



MD 4054 B1 2010.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4054** (13) **B1**

(51) Int. Cl.: *A61B 5/00* (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/84 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
<p>(21) Nr. depozit: a 2009 0116 (22) Data depozit: 2009.11.06</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2010.07.31, BOPI nr. 7/2010</p>
<p>(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD</p> <p>(72) Inventatori: GUDUMAC Valentin, MD; TAGADIUC Olga, MD</p> <p>(73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD</p> <p>(74) Reprezentant: VOZIANU Maria</p>	

(54) **Metodă de determinare a capacității albuminei ischemic modificate de legare a cobaltului**

(57) **Rezumat:**

Invenția se referă la medicină, în particular la o metodă de determinare a capacității albuminei ischemic modificate de legare a cobaltului și poate fi folosită pentru diagnosticarea proceselor patologice cauzate de hipoxia țesuturilor și organelor, cercetarea patogenzei acestora și stabilirea metodelor de tratament.

Metoda, conform invenției, include prelucrarea materialului biologic cu soluție de 0,50...0,75 mM de clorură de cobalt, agitarea timp de 5 min la temperatura camerei, adăugarea unui mediu de

5 incubare, ce conține, mM: ditiotreititol 10,0...20,0, soluție tampon HEPES pH 7,4 10,0...25,0, clorură de sodiu 140,0...150,0 și heptanol 0,3...1,0, agitarea timp de 2 min, măsurarea densității optice a complexului obținut la o lungime de undă de 485 nm și determinarea capacității albuminei ischemic modificate de legare a cobaltului.

Revendicări 1

15

MD 4054 B1 2010.07.31

Descriere:

Invenția se referă la medicină, în particular la o metodă de determinare a capacității albuminei ischemic modificate de legare a cobaltului și poate fi folosită pentru diagnosticarea proceselor patologice cauzate de hipoxia țesuturilor și organelor, cercetarea patogenezei acestora și stabilirea metodelor de tratament.

Este cunoscută o metodă de dozare a albuminei ischemic modificate în ser sangvin, bazată pe determinarea gradului de reducere a capacității albuminei ischemic modificate de a lega ionii de Co(II) și care include prelucrarea materialului biologic cu o soluție de 1 g/L de clorură de cobalt la temperatura camerei timp de 10 min, după care se adaugă o soluție de 1,5 g/L de ditiotreititol, urmată de o incubare de 2 min, după care se adaugă o soluție de 9 g/L clorură de sodiu și se măsoară absorbanta la 470 nm față de proba blanc care se montează la fel, dar care nu conține ditiotreititol. Calcularea rezultatelor se efectuează după curba de calibrare care se construiește în baza diluțiilor soluției standard de clorură de cobalt în limitele de 6,0...60,0 mg/L și se exprimă în unități convenționale, care se definește ca „un μg Co(II) liber în mediul de reacție per mL de ser sangvin” [1].

Metoda cunoscută prezintă o serie de dezavantaje, printre care sensibilitatea, precizia și reproductibilitatea nesatisfăcătoare a acesteia, condiționate de instabilitatea reagenților utilizați și de măsurarea intensității absorbantei în condiții ce nu corespund celor optime, precum și de necesitatea folosirii unei cantități relativ mari de ser sangvin pentru realizarea metodei, ceea ce poate crea dificultăți la efectuarea analizei în pediatrie la nou-născuți și copiii mici.

Cea mai apropiată după esență și rezultatul obținut este metoda de dozare a albuminei ischemic-modificate care include prelucrarea serului sangvin timp de 5 min cu o soluție de clorură de cobalt în concentrație finală 0,58 mM, după care se adaugă ditiotreititol în concentrație finală 1,67 mM, urmată de o incubare de 2 min, apoi se măsoară absorbanta la 500 nm față de proba blanc care se montează la fel, dar care nu conține ditiotreititol. Calcularea rezultatelor se efectuează după curba de calibrare care se construiește în baza diluțiilor soluției standard de clorură de cobalt în limitele 6,0...186,0 unități/mL [2].

