



MD 1331 Z 2019.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1331** (13) **Z**
(51) Int.Cl: *A61B 10/00* (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

(21) Nr. depozit: s 2018 0071 (22) Data depozit: 2018.07.09	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.04.30, BOPI nr. 4/2019
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (72) Inventatori: MACAGONOVA Olga, MD; NACU Viorel, MD; COCIUG Adrian, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (74) Mandatar autorizat: COȘNEANU Elena	

(54) **Metodă de diagnostic imunologic ale leziunilor experimentale *pemfigus-like*
la șobolani**

(57) **Rezumat:**

Invenția se referă la medicina experimentală, medicina regenerativă, în special la o metodă imunologică și poate fi utilizată pentru diagnosticul leziunilor experimentale *pemfigus-like* la șobolani.

Esența invenției constă în colectarea sângelui din vasele caudale de la șobolani, centrifugarea și determinarea concentrației

componentelor C3 și C4 ale complementului prin metoda optică în diapazonul unde ultraviolete, și anume în cazul când concentrația C3 este de 1,02...2,54 g/l, iar C4 - 0,82...0,94 g/l, se diagnostichează leziuni *pemfigus-like* la șobolani.

Revendicări: 1

MD 1331 Z 2019.11.30

(54) Method for immunological diagnosis of experimental pemphigus-like lesions in rats

(57) Abstract:

1
The invention relates to experimental medicine, regenerative medicine, in particular to an immunological method and can be used for diagnosis of experimental pemphigus-like lesions in rats.

Summary of the invention consists in collecting blood from the tail vessels of rats, centrifuging and determining the concentration

2
of the complement components C3 and C4 by the optical method in the ultraviolet wavelength range, and in the case where the concentration of C3 is 1.02...2.54 g/l, and C4 - 0.82...0.94 g/l, experimental pemphigus-like lesions are diagnosed in rats.

Claims: 1

(54) Метод иммунологической диагностики пемфигусоподобных экспериментальных поражений у крыс

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к экспериментальной медицине, регенеративной медицине, в частности к иммунологическому способу и может быть использовано для диагностики пемфигусоподобных экспериментальных поражений у крыс.

Сущность изобретения состоит в сборе крови из хвостовых сосудов крыс, центрифугировании и определении

2
концентрации компонентов C3 и C4 комплемента оптическим методом в ультрафиолетовом диапазоне длины волны, и в случае, когда концентрация C3 составляет 1,02...2,54 г/л, а C4 - 0,82...0,94г/л, диагностируют пемфигусоподобные экспериментальные поражения у крыс.

П. формулы: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Invenția se referă la medicina experimentală, medicina regenerativă, în special la investigații imunologice și poate fi utilizată pentru studierea modificărilor rezistenței naturale prin examinarea conținutului componentelor (C3, C4) al complementului în serul sangvin al șobolanilor cu leziunile *pemfigus-like* experimentale.

10 Este cunoscută metoda diagnostică prin reacție de imunofluorescență cutaneo-mucoasă directă, care cuprinde examinarea unor secțiuni din pielea lezată a bolnavilor de *pemfigus* la microscopul cu ultraviolet, după o prealabilă incubare cu ser antigamaglobulinic uman conjugat cu fluoresceină. Această metoda depistează depozite de IgG, IgA, IgM și C3 - la nivelul substanței intercelulare epidermice [1].

15 Dezavantajele acestei metode constau în aceea că reacția de imunofluorescență directă depistează depozite de IgG și C3 la nivelul substanței intercelulare epidermice sub forma unui retil fluorescent, dar nu relevă conținutul seric de C3.

Problema invenției prezente este aplicarea metodei mai simple și mai ieftine pentru diagnosticul modificărilor imunității naturale – conținutul componentelor C3, C4 al complementului în serul sangvin al șobolanilor cu leziunile *pemfigus-like*.

20 Esența invenției constă în colectarea sângelui din vasele caudale de la șobolani, centrifugarea și determinarea concentrației componentelor C3 și C4 ale complementului prin metoda optică în diapazonul unde ultraviolete, și anume în cazul când concentrația C3 este de 1,02...2,54 g/l, iar C4 - 0,82...0,94 g/l, se diagnostichează leziuni *pemfigus-like* la șobolani.

25 Avantajele acestei metode constă în faptul că efectuarea metodei revendicate necesită utilizarea utilajului și reactivelor mai ieftine și simple pentru determinarea concentrației componentelor C3, C4 al complementului în serul sangvin la șobolani cu leziunile experimentale *pemfigus-like* legate de calea clasică și de activarea complementului.

30 Rezultatul constă în estimarea concentrației scăzute ale C3 și C4 în serul sanguin al șobolanilor la care s-au modelat leziunile *pemfigus-like*, care este determinată de formarea complexelor imune în serul sanguin, în urma heteroimunizării șobolanilor.

Metoda se efectuează în modul următor.

