



MD 3395 G2 2007.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3395** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) Int. Cl.: *A61B 10/00* (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2006 0166 (22) Data depozit: 2006.06.21	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2007.09.30, BOPI nr. 9/2007
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: NASTAS Ion, MD; GUDUMAC Valentin, MD	
(73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(74) Reprezentant: VOZIANU Maria, MD	

(54) Metodă de recoltare a probelor de sânge de la animalele de laborator

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la medicina experimentală și poate fi utilizată la recoltarea probelor de sânge de la animale de laborator pentru efectuarea cercetărilor după modelarea proceselor patologice și monitorizarea lor.

Esența invenției constă în aceea că regiunea labială inferioară sau a gâtului animalelor de laborator se prelucrează cu un unguent ce conține benzilnicotinat de sodiu 20...25 mg, heparină 1200...1800 UI, dimetilsulfoxid 200...250 mg și în calitate de excipient vaselină-lanolină până la 1 g, după 10...15 min animalele sunt supuse unei anestezii ușoare inhalatorii cu eter dietilic timp de 1...5 min, un-

2
5
10
15
guentul aplicat se înlătură cu un tampon de tifon, pielea se prelucrează cu o soluție de 6% de etilendiamintetraacetat de sodiu cu pH-ul 7,4, după care se recoltează probele de sânge și apoi se efectuează hemostaza prin prelucrarea plăgii cu un amestec hemostatic, care conține alaun de potasiu și N-(2,3-dimetilfenil)-antranilat de sodiu în raport masic de 3:1.

Revendicări: 3

MD 3395 G2 2007.09.30

MD 3395 G2 2007.09.30

3

Descriere:

Invenția se referă la medicina experimentală și poate fi folosită la recoltarea probelor de sânge de la animale mici de laborator, necesare pentru efectuarea cercetărilor hematologice, citologice și biochimice la modelarea proceselor patologice și monitorizarea lor.

5 Este cunoscută metoda de colectare a sângelui de la animale mici de laborator prin puncția cordului, sinusului și a venei caudale, după introducerea cozii în apă caldă, sau prin secționarea cozii și extragerea sângelui cu un aparat de vacuum [1].

10 Această metodă are dezavantajul că este stresantă și traumatizantă pentru animalele experimentale. Măsurile preliminare (masajul, aplicarea garoului, încălzirea, folosirea substanțelor iritante etc.) orientate spre mărirea fluxului sangvin în locul aplicării inciziei pot conduce la modificări ale permeabilității vasculare, traumatizarea țesuturilor înconjurătoare și compresia lor, soldate cu intensificarea trombo-
15 genezei, ceea ce influențează negativ asupra componenței sângelui colectat. Un impediment important îl constituie calitatea nesatisfăcătoare a sângelui colectat, legată de hemoliza frecventă a hematiilor și formarea microcheagurilor de sânge, amestecarea sângelui colectat cu lichidul lacrimal, limfa, lichidul tisular, ceea ce face imposibilă efectuarea cercetărilor de laborator hematologice, citochimice, biochimice etc.

De asemenea, metoda menționată se soldează frecvent cu complicații grave sub formă de hemoragii, supurații sau decese ale animalelor experimentale.

20 Cea mai apropiată după esență și rezultatul obținut este metoda de recoltare a sângelui de la animale mici de laborator care folosește secționarea cu o lamă a suprafeței exterioare a gingiei în zona incisivilor inferiori [2].

25 Dezavantajul acestei metode constă în dificultatea obținerii cantităților necesare de sânge, mai ales în cazul recoltărilor repetate, din cauza formării cicatricelor care micșorează fluxul sangvin în zonele supuse inciziilor. Un alt neajuns important este hemolizarea sângelui și formarea frecventă a microchiagurilor de sânge, ceea ce face imposibilă efectuarea cercetărilor hematologice, citochimice, de coagulabilitate etc. Această metodă de asemenea este stresantă pentru animalele experimentale și deseori dă complicații sub formă de hemoragii.

30 Problema pe care o rezolvă invenția constă în ameliorarea calității sângelui colectat prin majorarea fluxului sangvin în zona supusă inciziei și prin excluderea cauzelor care conduc la hemoliza hematiilor și la formarea microcheagurilor de sânge, și, totodată, în reducerea stresului la animalele de laborator și mărirea reproductibilității metodei de recoltare a sângelui.

