



MD 1342 Y 2019.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1342** (13) **Y**
(51) Int.Cl: **A61B 10/00** (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

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

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2018 0040 (22) Data depozit: 2018.05.02	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.06.30, BOPI nr. 6/2019
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (72) Inventatori: MACAGONOVA Olga, MD; NACU Viorel, MD; MUȘET Gheorghe, 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 al afectării keratinocitelor în leziunile pemfigus-like experimentale**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la medicina experimentală, medicina regenerativă și poate fi utilizată pentru diagnosticarea afectării keratinocitelor în leziunile pemfigus-like.

Esența invenției constă în aceea că materialul biologic se prelucrează prin tehnica includerii în parafină, apoi se incubează cu anticorpi monoclonali de pancitokeratină, clona AE1/AE3, timp de 1 oră la temperatura camerei, după care se pregătesc secțiuni aplicate pe lamele din sticlă prelucrate cu polilizină și se colorează imunohistochimic, utilizând metoda complexului Streptavidin-

2
Biotină (sABC)/Horse Radish Peroxidase (HRP), apoi se evaluează microscopic gradul de afectare ale keratinocitelor și de afectare cumulativă, în dependență de intensitatea colorării, în cazul în care nu se determină colorarea materialului, se diagnostichează lipsa afectării keratinocitelor, iar în cazul când este o colorare intensă a materialului, se diagnostichează afectarea completă a keratinocitului și mai mult de 50% din celule.

Revendicări: 1

Figuri: 4

MD 1342 Y 2019.06.30

(54) Method for diagnosis of keratinocyte damage in experimental pemphigus-like lesions

(57) Abstract:

1
The invention relates to experimental medicine, regenerative medicine and can be used for diagnosis of keratinocyte damage in pemphigus-like lesions.

Summary of the invention consists in that the biological material is processed using the method of inclusion in paraffin, then incubated with panocytokeratin monoclonal antibodies, clone AE1/AE3, for 1 hour, at room temperature, after which are prepared sections applied on glass slides processed with polylysine and stained immunohistochemically

2
using Streptavidin-Biotin (sABC)/Horse Radish Peroxidase (HRP) complex, then is microscopically assessed the extent of keratinocyte damage and cumulative damage depending on the intensity of staining, if the color of the material is not determined, the absence of damage in keratinocytes is diagnosed, and in the case of intensive staining of the material, complete keratinocyte damage and more than 50% of the cells is diagnosed.

Claims: 1

Fig.: 4

(54) Метод диагностики повреждения кератиноцитов при пузырчаткоподобных экспериментальных поражениях

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к экспериментальной медицине, регенеративной медицине и может быть использовано для диагностики повреждения кератиноцитов при пузырчаткоподобных поражениях.

Сущность изобретения состоит в том, что биологический материал обрабатывают с помощью метода включения в парафин, затем инкубируют с моноклональными антителами панцитокератина, клоном AE1/AE3, в течение 1 часа, при комнатной температуре, после чего готовят срезы нанесенных на стеклянные слайды обработанные полилизинном и окрашивают

2
иммуногистохимически с использованием комплекса Стрептавидин-Биотина (sABC)/Horse Radish Peroxidase (HRP), затем микроскопически оценивают степень повреждения кератиноцитов и кумулятивного повреждения в зависимости от интенсивности окрашивания, в случае если не определяется окраска материала диагностируют отсутствие повреждений кератиноцитов, а при интенсивном окрашивании материала диагностируют полное повреждение кератиноцита и более 50% клеток.

П. формулы: 1

Фиг.: 4

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

5 Invenția se referă la medicina experimentală, medicina regenerativă și poate fi utilizată pentru diagnosticarea afectării keratinocitelor în leziunile *pemfigus-like*.

Este cunoscută metoda de diagnostic 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 antigammaglobulinic uman
10 conjugat cu fluorsceină. Această metoda depistează depozite de IgG, IgA, IgM și C₃-la nivelul substanței intercelulare epidermice [1].

Dezavantajele acestei metode constă în aceea că reacția de imunofluorescență directă depistează depozite de IgG la nivelul substanței intercelulare epidermice sub forma unui retil fluorescent, dar nu relevă starea membranei citoplasmatică celulare.

15 Problema invenției constă în elaborarea unei metode mai simple și mai accesibile pentru diagnosticul afectării keratinocitelor după intensitatea colorației în leziunile *pemphigus-like*.