35 2 ml de sange a fost colectat din vasele caudale de la 30 șobolani sănătoși în vacucontainer cu anticoagulant cu faza geloasă. Determinarea componentelor complementului C3 și C4 s-a efectuat cu reagenții care conțin anticorpii de capră anti – C3 și anti – C4: Complement Component C3, Ref 31084. Lot 04689, Complement Component C4, Ref 31085. Lot 01507, BioSystems, Costa Brava Barcelona (Spania) a fost efectuată prin metoda fotometrică, cu analizatorul KONELAB 30i (TermoFischer,Finlanda). Determinarea concentrației componentelor C3 și C4 ale complementului prin metoda optică
40 în diapazonul unde ultraviolete, și anume în cazul când concentrația C3 este de 1,02...2,54 g/l, iar C4 - 0,82...0,94 g/l, se diagnostichează leziuni *pemfigus-like* la șobolani.

Exemplu

45 2 ml de sange venos caudal a fost colectat în vacucontainer cu anticoagulant cu faza geloasă. S-a folosit metoda de imunoturbidimetrie cu analizatorul KONELAB 30i (TermoFischer, Finlanda). Am folosit test-sistema - BioSystems, Costa Brava Barcelona (Spain). Valori de referință s-au luat valorile normale de concentrație a componentelor C3: 2,55...3,25 g/l; și C4: 0,95...4,65 g/l, care au fost determinate la 30 șobolani sănătoși. S-a utilizat factor de conversie: g/l x 100 = mg/dl; mg/dl x 0,01 = g/l. Testarea a permis să detectăm fracție biologic activă și fracție inactivă al C3. Complementul C3 este de 70% din proteina totală a sistemului de complement, care participă la activarea complementului în mod clasic și alternativ. C3 este sintetizat în ficat, macrofage, fibroblaste, celule limfoide și pielea. Împreună cu celelalte componente ale sistemului complementului, C3 poate fi
50 utilizat în timpul diferitelor reacții imunologice antigen-anticorp. C4 este o altă componentă a sistemului complementului, care este sintetizat în plămâni și în țesutul osos. C4 este utilizat numai pe calea clasică de activare al complementului. Concentrațiile serice C4 sunt
55 indicatorul sensibil al gradului de activitate a bolii. În baza metodei am urmărit formarea complexelor antigen-anticorp în soluție și formarea agregatelor. Prin turbidimetria noi am măsurat cantitatea de lumină clară nereflectată, care trece prin soluție. În cazul probei de ser sangvin colectat de la șobolani sănătoși se folosește fotosensorul situat pe o linie dreaptă

cu o sursă de lumină. Dacă soluția nu este transparentă, concentrația particulelor de lumină este mare, și conductibilitatea luminii este puțină. Imunoturbidimetria a măsurat cantitatea de lumină clară, folosind factorul de conversie: $g/l \times 100 = mg/dl$, $mg/dl \times 0,01 = g/l$. Timpul, care s-a cronometrat pentru formarea curbei de lumină reflectată a fost maxim și a fost proporțional concentrației componentelor C3 și C4 al complementului. S-a determinat concentrația componentelor C3 între valorile de referință: 2,55...3,25 g/l; și C4: 0,95...4,65 g/l la șobolani albi sănătoși. În cazul probei de ser sanguin obținut de la șobolani cu leziunile *pemfigus-like*, din lotul experimental constiuit din 30 de animale, soluția a fost transparentă și nu a reflectat lumina. Timpul, care s-a cronometrat pentru formarea curbei de lumină a fost maxim și proporțional concentrației componentelor între limitele valorilor: C3: 1,02...2,54 g/l; și C4: 0,82...0,94 g/l la șobolani cu leziunile *pemfigus-like*, fiind de trei ori mai scăzute în comparație cu valorile de referință al concentrației componentelor C3: 2,55...3,25 g/l; și C4: 0,95...4,65 g/l la șobolani albi sănătoși (tabel 1). Componentul C3 declanșează o reacție chimică care ajută celulelor imune a îngloba și fagocita și distruge antigenul. Componentul C3 face parte și din complexe imune, împiedicând dezvoltarea bolilor autoimune. Componentul C4 menține fagocitoză, mărește permeabilitatea pereților vasculari, participă în neutralizarea antigenilor, activarea imunității umorale și inhibarea imunității T-celulare. Scăderea componentului C4 în ser se observă la consumarea activă a lui, legată de calea clasică de activarea complementului.

Parametrii imunologici al serului sangvin șobolanilor albi, adminitrați intracutanat cu extractul etanolic proteic din esofagul de bovină în studiu experimental randomizat, M(\pm ES)

Tabel 1

Parametrii, unități de măsură	Loturile de comparare, (M \pm ES%)		P
	Lotul I - martor	Lotul II - experimental	
Componentul complementului C3, g/l	2,55...3,25	1,02...2,54	>0,001
Componentul complementului C4, g/l	0,95...4,65	0,82...0,94	>0,001

(56) Referințe bibliografice citate in descriere:

1. Colțoiu A., Forsea D., Mateescu D., Popescu S. Dermatovenerologie, Editura didactică și pedagogică, R.A. București, 1993, p. 470-471

(57) Revendicări:

Metodă de diagnostic imunologic ale leziunilor experimentale *pemfigus-like* la șobolani, care include colectarea sângelui din vasele caudale de la șobolani, centrifugarea și determinarea concentrației componentelor C3 și C4 ale complementului prin metoda optică în diapazonul unde ultraviolete, și anume în cazul când concentrația C3 este de 1,02...2,54 g/l, iar C4 - 0,82...0,94 g/l, se diagnostichează leziuni *pemfigus-like* la șobolani.