



MD 2095 G2 2003.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2095⁽¹³⁾ G2
(51) Int. Cl.⁷: A 61 B 5/00

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2002 0128 (22) Data depozit: 2002.04.22</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.02.28, BOPI nr. 2/2003</p>
<p>(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (72) Inventatori: CEREMPEI Ludmila, MD; MOGOREANU Petru, MD; GUDUMAC Valentin, MD; SCHIȚCO Olga, MD; COLIBABA Elena, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (74) Reprezentant: VOZIANU Maria, MD</p>	

(54) Metodă de diagnostic al funcției pancreatice la copii cu afecțiuni gastroduodenale cronice

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la medicină, în special la gastroenterologia pediatrică.

Esența metodei constă în aceea că pentru diagnosticul funcției pancreasului se determină în lichidele biologice nivelul tripsinei și inhibitorilor ei:

2
5 alfa 1-antitripsină, alfa 2-macroglobulină, și anume ele se determină în saliva prelevată de la pacienți.

Revendicări: 1

MD 2095 G2 2003.02.28

Descriere:

Invenția se referă la medicină, mai concret la pediatrie și în special la gastroenterologia pediatrică.

În prezent este cunoscută metoda de diagnostic al funcției pancreatice pe baza determinării nivelului tripsinei și inhibitorilor ei: alfa1-antitripsinei și alfa2-macroglobulinei în serul sanguin.

5 Metoda se realizează în felul următor.

De la pacient se prelevă 5 ml de sânge, care apoi se centrifughează pentru a separa serul sanguin în care ulterior se determină nivelul tripsinei și inhibitorilor ei alfa1-antitripsinei și alfa2-macroglobulinei conform metodicii descrise mai jos.

10 Pentru determinarea activității tripsinei în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,025 ml din materialul cercetat (ser), se suplimentează cu 0,025 ml soluție de 0,9% NaCl și 0,4 ml soluție de 0,02% BAPNA. Microchiuvetele se agită și se incubează 60 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5 N și se agită. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu martorul, care este pregătit în mod similar, acidularea mediului fiind însă produsă până la

15 incubare. Calcularea activității enzimei se efectuează reieșind din curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol pe s la 1 g de țesut (nmol/s•g).

Pentru determinarea activității alfa1-antitripsinei în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,05 ml din materialul cercetat (ser diluat 1:32), se suplimentează cu 0,1 ml soluție-tampon medinal-HCl 0,05M cu pH 8,2, 0,1 ml soluție de 0,04% tripsină și 0,2 ml soluție de 0,06% BAPNA. Microchiuvetele se agită și după 10 min de preincubare la temperatura camerei se incubează 30 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5 N. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu apa distilată. La fel se înregistrează densitatea optică a mediului de referință, care este pregătit în mod similar, însă nu conține materialul cercetat. Aprecierea proprietăților inhibitorilor de alfa1-antitripsină se realizează prin compararea gradului de hidroliză a substratului în prezența și în lipsa materialului cercetat. Pentru aceasta se calculează diferența dintre densitatea optică a probei de referință și celei experimentale. Calcularea activității enzimei se efectuează utilizând curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard

20 de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s la 1 g de țesut (nmol/s•g).

Pentru determinarea activității alfa2-macroglobulinei, în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,05 ml din materialul cercetat (ser diluat 1:32), se suplimentează cu 0,1 ml soluție-tampon medinal-HCl 0,05M cu pH 8,2, 0,1 ml soluție de 0,04% tripsină și 0,2 ml soluție de inhibitor al tripsinei. Microchiuvetele se agită și după 10 min de preincubare la temperatura camerei se incubează 30 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5 N. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu apa distilată. La fel se înregistrează densitatea optică a mediului de referință, care este pregătit în mod similar, însă nu conține materialul cercetat. Cantitatea de alfa 2-macroglobulină se exprimă în grame la litru de ser (g/L) [1, 2].

25

40 Dezavantajele acestei metode constau în aceea că ea este invazivă, traumatizantă și dificilă în realizare.

Problema pe care o rezolvă invenția dată constă în posibilitatea stabilizării funcției pancreatice la copiii cu afecțiuni gastroduodenale cronice pe baza unei metode mai puțin costisitoare, neinvazive, atraumatizante, cât și simple în ce privește colectarea materialului de diagnostic de la pacienți.

45 Esența metodei constă în aceea că pentru diagnosticul funcției pancreasului se determină în lichidele biologice nivelul tripsinei și inhibitorilor ei: alfa 1-antitripsină, alfa 2-macroglobulină, și anume ele se determină în saliva prelevată de la pacienți.

Rezultatul obținut este diagnosticul funcției pancreatice rapid, simplu și necostisitor, atraumatic și neinvaziv.

50 Metoda se realizează în felul următor.

Dimineața după efectuarea igienei cavității bucale cu apă, timp de 10 min de la pacient se colectează saliva. Saliva se supune centrifugării cu rata de 4500 tur./min, timp de 5 min.

Pentru determinarea activității tripsinei în salivă, în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,025 ml din supernatant (salivă), se suplimentează cu 0,025 ml soluție de 0,9% NaCl și 0,4 ml soluție de 0,02% BAPNA. Microchiuvetele se agită și se incubează 60 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5 N și se agită. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu martorul, care este pregătit în mod similar, acidularea mediului fiind însă produsă până la

55

MD 2095 G2 2003.02.28

4

incubare. Calcularea activității enzimei se efectuează reeșind din curba de calibrare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s la 1 g de țesut.