35 Esența invenției constă în aceea că regiunea labială inferioară sau a gâtului animalelor de laborator se prelucrează cu un unguent ce conține benzilnicotinat de sodiu 20...25 mg, heparină 1200...1800 UI, dimetilsulfoxid 200...250 mg și în calitate de excipient vaselină-lanolină până la 1 g, după 10...15 min animalele sunt supuse unei anestezii ușoare inhalatorii cu eter dietilic timp de 1...5 min, unguentul aplicat se îndalătură cu un tampon de tifon, pielea se prelucrează cu o soluție de 6% de etilendiamintetraacetat de sodiu cu pH-ul 7,4, după care se recoltează probele de sânge și apoi se efectuează hemostaza prin prelucrearea plăgii cu un amestec hemostatic, care conține alaun de potasiu și N-(2,3-dimetilfenil)-
40 antranilat de sodiu în raport masic de 3:1.

Rezultatul invenției constă în ameliorarea calității sângelui colectat prin excluderea formării microcheagurilor, reducerea gradului de hemoliză, prevenirea complicațiilor sub formă de hemoragii, reducerea stresului și a termenelor de epitelizare a plăgii, mărirea reproductibilității metodei de recoltare a sângelui.

Se dau în continuare 2 exemple de realizare a metodei, conform invenției.

Exemplul 1

45 Cercetările au fost efectuate pe 12 animale de laborator - șobolani albi masculi linia Wistar cu masa corporală 190...200 g, divizați în două grupe. Regiunea labială inferioară și a gâtului șobolanilor din grupa experimentală (metoda propusă) se prelucrează cu un unguent ce conține: benzilnicotinat de sodiu 20 mg, heparină 1200 UI, dimetilsulfoxid 200 mg și în calitate de excipient vaselină-lanolină până la 1 g. După 10 min animalul este supus unei anestezii ușoare cu eter dietilic timp de 5 min, unguentul aplicat se
50 îndalătură cu un tampon de tifon, pielea se prelucrează cu o soluție de 6% de etilendiamintetraacetat de sodiu (EDTA) cu pH-ul 7,4. După colectarea probei de sânge plaga se prelucrează cu un amestec hemostatic, ce conține cristale de alaun de potasiu și N-(2,3-dimetilfenil)-antranilat de sodiu în raport masic de 3:1.

55 Animalele din grupa de control au fost supuse recoltării sângelui conform metodei cunoscute, prin aplicarea unei incizii pe suprafața exterioară a gingiei în zona incisivilor inferiori.

Sângele prelevat de la șobolanii din ambele grupe a fost folosit pentru determinarea concentrației de hemoglobină liberă. Pentru aceasta, 0,1 ml de sânge se introduce într-o eprubetă de centrifugare cu 1,9 ml amestec de sol. NaCl 8,5 g/l și sol. citrat de sodiu 38 g/l în raport de 5:1, se agită atent și se centrifughează 7 min la 500 rot./min.

MD 3395 G2 2007.09.30

4

După aceasta, într-o eprubetă cu dimensiunile de 14 x 160 mm se toarnă 1 ml supernatant, 1,5 ml soluție - tampon acetat 0,1 M cu pH-ul 4,6, 1 ml soluție de 0,3% de H₂O₂ și 1 ml soluție de 0,1% de benzidină. Proba se agită, se lasă la temperatura camerei și după 3 min se măsoară absorbția la fotocolorimetru la 540 nm în cuva de 10 mm față de proba de control care se montează în același mod, dar în loc de supernatant se toarnă 1,0 ml soluție de 0,85% de NaCl. Apoi se măsoară absorbția peste fiecare 60 s timp de 5 min și se calculează media absorbției în 1 min. Concentrația de hemoglobină liberă se calculează după graficul de etalonare construit în baza diluțiilor de lucru cu concentrația de 5, 10, 25, 50, 100 mg/l, pregătite din soluția etalon de 1,0 g/l hemoglobină. Fiecare din diluțiile de lucru se prelucrează conform procedurii descris mai sus. Rezultatele cercetărilor efectuate sunt expuse în tabelul 1.