Esența invenției constă în aceea că materialul biologic se prelucurează prin tehnica includerii în parafină, apoi se incubează cu anticorpi monoclonali de pancitokeratină, clona AE1/AE3, timp de 1 oră la temperatura camerei, după care se pregătesc secțiuni aplicate pe lamele din sticlă prelucrate cu polilizină și se colorează imunohistochimic, utilizând metoda complexului
20 Streptavidin-Biotină (sABC)/Horse Radish Peroxidase (HRP), apoi se evaluează microscopic gradul de afectare ale keratinocitelor și de afectare cumulativă, în dependență de intensitatea colorării, în cazul în care nu se determină colorarea materialului, se diagnostichează lipsa afectării keratinocitelor, iar în cazul când este o colorare intensă a materialului, se
25 diagnostichează afectarea completă a keratinocitului și mai mult de 50% din celule.

Avantajele acestei metode constă în faptul că realizarea metodei este mai simplă și cere utilizarea reactivelor și utilajului mai ieftine.

Rezultatul constă în aceea că leziunile *pemfigus-like* cu aspectul eroziv, denudat cu necroză pe suprafața pielii se consemna că membrana cheratinocitului a fost lezată complet. Prin
30 urmare, s-a detectat colorarea a peste 50% din celulele și colorarea intensă a monstreii cutanate.

Rezultatele colorării cu anticorpii AE1/AE2 sunt reprezentate în figurile 1-4.

Fig. 1 - pielea șobolanilor cu leziunile cutanate *pemfigus-like*, eroziuni. Peretele bulei îngroșat (a), conținutul bulei cu infiltrat inflamator având o reacție intens pozitivă (+++) (b), toate straturile epidermului au o intensitate de colorare intens pozitivă difuză (c), acantoliza
35 celulelor spinoase (d), ruperea legăturilor desmozomale (e). AE1/AE3, x 140.

Fig. 2 - pielea șobolanilor cu leziunile cutanate *pemfigus-like* la etapa de formare a bulelor. Dispariția proteinei desmozomale în spațiile intercelulare la nivelul epidermului cu o ulterioară
distrucție a contactelor intercelulare (săgeata) și formarea bulei intraepidermale. Formarea
40 bulei la nivelul epidermului (a), cu conținut proteic, colorat cu AE1/AE3 - intens moderată (++) (b), toate straturile epidermului au o reacție de colorare moderată (++) (c), solitară. AE1/AE3, x140.

Fig. 3 - pielea șobolanilor afectați de *pemfigus* la etapa de epitelizare. Epidermul cu toate straturile sunt colorate slab intens (+) (a), stratul lucid și cheratinos sunt stratificate (b), stratul
45 spinos și granular sunt formate de celule conturate (c), stratul bazal are o reacție moderată de colorare (++) (d). AE1/AE3, x 140.

Fig. 4 - pielea șobolanilor afectați de *pemfigus* la etapa de epitelizare. Epidermul cu toate straturile sunt colorate slab intens (+) (a), stratul lucid și cheratinos sunt stratificate (b), stratul spinos și granular sunt formate de celule conturate (c), stratul bazal are o reacție moderată de
colorare (++) (d). AE1/AE3, x 140.

50 Metoda se efectuează în modul următor

Materialul destinat colorării imunohistochimice a fost deparafinat și rehidratat. Țesuturile au fost incubate în 60 μl de soluție de peroxid de hidrogen de 3%, timp de 10 min, la temperatura camerei și apoi spălate de 2 ori cu soluție tampon. Se incubează cu anticorpi monoclonali de pancitokeratină, clona AE1/AE3, timp de 1 oră la temperatura camerei, apoi
55 materialul se prelucurează prin tehnica includerii în parafină cu pregătirea secțiunilor aplicate pe lamele de sticlă de 4 microni prelucrate cu polilizină, după care se colorează imunohistochimic utilizand metoda complexului Streptavidin-Biotină (sABC)/Horse Radish Peroxidase (HRP), timp de 10 min, la temperatura camerei, apoi s-a repetat spălarea cu soluție tampon. La secțiunile destinate colorării imunohistochimice s-a adăugat câte 30 μl de soluție de 3,3-

diaminbenzidină cromogenă și apoi spălate cu soluție tampon. Apoi secțiunile de țesut s-au evaluat microscopic cu aprecierea gradului de afectare ale cheratinocitelor și cumulativă în dependență de intensitatea colorării.

- 5 Evaluarea rezultatelor studiului s-a efectuat conform criteriilor de interpretare, conform căroră, intensitatea colorării s-a consemnat, astfel: reacție intens pozitivă (+++), reacție de intensitate moderată (++) , reacție de intensitate slabă (+) , reacție de intensitate foarte redusă (+/-), lipsa reacției (-). Metoda de detecție a biomarkerilor proteici s-a bazat pe utilizarea anticorpilor monoclonali pentru antigeni, care constă în evaluarea cumulativă a diferenței în exprimarea markerilor și intensitatea lor: "-" - absența colorării cu imunoperoxidaza; "+" - colorarea a 10% din celule; "++" - colorarea a 50% din celule; "+++" - colorarea a peste 50% din celule.