Dezavantajele acestei metode constau de asemenea în sensibilitatea, precizia și reproductibilitatea joasă a acesteia, condiționate de instabilitatea reagenților utilizați, influența pH-ului mediului de reacție, formarea bulelor de aer la pipetarea reagenților, ceea ce poate denatura valorile absorbantei, precum și în faptul că intensitatea absorbantei se măsoară în condiții ce nu corespund celor optime.

Un alt neajuns al metodelor menționate constă în influența asupra rezultatelor analizelor a cantității de ioni de Co(II) folosiți în metodă, care este condiționată de faptul că cantitatea de albumină ischemic modificate se exprimă în μg de ioni de Co(II) rămași liberi în materialul biologic (serul sangvin) și care nu au reacționat cu albumina, ceea ce poate crea dificultăți la interpretarea rezultatelor la folosirea diferitor metode de determinare a acesteia, atunci când se folosesc diferite concentrații ale soluției de clorură de cobalt.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode mai exacte, care ar permite de a mări sensibilitatea, precizia și reproductibilitatea metodei prin elaborarea unui mediu optim de reacție, care ar mări stabilitatea reagenților folosiți, măsurarea intensității absorbantei în condiții optime, precum și excluderea dependenței rezultatelor analizelor de concentrația soluției de cobalt folosite la realizarea metodei.

Esența invenției constă în faptul că include prelucrarea materialului biologic cu soluție de 0,50...0,75 mM de clorură de cobalt, agitarea timp de 5 min la temperatura camerei, adăugarea unui mediu de incubare ce conține, mM: ditiotreititol 10,0...20,0, soluție tampon HEPES pH 7,4 10,0...25,0, clorură de sodiu 140,0...150,0 și heptanol 0,3...1,0, materialul biologic, soluția de clorură de cobalt și mediul fiind luate în volume egale, agitarea timp de 2 min, măsurarea densității optice a complexului obținut la o lungime de undă de 485 nm și determinarea capacității albuminei ischemic modificate de legare a cobaltului după formula:

$$\text{Capacitatea albuminei de legare a cobaltului} = C \cdot [(A_K - A_B) - (A_{EX} - A_M)],$$

unde: A_{EX} – absorbanta probei de cercetat;

A_M – absorbanta probei martor, care se montează la fel ca și proba de cercetat, dar mediul de incubare nu conține ditiotreititol;

A_K – absorbanta probei de control, care se montează la fel ca și proba de cercetat, dar în loc de material biologic se utilizează mediul de incubare ce nu conține ditiotreititol;

A_B – absorbanta probei blanc, care se montează la fel ca și proba de control, dar mediul de incubare nu conține ditiotreititol;

C – coeficientul, care se determină în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de clorură de cobalt în limitele 0,1...1,0 mM, egal cu 0,8215 mM.

Rezultatul invenției constă în mărirea sensibilității, preciziei și reproductibilității metodei.

Metoda se realizează în modul următor.

Materialul biologic (ser sangvin, lichid cefalorahidian, lichid folicular) se prelucrează la temperatura camerei și la agitare în continuu timp de 5 min cu o soluție de 0,50...0,75 mM de clorură de cobalt, după care se adaugă un mediu de reacție ce conține 10,0...20,0 mM ditiotreititol, HEPES 10,0...25,0 mM, pH

MD 4054 B1 2010.07.31

4

7,4, clorură de sodiu 140...150 mM și heptanol 0,3...1,0 mM, se agită timp de 2 min și se măsoară absorbanta complexului colorat la 485 nm.

Proba martor se montează la fel ca și proba de cercetat, dar mediul de reacție nu conține ditiotritol.

5 Proba de control se montează la fel ca și proba de cercetat, dar în loc de material biologic se toarnă mediu de reacție ce nu conține ditiotritol.

Proba blank se montează la fel ca și proba de control, dar mediul de reacție nu conține ditiotritol.

Calcularea rezultatelor se efectuează conform formulei:

$$\text{Capacitatea albuminei de legare a Co(II) (mM)} = C \cdot [(A_K - A_B) - (A_{EX} - A_M)],$$

unde: A_K - absorbanta probei de control

10 A_B - absorbanta probei blank

A_{EX} - absorbanta probei de cercetat

A_M - absorbanta probei martor

C - coeficientul de calculare (mM) care se determină în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de clorură de cobalt în limitele 0,1...1,0 mM.