Tabelul 1

Cantitatea de sânge prelevat și concentrația de hemoglobină liberă în supernatantul obținut în funcție de metoda folosită

Condițiile experienței	Nr. de animale	Prezența microchiagurilor de sânge	Cantitatea de sânge prelevat (?l)	Concentrația de Hb (mg/l)
Metoda propusă	6	0	226±0,48*	6,2±0,43**
Cea mai apropiată soluție	6	3	88±0,20	39,5±7,24

Notă: Diferență statistic concludentă față de cea mai apropiată soluție: *-p<0,05; **-p<0,01.

Datele din tabel demonstrează avantajul metodei propuse, care permite de a obține o cantitate de sânge de 2,5 ori mai mare față de cea mai apropiată soluție, fără microcheaguri și micșorarea considerabilă a concentrației de hemoglobină liberă în supernatantul obținut, fapt ce indică la reducerea gradului de hemoliză a sângelui recoltat.

Asupra șobolanilor din grupa experimentală (metoda propusă) după 72 ore de la prima prelevare a sângelui s-a aplicat din nou metoda cunoscută de recoltare a sângelui prin secționarea cu o lamă a suprafeței exterioare a gingiei în zona incisivilor inferioari.

Sângele prelevat de la șobolanii din ambele grupe a fost folosit pentru determinarea concentrației de dialdehidă malonică (DAM) și aprecierea nivelului de catecolamine în eritrocite.

Pentru determinarea concentrației DAM sângele prelevat de la șobolanii din ambele grupe în volum de 0,05 ml se introduce în eprubete de centrifugare, se toarnă apoi 1,0 ml soluție de acid tiobarbituric de 0,7%, 1,5 ml soluție H₃PO₄ de 1% și 0,05 ml soluție de FeSO₄ 0,01 M. Conținutul eprubetelor se agită, eprubetele se astupă cu dop de sticlă și se introduc în baia de apă clocotită pe 60 min. Ulterior probele se răcesc sub un jet de apă rece, se adaugă 3 ml butanol, se agită riguros și se centrifughează 7 min la 3000 rot./min. Se măsoară absorbția fazei organice superioare la 535 nm la spectrofotometru SF-46.

Calculul se efectuează pornind de la coeficientul molar de extincție al DAM egal cu 1,56·10⁵ mol·cm⁻¹. Rezultatele cercetărilor efectuate sunt expuse în tabelul 2.

Tabelul 2

Concentrația dialdehidei malonice (DAM) în sângele recoltat în funcție de metoda folosită

Condițiile experienței	Numărul de animale	Concentrația DAM (?mol/l)
Metoda propusă	6	2,12 ± 0,33*
Cea mai apropiată soluție	6	4,35 ± 0,47

Notă: Diferență statistic concludentă față de cea mai apropiată soluție: *-p<0,05.

Din tabel urmează că metoda propusă permite de a micșora considerabil nivelul DAM în sângele recoltat, ceea ce indică la reducerea gradului de exprimare a stresului oxidativ.

Pentru aprecierea nivelului de catecolamine în eritrocitele din sângele prelevat de la șobolanii din ambele grupe se pregătesc froțiuri pe lame de sticlă care se fixează într-o soluție de bicromat de potasiu de 2% la temperatura de 37 °C timp de 2 ore, apoi se spală cu apă distilată 60 s și se colorează la întuneric 5 min cu o soluție de AgNO₃ de 10%. În continuare froiturile se spală cu apă distilată 60 s, se colorează 60 s cu soluție de eozină de 1%, se spală iarăși cu apă distilată 60 s și se usucă la temperatura camerei.

Intensitatea reacției la catecolamine se apreciază după numărul de eritrocite cu incluziuni și luând în considerare caracterul acestora la microscop (ob. 90, oc. 15).

La animalele din lotul experimental (metoda propusă) în 90...95% eritrocite se depistează incluziuni de culoare închisă sub formă de granule mici și bastonașe solitare localizate uniform în citoplasmă.

MD 3395 G2 2007.09.30

5

La animalele din lotul de control (cea mai apropiată soluție) în 100% eritrocite se depistează incluziuni intens colorate sub formă de granule de diferite mărimi și bastonașe, localizate unul lângă altul, în grupuri, ceea ce indică la prezența unei hipercoagulabilități în acest caz.

- 5 Din datele prezentate urmează că metoda propusă permite de a micșora nivelul catecolaminelor în eritrocite, ceea ce indică la reducerea gradului de exprimare a stresului la aceste animale.

Exemplul 2

Cercetările au fost efectuate pe 10 animale de laborator - șobolani albi masculi cu masa corporală de 160...180 g, divizați în două grupe.

