



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01123

(22) Data de depozit: 17.11.2010

(41) Data publicării cererii:  
29.04.2011 BOPI nr. 4/2011

(71) Solicitant:

- STOIAN GHEORGHE, CAL. VACARESTI NR. 338 BL. 15 SC. 1 ET. 5 AP. 17, BUCUREȘTI, B, RO;
- DOBREANU MARIA, ALEEA CICEU NR. 11, BL.E14, SC.2, ET.1, AP.26, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- CONSTANTINESCU ANDREI ALEXANDRU, STR. COL. POENARU BORDEA NR.16, AP.4, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- STURZOIU CRISTINA, ALEEA ADRIAN CÎRSTEA NR.3, BL.33B, SC.1, AP.22, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- UNGUREANU ADRIAN, ȘOS. VERGULUI NR.67, BL.15D, ET.3, AP.17, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- STOIAN GHEORGHE, CAL. VACARESTI NR. 338 BL. 15 SC. 1 ET. 5 AP. 17, BUCUREȘTI, B, RO;
- CONSTANTINESCU ANDREI ALEXANDRU, STR. COL. POENARU BORDEA NR.16, AP.4, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- DOBREANU MARIA, ALEEA CICEU NR. 11, BL.E14, SC.2, ET.1, AP.26, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- UNGUREANU ADRIAN, ȘOS. VERGULUI NR.67, BL.15D, ET.3, AP.17, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- STURZOIU CRISTINA, ALEEA ADRIAN CÎRSTEA NR.3, BL.33B, SC.1, AP.22, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **METODĂ IMAGISTICĂ PENTRU CARACTERIZAREA MORFOLOGICĂ A CELULELOR SANGUINE PRIN UTILIZAREA UNUI NOU MARKER FLUORESCENT - HIPERICINA**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o metodă de evaluare imagistică a calității și a fiabilității eritrocitelor umane de uz terapeutic, stocate pe o perioadă de timp caracteristică fiecărui produs sanguin eritrocitar. Metoda conform invenției presupune prelevarea de eșantioane din pungele cu sânge pentru stocare și analizarea lor, din punct de vedere imagistic, prin aplicarea unei soluții de

hipericină. Analiza imagistică se realizează prin observarea, la microscopul confocal, a modificărilor morfologice ale eritrocitelor stocate.

Revendicări: 9  
Figuri: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI  
Cerere de brevet de invenție  
Nr. a 2010 01123  
Data depozit 17-11-2010

14  
Lish  
H. Cant  
H. Cant  
H. Cant

Prezenta invenție se referă la o metodă de evaluare imagistică a calității și fiabilității eritrocitelor umane de uz terapeutic, stocate pe o perioadă de timp caracteristică fiecărui produs sanguin eritrocitar.

Sângele total și concentratele eritrocitare utilizate în transfuzie pot fi păstrate timp de 42 de zile, dacă sunt resuspendate în SAGM, rata acceptată de supraviețuire *in vivo* a eritrocitelor după administrare fiind de 75% (Walker et al., 1993).

Au fost identificate o serie de modificări sanguine ale celulelor roșii sangvine (RBC) în timpul stocării, care sunt asociate cu efectele adverse negative apărute după transfuzie, precum oxigenarea redusă a țesuturilor. Aceste alterări sunt denumite, colectiv, „leziuni de conservare”, includ modificări biochimice, biomecanice și imunologice și pot cauza probleme multiple de sănătate pacienților care primesc produse sanguine eritrocitare stocate o perioadă mai mare de timp (Koch et al., 2008).

Transfuzia de sânge stocat pe o durată mai mare de timp crește riscul apariției complicațiilor după intervențiile de *bypass* arterial și/sau după intervențiile chirurgicale pe cord (Koch et al., 2008). Studiile experimentale indică faptul ca eritrocitele îmbătrânite își pierd elasticitatea și aderă pe suprafața endotelială cauzând ocluzia capilarelor (Hovav et al., 1999). Deformabilitatea eritrocitelor scade progresiv în timpul stocării datorită pierderii de fragmente membranare (Izzo et al., 1999; Card et al., 1982). Pierderea integrității membranei și scăderea deformabilității celulare pot conduce la ocluzia microcirculației rezultând ischemia tisulară la pacienții care primesc produse eritrocitare vechi (Marik et al., 1993). În plus, transfuzia de eritrocite îmbătrânite a fost asociată cu TRIM (imuno modulare asociată transfuziei) și MOF (insuficiență multiplă de organe) (Zallen et al., 1999; Moore et al., 1997). Mai mult, transfuzia de eritrocite îmbătrânite se poate asocia cu riscul crescut al morbidității și mortalității ca urmare a complicațiilor posttransfuzionale (Purdy et al., 1997; Leal-Noval et al., 2003), care se accentuează pe măsura creșterii perioadei de stocaj.