Polilizina este un polimer al lizinei care conține multiple sarcini pozitive și este folosită pentru a media/facilita adeziunea celulelor vii la substratul de cultură sau adeziunea celulelor fixate la lamelele de sticlă (de exemplu pentru microscopia de fluorescență).

- 15 Șobolani A₁, A₂, A₃, A₄, A₅, A₆, corespund 30 animale (16,7±2,8), cu modificări de tip reacție intens pozitivă (+++) la nivelul secțiunii cutanate afectate.

Șobolani, A₃, A₄, A₆ corespund 15 animale (8,3±0,15%), cu modificări de tip reacție de intensitate moderată (++) la nivelul secțiunii cutanate afectate.

- 20 Șobolani A₂, A₃, A₄ corespund 15 animale (8,3±0,15%), cu modificări de tip reacție de intensitate slabă (+) la nivelul secțiunii cutanate afectate.

Expresia pronunțată a citoplasmei cheratinocitelor în stratul granular s-a interpretat prin afectarea membranei celulare din stratul granular, ce a dus la o colorare intensă a granulelor. Scăderea reacției de colorare a reflectat repararea structurilor membranare ale cheratinocitelor și pătrunderea slabă ale colorantului în citoplasma celulei.

- 25 Exemplu

În calitate de obiect de studiu au servit 60 de șobolani linia Wistar de culoare albă, cu vârsta cuprinsă între 4,9±0,33 luni și masa 197,97±2,1g. Inocularea intracutanată de 0,1 ml de extract etanolic proteic din mucoasa esofagului de bovină a marcat la șobolani apariția leziunilor de aspect bulos-eroziv de diametru aproximativ 0,5...1 cm. S-a recoltat materialul tisular din regiunea plăgilor cutanate modelate prin biopsii țintite din leziunile macroscopic decelabile, piesele de conizație, material postoperator.

30

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

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

(57) Revendicări:

Metodă de diagnostic al afectării keratinocitelor în leziuni *pemfigus-like* experimentale, care constă în aceea că materialul biologic se prelucrează prin tehnica includerii în parafină, apoi se incubează cu anticorpi monoclonali de pancitokeratină, clona AE1/AE3, timp de 1 oră la temperatura camerei, după care se pregătesc secțiuni aplicate pe lamele din sticlă prelucrate cu polilizină și se colorează imunohistochimic, utilizând metoda complexului Streptavidin-Biotină (sABC)/Horse Radish Peroxidase (HRP), apoi se evaluează microscopic gradul de afectare ale keratinocitelor și de afectare cumulativă, în dependență de intensitatea colorării, în cazul în care nu se determină colorarea materialului, se diagnostichează lipsa afectării keratinocitelor, iar în cazul când este o colorare intensă a materialului, se diagnostichează afectarea completă a keratinocitului și mai mult de 50% din celule.

