoziția soluției PLB este următoarea: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA. La soluția PLB am adăugat proteinază K până la concentrația finală de 1 mg/ml.

În continuare, descriem procedeul aplicat de noi pentru extragerea ADN genomic uman din 1 ml de sânge. Flaconul cu sânge a fost scos din congelator, sângele fiind menținut la temperatura camerei până când s-a decongelat complet (cel puțin 30 min).

Într-o eprubetă s-a adăugat 4 ml soluție CLB, menținută la 4 °C. Cu ajutorul unei pipete s-a prelevat 1 ml de sânge decongelat (în prealabil, am inversat flaconul), pe care l-am adăugat în eprubeta cu CLB rece (4 °C). Eprubeta a fost supusă centrifugării la 900×g, 5 min. La această etapă a avut loc liza eritrocitelor și sedimentarea leucocitelor (Promega Protocols). În continuare am prelevat cu ajutorul unei pipete supernatantul (4 ml), care se aruncă, a urmat apoi procedeul de spălare a concentratului leucocitar prin adăugarea acestuia peste 3 ml soluție CLB rece, după care am centrifugat la 900×g, 5 min. Supernatantul (3 ml) obținut după centrifugare a fost îndepărtat, apoi peste concentratul leucocitar (1 ml) căpătat s-a adăugat 250 μl PLB cu proteinază K. Pentru a se produce omogenizarea conținutului eprubetei, aceasta a fost înclinată de câteva ori, apoi eprubeta a fost introdusă în termostat la 65 °C pentru 2 ore. Periodic, se înclina eprubeta și se rotea în jurul axei ei pentru a asigura contactul proteinazei K cu toate celulele nucleate și cu nucleoproteidele.

După incubare, s-a efectuat concentrarea ADN-ului, prin adăugarea amestecului tratat cu PLB + Proteinază K, peste două volume etanol rece (-20 °C) cu concentrația de 95%. Tubul Eppendorf a fost înclinat și rotit lent. La această etapă au apărut vizibile filamente albicioase de ADN. Apoi amestecul a fost centrifugat la 13000×g, 15 min. Am decantat etanolul și am lăsat tubul deschis, cu gura în jos, pe hârtie de filtru timp de 5 min. După aceasta în tubul Eppendorf 500 μl s-a adăugat etanol 70% la temperatura camerei, tubul fiind înclinat de câteva ori până când ADN-ul a fost resuspendat. Tubul a fost rotit lent pentru a asigura spălarea ADN-ului, apoi s-a realizat centrifugarea la 13000×g, 5 min. Alcoolul a fost decantat, iar tubul s-a lăsat cu gura în jos pe hârtie de filtru 20 min, până când s-a evaporat etanolul și apa.

ADN-ul a fost resuspendat prin adăugarea în tub a 300 μl de soluție LTE cu compoziția: 10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0. Pentru a asigura rehidratarea și solubilizarea ADN, s-a incubat proba la 37 °C, 30 min.

Ulterior, soluția ADN în LTE a fost supusă spectrofotometriei UV în vederea stabilirii purității ADN-ului obținut în urma extracției. În acest scop am folosit o cuvă din cuarț umplută cu soluție LTE, care a servit drept etalon, iar în cuvele alăturate s-a adăugat ADN-ul diluat cu LTE până la 3 ml. În continuare prezentăm indicațiile citite la spectrofotometru la două lungimi de undă ( $\lambda_1=260$  nm și  $\lambda_2=280$  nm) pentru fiecare din cele 10 probe de ADN.

**Densitatea optică și puritatea ADN genomic extras prin metoda  
Grimberg J. (1989) din sânge uman decongelat**

<i>Nr. tubului cu soluție ADN în LTE</i>	<i>Lungimea de undă (nm)</i>	<i>Densitatea optică</i>	<i>Raportul DO<sub>1</sub>/ DO<sub>2</sub></i>
1.	$\lambda_1$ 260	DO <sub>1</sub> 0,436	1,809
	$\lambda_2$ 280	DO <sub>2</sub> 0,241	
2.	$\lambda_1$ 260	DO <sub>1</sub> 0,446	1,805
	$\lambda_2$ 280	DO <sub>2</sub> 0,247	
3.	$\lambda_1$ 260	DO <sub>1</sub> 0,458	1,810
	$\lambda_2$ 280	DO <sub>2</sub> 0,253	
4.	$\lambda_1$ 260	DO <sub>1</sub> 0,465	1,795
	$\lambda_2$ 280	DO <sub>2</sub> 0,259	
5.	$\lambda_1$ 260	DO <sub>1</sub> 0,477	1,800
	$\lambda_2$ 280	DO <sub>2</sub> 0,265	
6.	$\lambda_1$ 260	DO <sub>1</sub> 0,481	1,801
	$\lambda_2$ 280	DO <sub>2</sub> 0,267	
7.	$\lambda_1$ 260	DO <sub>1</sub> 0,493	1,806
	$\lambda_2$ 280	DO <sub>2</sub> 0,273	
8.	$\lambda_1$ 260	DO <sub>1</sub> 0,502	1,806
	$\lambda_2$ 280	DO <sub>2</sub> 0,278	
9.	$\lambda_1$ 260	DO <sub>1</sub> 0,514	1,803
	$\lambda_2$ 280	DO <sub>2</sub> 0,285	
10.	$\lambda_1$ 260	DO <sub>1</sub> 0,524	1,813
	$\lambda_2$ 280	DO <sub>2</sub> 0,289	