- 10 Regiunea labială inferioară și a gâtului șobolanilor din grupa experimentală (metoda propusă) se prelucrează cu un unguent ce conține: benzilnicotinat de sodiu 25 mg, heparină 1800UI, dimetilsulfoxid (DMSO) 250 mg și în calitate de excipient vaselină-lanolină până la 1 g. După 15 min animalul este supus unei anestezii ușoare cu eter dietilic, unguentul aplicat se înlătură cu un tampon de tifon, pielea se prelucrează cu o soluție de etilendiamintetraacetat de sodiu (EDTA) de 6% cu pH-ul 7,4 și apoi se secționează tegumentul dermal în regiunea labială inferioară, iar sângele se recoltează într-o micro-eprubetă conică cu capac, tip Eppendorf, în prealabil cu o soluție EDTA de 6% cu pH-ul 7,4. După
- 15 colectarea probei de sânge plaga se prelucrează cu un amestec hemostatic, ce conține cristale de alaun de potasiu și N-(2,3-dimetilfenil)-antranilat de sodiu în raport masic de 3:1.

- 20 Animalele din grupa de control (cea mai apropiată soluție) au fost supuse metodei cunoscute de recoltare a sângelui prin secționarea cu o lamă a suprafeței exterioare a gingiei în zona incisivilor inferiori.

Sângele prelevat de la șobolani din ambele grupe a fost folosit pentru determinarea indicilor hematologici și biochimici. Rezultatele obținute sunt date în tabelele 3 și 4.

Tabelul 3

- 25 Indicii hematologici ai sângelui periferic la șobolani în funcție de metoda aplicată

Condițiile experienței	Indicii cercetați									
	Eritrocite, 10 ¹² /l	Eritrocite, 10 ⁹ /l	Hemoglobina, g/l	Formula leucocitară, %						
				Leuc. nesegmentate	Leuc. segm.	Eozinof.	Bazofile	Monocite	Limfocite	
Metoda propusă	8,3±0,39	12,3±0,12	147±8,5	1,4±0,18	27,2±3,9	3,1±0,42	0	2,3±0,87	67,0±6,3	
Cea mai apropiată soluție	7,9±0,47	12,0±0,15	145±7,9	1,7±0,25	29,2±2,8	3,3±0,16	0	2,0±0,15	63,9±6,4	

Tabelul 4

- 30 Indicii biochimici ai sângelui la șobolani în funcție de metoda aplicată

Condițiile experienței	Indicii cercetați									
	ALT, mmol/l/h	AST, mmol/l/h	Albumina, g/l	Glucosa, mmol/l	Ureea, ?mol/l	Bilirubina, mmol/l	Colesterol, mmol/l	K+, mmol/l	Na+, mmol/l	Cl-, mmol/l
Metoda propusă	1,12±0,13	1,23±0,12	63,56±4,01	5,14±0,71	7,56±0,08	15,23±0,98	2,57±0,31	6,51±0,43	142±1,86	105±3,82
Cea mai apropiată soluție	1,35±0,15	61,80±7,14	6,12±0,86	7,71±0,59	16,40±1,40	2,61±0,31	6,98±0,43	148±1,78		99±6,25

Din datele expuse urmează că metoda propusă nu provoacă modificări ale parametrilor hematologici și indicilor biochimici.

- 35 În continuare pentru aprecierea duratei vindecării plăgii aplicate animalele se întrețineau în celule individuale la un regim alimentar obișnuit. Aprecierea duratei vindecării plăgii aplicate se efectua prin observație clinică continuă a suprafeței rănii.

- 40 S-a constatat că termenele de epitelizare a plăgii la animalele din grupa experimentală (metoda propusă) erau mai reduse în medie cu 20...25% față de grupul martor (cea mai apropiată soluție). Astfel, metoda propusă are proprietatea de a reduce termenele de epitelizare a plăgii aplicate.

Analogic exemplurilor de mai sus au fost cercetate și alte concentrații ale unguentului aplicat (benzilnicotinat de sodiu 5...30 mg, heparină 1200...1800 UI și dimetilsulfoxid 100...300 mg, excipient vaselină-lanolină până la 1 g), precum și ale amestecului hemostatic (cristale de alaun de potasiu) și N-

MD 3395 G2 2007.09.30

6

(2,3-dimetilfenil)-antranilat de sodiu în raport de 2:1, 4:1. Experiențele au permis de a stabili valorile limite optime ale unguentului aplicat (benzilnicotinat de sodiu 15...25 mg, heparină 1200...1800 UI și dimetilsulfoxid 200...250 mg, excipient vaselină-lanolină până la 1 g), precum și ale amestecului hemostatic – cristale de alaun de potasiu și N-(2,3-dimetilfenil)-antranilat de sodiu în raport masic de 3:1 pentru obținerea efectului pozitiv.