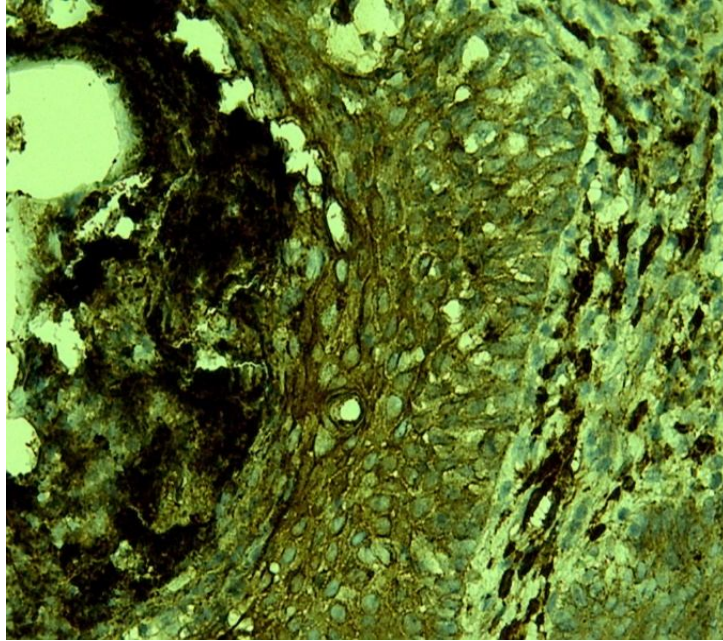


Fig. 1

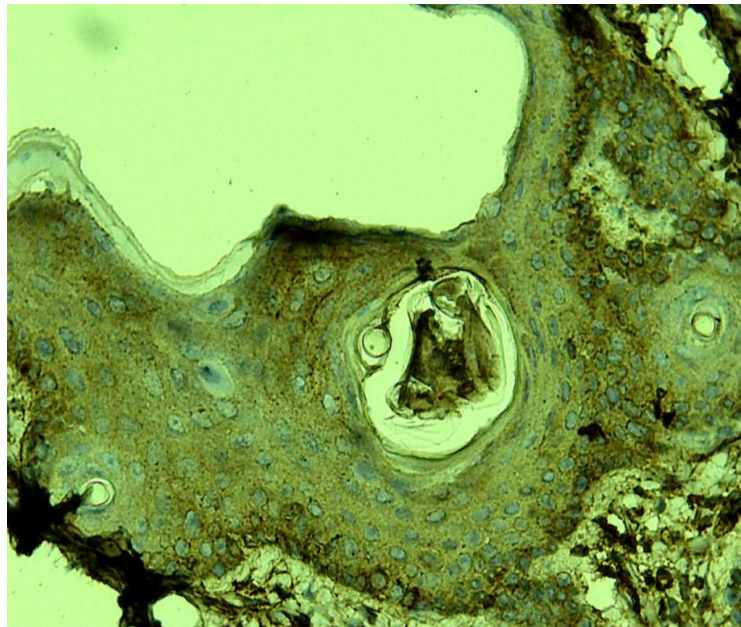


Fig. 2

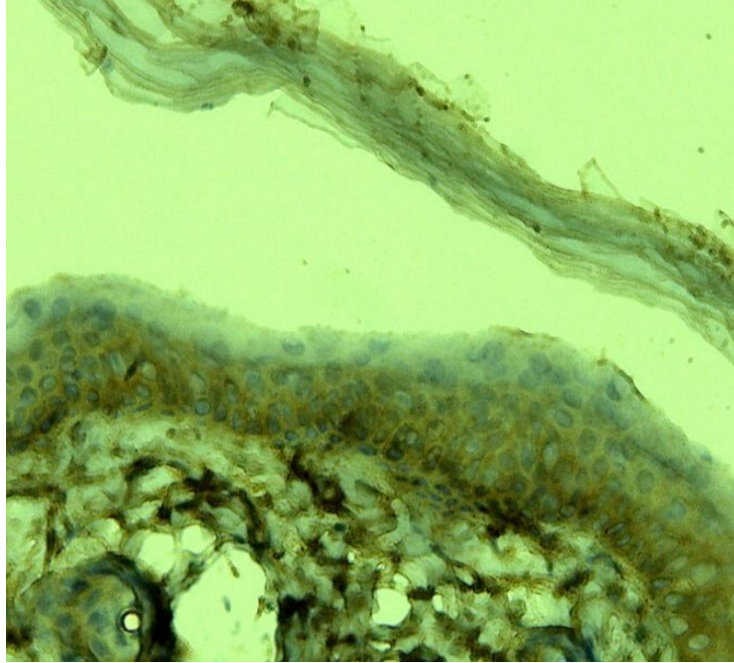


Fig. 3

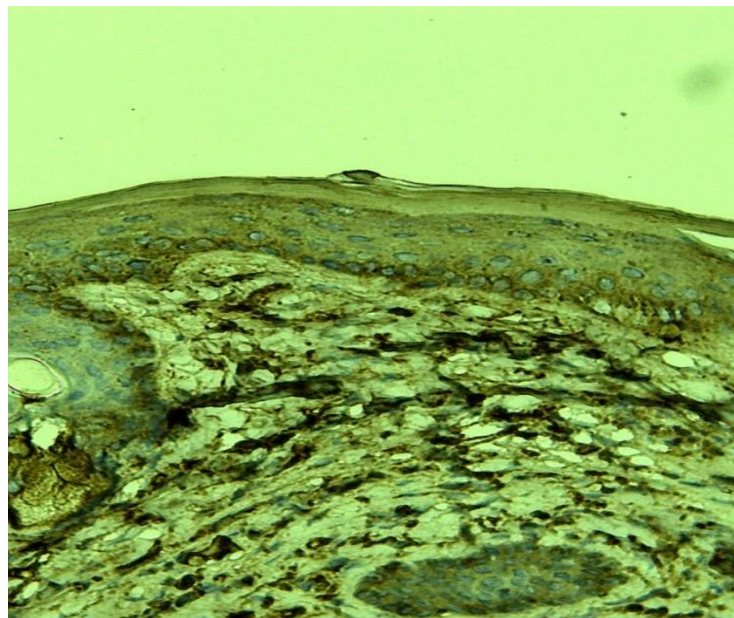


Fig. 4