5 Pentru determinarea activității alfa1-antitripsinei în salivă, în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,05 ml din supernatant (salivă), se suplimentează cu 0,1 ml soluție-tampon medinal-HCl 0,05M cu pH 8,2, 0,1 ml soluție de 0,04% tripsină și 0,2 ml soluție de 0,06% BAPNA. Microchiuvetele se agită și după 10 min de preincubare la temperatura camerei se incubează 30 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5N. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu apa distilată. La fel se înregistrează densitatea optică a mediului de referință, care este pregătit în mod similar, însă nu conține materialul cercetat. Aprecierea proprietăților inhibitorilor de alfa1-antitripsină se realizează prin compararea gradului de hidroliză a substratului în prezența și în lipsa materialului cercetat. Pentru aceasta se calculează diferența dintre densitatea optică a probei de referință și celei experimentale. Calcularea activității enzimei se efectuează utilizând curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s la 1 g de țesut.

10 Pentru determinarea activității alfa2-macroglobulinei, în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,05 ml din supernatant (salivă), se suplimentează cu 0,1 ml soluție-tampon medinal-HCl 0,05M cu pH 8,2, 0,1 ml soluție de 0,04% tripsină și 0,2 ml soluție de inhibitor al tripsinei. Microchiuvetele se agită și după 10 min de preincubare la temperatura camerei se incubează 30 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5N. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm contra apei distilate. La fel se înregistrează densitatea optică a mediului de referință, care este pregătit în mod similar, însă nu conține materialul cercetat. Cantitatea de alfa2-macroglobulină se exprimă în g/L de ser [1].

25 Metoda propusă a fost aplicată pe un eșantion de 188 de bolnavi dintre care 98 cu gastroduodenită cronică, 25 cu gastrită cronică, 68 cu afecțiuni erozivulcerose. Rezultatele obținute se interpretează în felul următor.

Nivelul tripsinei și inhibitorilor ei în perioada de acutizare

Indici	Sănătoși, N=25	Gastrită cronică, N=25	Gastroduodenită cronică, N=98	Afecțiuni erozivulcerose, N=65	p*
Tripsină (nmol/s•g)	24,60±0,78	128,00±5,13	144,40±4,80	150,80±2,61	P1-2<0,010 P1-3<0,001 P1-4<0,001 P2-3<0,050 P2-4<0,001
Alfa1- antitripsină (nmol/s•g)	4,63±0,20	6,70±0,12	5,97±0,26	7,71±0,18	P1-2<0,001 P1-3<0,001 P1-4<0,001 P2-3<0,010 P2-4<0,001 P3-4<0,001
Alfa2-macro- globulină (g/L)	0,96±0,03	1,40±0,11	1,48±0,03	1,67±0,13	P1-2<0,001 P1-3<0,001 P1-4<0,001

Notă: *p – indicele veridicității.

30

Exemplul 1. Bolnavul M., a.n. 1987, a fost examinat la policlinica republicană pentru copii pe data de 09.XI.1998. Diagnosticul de bază: gastroduodenită cronică eritematoasă cu hipersecreție și hiperaciditate în perioada de acutizare. În salivă a fost determinat nivelul tripsinei (141,3 nmol/s•g), alfa1-antitripsinei (6,4 nmol/s•g), alfa2-macroglobulinei (7,51 g/L). Rezultatul a stabilit hipersecreția pancreatică și majorarea alfa1-antitripsinei și alfa2-macroglobulinei ca manifestare a pancreatitei reactive.

35

Exemplul 2. Bolnabul A., a.n. 1981 a fost examinat la policlinica republicană pentru copii pe data de 28.IX.2002. Diagnosticul de bază: gastroduodenită cronică eritematoasă cu hipersecreție în perioada de acutizare. S-a efectuat analiza salivei, rezultatele obținute fiind următoarele: tripsină 145,4 nmol/s•g, alfa1-antitripsină 4,92 nmol/s•g, alfa2-macroglobulină 0,98 g/L.

40

Nivelul tripsinei și inhibitorilor ei confirmă majorarea secreției tripsinei și reducerea alfa1-antitripsinei și alfa2-macroglobulinei, ceea ce este caracteristic pentru pancreatita cronică.

(57) Revendicare:

5 Metodă de diagnostic al funcției pancreatice la copii cu afecțiuni gastroduodenale cronice ce constă în determinarea nivelului tripsinei, alfa1- antitripsinei, alfa2- macroglobulinei în lichidele biologice, **caracterizată prin aceea că** în calitate de lichid biologic se utilizează salivă.

10

(56) Referințe bibliografice:

1. Ипатов Ю.П., Комарова Л.Г., Шабунина Е.И. Ключи к проблеме гастроэнтерологических заболеваний у детей. Нижний Новгород, 1997
2. Баранов А.А., Климанская Е.В., Римарчук Г.В. Детская гастроэнтерология. Москва, 2002, с. 390-424

Șef Secție:

EGOROVA Tamara

Examinator:

GROSU Petru

Redactor:

ANDRIUȚĂ Victoria