Prin urmare, metoda propusă este mai eficientă, deoarece ea asigură recoltarea unei cantități mai mari de sânge, o calitate mai bună a sângelui recoltat prin excluderea formării microcheagurilor, reducerea gradului de hemoliză și hipercatecolemie, micșorarea nivelului dialdehidei malonice în sangele recoltat în comparație cu metoda cunoscută, și, totodată, ea reduce pericolul apariției hemoragiilor, termenele de epitelizare a plăgii aplicate. Analizele au fost efectuate în Laboratorul Biochimie al USMF „Nicolae Testemițanu” (în volum de 300 analize).

(57) Revendicări:

1. Metodă de recoltare a probelor de sânge de la animalele de laborator, care constă în efectuarea unei incizii și recoltarea probelor de sânge, **caracterizată prin aceea că** suplimentar se prelucrează regiunea labială inferioară sau a gâtului animalelor de laborator cu un unguent ce conține benzilnicotinat de sodiu, heparină, dimetilsulfoxid și un excipient, după 10...15 min animalele sunt supuse unei anestezii ușoare inhalatorii cu eter dietilic timp de 1...5 min, unguentul aplicat se înlătură cu un tampon de tifon, pielea se prelucrează cu o soluție de 6% de etilendiamintetraacetat de sodiu cu pH-ul 7,4 și după recoltarea probelor se efectuează hemostaza prin prelucrarea plăgii cu un amestec hemostatic.

2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** unguentul aplicat conține benzilnicotinat de sodiu 20...25 mg, heparină 1200...1800 UI, dimetilsulfoxid 200...250 mg și în calitate de excipient vaselină-lanolină până la 1 g.

3. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** amestecul hemostatic conține alaun de potasiu și N-(2,3-dimetilfenil)-antranilat de sodiu în raport masic de 3:1.

(56) Referințe bibliografice:

1. Кветков В.П. Сравнительная характеристика методов забора крови для исследования у мелких животных. Материалы итоговой научной конференции по природноочаговым болезням. Тюмень, 1963, с. 125-129
2. Guidin E., Marinescu D. Patologia animalelor de laborator și tehnica experimentală. Editura Moldogrup, Iași, 1997, p. 203-205

Director Departament: JOVMIR Tudor

Examinator: GROSU Petru

Redactor: CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2006 0166		
(22) Data depozit: 2006.06.21		
(51) : Int.Cl: A61B 10/00 (2006.01) G01N 33/49 (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul : Metodă de recoltare a probelor de sânge de la animalele de laborator (71) Solicitantul : UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : probe de sange		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (MD, EA, SU, inclusiv și colecția „nerepublică”)		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	1. Manual de laborator clinic. Ed. Medicală București, 1962, p. 1075-1078.	1
A	2. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. Киев, изд. «Вища школа», 1983. С. 264.266.	1
A	3. Кветков В.П. Сравнительная характеристика методов забора крови для исследования у мелких животных. Материалы итоговой научной конференции по природноочаговым болезням. 15.17 февраля 1963 года. Тюмень, 1963, с. 125-129.	1
A	4. Резин В.А. Вакуумный прибор для взятия крови у крыс // Патол. физиол. эксперим. терапия. 1987, вып. 5, с. 84.	1
A	5. Руль Ю.В., Швайко И.И. Устройство для взятия проб крови у крыс // Лаб. дело, 1971, № 5, с. 314-315.	1
A	6. Сурдейкина Л.Н. Получение крови и негемолизированной сыворотки у мелких лабораторных животных и собак // Лаб. дело, 1964, № 1, с. 183-185.	1
A	7. Guidin Elena, Marinescu Dan. Patologia animalelor de laborator și tehnica experimentală. Editura Moldogrup, Iași, 1997, p. 203-205-	1
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria care conține baza invenției

E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data	X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)	Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă	& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării	2007-07-03
Examinatorul	GROSU Petru