15 Exemplul 1

În godeurile nr. 1 (proba de cercetat) și nr. 2 (proba martor) ale planșetei cu 96 godeuri se pipetează câte 50 μ L de lichid folicular, iar în godeurile nr. 3 (proba de control) și nr. 4 (proba blank) se pipetează câte 50 μ L de mediu de incubare ce nu conține ditiotritol, dar conține 0,010 M tampon HEPES, pH 7,4, 0,14 mM clorură de sodiu și heptanol 0,3 mM și se suplimentează toate godeurile cu câte 50 μ L soluție 20 0,5 mM clorură de cobalt. Probele se agită timp de 5 min la temperatura camerei. Apoi în godeurile nr. 1 și nr. 3 se toarnă câte 50 μ L de mediu de incubare ce conține 10 mM ditiotritol, 0,010 mM tampon HEPES, pH 7,4, 0,14 M clorură de sodiu și heptanol 0,3 mM, iar în godeurile nr. 2 și nr. 4 se toarnă câte 50 μ L de mediu de incubare ce nu conține ditiotritol, dar conține 0,010 M tampon HEPES, pH 7,4, 0,14 M clorură de sodiu și heptanol 0,3 mM, probele se agită timp de 2 min, apoi se măsoară absorbanta la 485 25 nm.

La măsurarea absorbantei s-a obținut:

absorbanta probei de cercetat 0,463

absorbanta probei martor 0,355

absorbanta probei de control 0,537

absorbanta probei blank 0,007.

$$\text{Capacitatea albuminei de legare a Co(II) (mM)} = C \cdot [(A_K - A_B) - (A_{EX} - A_M)],$$

unde: A_K - absorbanta probei de control

A_B - absorbanta probei blank

30 A_{EX} - absorbanta probei de cercetat

A_M - absorbanta probei martor

C - coeficientul, care se determină în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de clorură de cobalt în limitele 0,1...1,0 mM, egal cu 0,8215 mM.

35 Capacitatea albuminei de legare a Co(II) (mM) = 0,8215 · [($A_K - A_B$) - ($A_{EX} - A_M$)] = 0,8215 · [(0,537 - 0,007) - (0,463 - 0,355)] = 0,8215 · [0,530 - 0,108] = 0,8215 · 0,422 = 0,347 mM.

Așadar, în cazul dat, capacitatea albuminei de legare a Co(II) = 0,347 mM.

Exemplul 2

În godeurile nr. 1 (proba de cercetat) și nr. 2 (proba martor) ale planșetei cu 96 godeuri se pipetează câte 50 μ L de ser sanguin, iar în godeurile nr. 3 (proba de control) și nr. 4 (proba blank) se pipetează câte 40 50 μ L de mediu de incubare ce nu conține ditiotritol, dar conține 0,025 M tampon HEPES pH 7,4, 0,15 M clorură de sodiu și heptanol 1,0 mM și se suplimentează toate godeurile cu câte 50 μ L soluție 0,75 mM CoCl_2 . Probele se agită timp de 5 min la temperatura camerei. Apoi în godeurile nr. 1 și nr. 3 se toarnă câte 50 μ L de mediu de incubare ce conține 20 mM ditiotritol, 0,025M tampon HEPES pH 7,4, 0,15 M clorură de sodiu și heptanol 1,0 mM, iar în godeurile nr. 2 și nr. 4 se toarnă câte 50 μ L de mediu de 45 incubare ce nu conține ditiotritol, dar conține 0,025M; tampon HEPES pH 7,4, 0,15 M clorură de sodiu și heptanol 1,0 mM, probele se agită timp de 2 min și apoi se măsoară absorbanta la 485 nm. La măsurarea absorbantei s-a obținut:

absorbanta probei de cercetat 0,536

absorbanta probei martor 0,225

absorbanta probei de control 0,835

absorbanta probei blank 0,008.