Datele obținute arată că raportul  $DO_{260} / DO_{280}$  este cuprins între 1,795 - 1,813, ceea ce demonstrează o prevalență sporită a ADN în soluția finală rezultată după extracție. În cazul probelor ADN procesate, valorile raportului  $DO_{260} / DO_{280}$  sunt foarte apropiate de indicele de absorbție 1,8, stabilit prin cercetările altor autori (L.Kirby, 1990) pentru a atesta puritatea ADN. Conform datelor din literatura de specialitate (J.Grimberg et al., 1989), dacă ADN-ul se caracterizează prin acești parametri, el poate fi utilizat pentru analize cu ajutorul enzimelor de restricție și PCR. În aceste experimente, cantitatea de ADN extras din 1 ml de sânge, constituie, în medie, 24  $\mu$ g, adică 66,7%, față de cea teoretic așteptată - 36  $\mu$ g. În comparație cu eficiența de 90% obținută de J.Grimberg, care se referă la extracția ADN din sânge proaspăt recoltat, cota obținută de noi a probelor de sânge decongelat a fost mai mică, ceea ce, probabil, se datorează pierderilor de ADN prin lizarea celulelor sangvine nucleate, în urma proceselor congelării și decongelării.

### Concluzii

1. În urma experimentelor efectuate în laborator s-a stabilit că metoda lui J.Grimberg, folosită, de regulă, pentru extracția ADN genomic uman din sânge proaspăt recoltat, este aplicabilă cu succes și în cazul extragerii ADN din sânge decongelat, după ce a fost păstrat 3 luni la -20 °C.

2. În urma aplicării protocolului de extracție după J.Grimberg, puritatea ADN nu poate fi evaluată prin metoda spectrofotometriei UV convenționale din cauza prezenței în suspensie a produselor rezultate în urma activității proteinazei K.

3. După precipitarea și spălarea ADN în etanol, devine posibilă folosirea metodei spectrofotometriei UV pentru determinarea purității acestuia.

4. În urma extracției prin metoda J.Grimberg a ADN genomic uman din sânge decongelat, rezultă ADN de puritate conform standardelor acceptate în general.

5. Cantitatea de ADN obținut prin extracție din sânge decongelat prin metoda J.Grimberg este cu circa 23,3% mai mică decât cea căpătată în cazul procesării sângelui proaspăt recoltat.

#### **Bibliografie selectivă**

1. J.Grimberg et al., *A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood* // *Nucleic Acid Research*, vol. 17, nr. 20, 1989, p. 8390.
2. L.Kirby, *DNA fingerprinting. An introduction* // *Oxford University Press*, 1990.
3. \*\*\* Promega Protocols, Part# TM050, pag. 4-5, 1999.

#### **Rezumat**

Există multiple metode de extracție a ADN genomic uman din sânge, dar nu toate sunt direct aplicabile. Aceasta se referă și la cazul în care sângele destinat analizelor molecular-genetice este recoltat cu mult înainte de a fi procesat și se pastrează în stare congelată. Pentru extragerea ADN din sânge decongelat și obținerea acestuia în stare relativ pură trebuie aleasă metoda de lucru adecvată și precizate unele condiții de efectuare. În prezenta lucrare am demonstrat că și sângele decongelat poate fi procesat cu succes prin metoda Grimberg (1989) în vederea extragerii ADN genomic uman. După ce ADN-ul a fost precipitat, spălat și resuspendat, s-a stabilit prin spectrofotometrie că puritatea ADN-ului obținut este relativ înaltă și permisivă pentru a realiza analize prin restricție enzimatică și reacții de polimerizare în lanț (PCR).

#### **Summary**

There are different methods used for genomic DNA purification from human blood but not all of them are directly applicable. This is the case of DNA purification from frozen blood too. That's why we need to adapt and optimize one of the existing methods. In the paper it is demonstrated, that the frozen blood can be successfully processed by J Grimberg method (1989)

After the extraction procedure the DNA was precipitated, washed and re-suspended. Further UV spectrophotometric analysis showed, that DNA purity is relatively high and good for using in analysis through enzymatic restrictions and polymerization chain reactions (PCR).

#### **Abrevieri**

*ADN* – acid dezoxiribonucleic.

*CLB* – soluție tampon ce provoacă liza eritrocitelor.

*PLB* – soluție tampon ce provoacă liza celulelor sangvine nucleate.

*EDTA* – acid etilen-diamin-tetraacetic.

*LTE* (*engl. low Tris-EDTA*) – soluție tampon utilizată pentru rehidratare.

*ADN*,  $DO_{260}$  – densitatea optică a soluției măsurată la trecerea prin ea a razelor ultraviolete cu lungimea de undă la 260 nm.

*UV* – raze ultraviolete.

## **PARTICULARITĂȚI EPIDEMIOLOGICE ȘI ETIOLOGICE ÎN OSTEITA POSTTRAUMATICĂ**

**Viorel Prisacari**, dr. h. în medicină, prof. univ., **Snejana Stoleicov**, doctorand, USMF  
„Nicolae Testemițanu”

Osteita posttraumatică este o problemă actuală atât din punct de vedere medical, cât și social. Numai din motive de neînregistrare oficială osteita, ca patologie, nu este evaluată la justa ei valoare. Durata și gravitatea evoluției bolii (3–5 ani și mai mult), frecvența înaltă a recidivelor, frecvența invalidității, dificultățile în diagnostic și tratament, cheltuielile considerabile pentru tratament