Calculul se efectuează conform formulei:

$$\text{Capacitatea albuminei de legare a Co(II)} = C \cdot [(A_K - A_B) - (A_{EX} - A_M)],$$

50 unde: A_K - absorbanta probei de control

A_B - absorbanta probei blank

A_{EX} - absorbanta probei de cercetat

A_M - absorbanta probei martor

C - coeficientul de calculare (mM) care se determină în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de clorură de cobalt în limitele 0,1...1,0 mM. În cazul dat C = 0,8215.

MD 4054 B1 2010.07.31

5

Capacitatea albuminei de legare a Co(II) = $0,8215 \cdot [(A_K - A_B) - (A_{EX} - A_M)] = 0,8215 \cdot [(0,835 - 0,008) - (0,536 - 0,255)] = 0,8215 \cdot [0,827 - 0,281] = 0,8215 \cdot 0,546 = 0,449$ mM.

Așadar, în cazul dat, capacitatea albuminei de legare a Co(II) = 0,449 mM.

5 Analogic exemplurilor de mai sus au fost cercetate și alte concentrații ale soluției de clorură de cobalt 0,1...1,0 mM și a mediului de reacție folosite (ditiotreit 5,0...30,0 mM, HEPES 0,01...0,10 mM), NaCl 0,12...0,20 mM, heptanol 0,1...1,0 mM. Experiențele au permis de a stabili valorile optime ale mediului de reacție: ditiotreit 10...20 mM (concentrația finală 3,0...6,0 mM), HEPES 10...25 mM (concentrația finală 3,0...6,0 mM), HEPES 10...25 mM (concentrația finală 3,0...6,0 mM), pH 7,4, clorură de sodiu 0,14...0,15 M (concentrația finală 45...55 mM), heptanol 0,3...1,0 mM (concentrația

10 finală 0,1...0,3 mM) pentru obținerea efectului pozitiv.
Analizele au fost efectuate în Laboratorul biochimie și la Catedra diagnostic de laborator clinic, USMF „Nicolae Testemițanu” în volum de 300 analize, iar rezultatele obținute au permis de a argumenta efectul pozitiv și avantajele metodei propuse față de cea mai apropiată soluție.

15

(57) Revendicări:

20 1. Metodă de determinare a capacității albuminei ischemic modificate de legare a cobaltului, care include prelucrarea materialului biologic cu soluție de 0,50...0,75 mM de clorură de cobalt, agitarea timp de 5 min la temperatura camerei, adăugarea unui mediu de incubare, ce conține, mM: ditiotreit 10,0...20,0, soluție tampon HEPES pH 7,4 10,0...25,0, clorură de sodiu 140,0...150,0 și heptanol 0,3...1,0, materialul biologic, soluția de clorură de cobalt și mediul fiind luate în volume egale, agitarea timp de 2 min, măsurarea densității optice a complexului obținut la o lungime de undă de 485 nm și

25 determinarea capacității albuminei ischemic modificate de legare a cobaltului după formula:
Capacitatea albuminei de legare a cobaltului = $C \cdot [(A_K - A_B) - (A_{EX} - A_M)]$,
unde: A_{EX} – absorbanța probei de cercetat;

30 A_M – absorbanța probei martor, care se montează la fel ca și proba de cercetat, dar mediul de incubare nu conține ditiotreit;

A_K – absorbanța probei de control, care se montează la fel ca și proba de cercetat, dar în loc de material biologic se utilizează mediul de incubare ce nu conține ditiotreit;

A_B – absorbanța probei blanc, care se montează la fel ca și proba de control, dar mediul de incubare nu conține ditiotreit;

35 C – coeficientul, care se determină în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de clorură de cobalt în limitele 0,1...1,0 mM, egal cu 0,8215 mM.

40

(56) Referințe bibliografice:

1. Bhagavan N.V., Lai E.M., Rios P.A., et. al. Evaluation of Human Serum Albumin Cobalt Binding Assay for the Assessment of Myocardial Ischemia and Myocardial Infarction. Clin. Chemistry, 2003, 49:4, p. 581-585
2. Christenson R.H., Hong Duh Sh., Sanhal W.R., et. al. Characteristics of an Albumin Cobalt Binding Test for Assessment of Acute Coronary Syndrome Patients: A Multicenter Study. Clin. Chemistry, 2001, 47:3, p. 464-470

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

EGOROVA Tamara

Redactor:

UNGUREANU Mihail