Sunt cunoscute diferite metode de testare a calității sângelui provenit de la donatori: hemoglobină, hematocrit, rata hemolizei, numărul de leucocite, numărul de plachete. Testele virale și bacteriologice reprezintă primul nivel de triere al sângelui, care permit detecția unor posibile contaminări cu virusuri sau bacterii patogene (Sweeney & Rizk, 1999; Shander et al., 2007; Kaplan, 2007).

Testele pentru analiza unor posibile contaminări cu elemente celulare sau moleculare indezirabile sunt folosite pentru detectarea de celule sangvine care nu se doresc a fi stocate ori substanțe chimice rezultate în urma procesării pentru stocarea sângelui (Sweeney & Rizk, 1999; Shander et al., 2007; Kaplan, 2007).

13  
lib  
Hunt  
Hess  
Willy

Toate aceste teste pot determina calitatea sângelui, în faza de pre-stocare, din punct de vedere al prezenței de elemente virale, celulare sau chimice, care poate afecta sănătatea pacienților. Însă eritrocitele stocate pot prezenta alte riscuri pentru pacienții supuși transfuziei. Aceste riscuri survin în urma modificărilor morfo-biochimice a hematiilor, din timpul păstrării, care conduc la alterarea semnificativă a funcțiilor celulare. Aceste modificări nu sunt detectabile prin testele clasice amintite anterior și pot apărea chiar la eritrocitele aflate într-o stare oficial acceptată pentru transfuzie. Lipsa unor teste specifice pentru determinarea nivelului de alterare morfo-funcțională a hematiilor stocate reprezintă un real risc pentru sănătatea pacienților, întrucât lipsa contaminării virale și bacteriologice sau chimice nu garantează și statusul biologic și funcțional optim al eritrocitelor, la un anumit moment, din perioada de stocare (conform Ghidului de Preparare, Utilizare și Asigurării Calității pentru Componentele de Sânge al CE 2007).

Mai exista teste care stabilesc compatibilitatea dintre pacientul care va suferi o transfuzie și produsul sanguin stocat disponibil: grup sanguin ABO, Rh și alte sisteme de grup (Kaplan, 2007).

Totuși, se cunoaște o metodă universal acceptată pentru determinarea calității sângelui stocat, care constă în determinarea nivelului de hemoliza a eritrocitelor stocate prin măsurarea cantității de hemoglobina eliberate (standard mai mic de 0,8% din masa eritrocitară) din hematii, în timpul păstrării. Aproximându-se nivelul hemolitic al eritrocitelor dintr-o unitate stocată se poate aprecia nivelul de alterare al acestora (Hess et al., 2009). Metoda prezintă mai multe dezavantaje: se aplică la sfârșitul perioadei de stocare; se testează un procent minim de unități stocate dintr-un lot întreg (1% din producția lunară), inducând erori în aprecierea calității sângelui stocat dintr-un anumit lot; aprecierea nivelului de alterare a eritrocitelor este nespecifică, indirectă și inexactă, conducând la aproximarea incorectă a calității eritrocitelor stocate; aplicarea metodei necesită mai multe etape tehnice și un timp de analiză crescut.

O alta metodă pentru determinarea calității eritrocitelor stocate, aflată în dezvoltare, presupune analizarea stabilității mecanice a hematiilor prin măsurarea hemoglobinei libere și aproximarea gradului de hemoliză (Schulzki & Reinhart, 2010). Astfel, aceasta metodă prezintă dezavantajele prezentate anterior, și anume nedeterminarea specifică a alterărilor primare apărute la eritrocitele stocate.

Din punct de vedere al determinării calității eritrocitelor stocate se mai cunoaște o metodă, aflată încă în dezvoltare, care se bazează pe analizarea fragilității membranei celulare. Astfel, analizatorul Red Blood Cell Fragility Meter poate măsura nivelul alterării fiecărei unități de sânge stocat aproape de sau chiar în momentul utilizării (Alfano, 2009).

12  
Lis  
ACunt  
Stur  
HJ

Fragilitatea hematiilor este considerată un marker important pentru randamentul transfuzional pentru că influențează nivelul hemolizei, *in vivo*, și scăderea capacității de transport a oxigenului a celulelor rămase viabile, generând ischemia tisulară. Analizatorul Red Blood Cell Fragility Meter prezintă anumite dezavantaje, cum ar fi numărul de etape tehnice și logistica necesară aplicării testului. Metoda implică aplicarea unui stres mecanic de intensitate și durată variabile, determinarea spectrofotometrică a hemolizatului din probă și procesarea computerizată a rezultatelor prin intermediul modelării statistice pentru cuantificarea eficacității și compatibilității unității analizate cu grupuri specifice de pacienți. Așadar, această metodă de analiză a eritrocitelor stocate prezintă un dezavantaj important, nedeterminarea fenomenul de permeabilizare excesivă a membranei, care poate apărea fără ca membrana să prezinte o alterare detectabilă prin metodele descrise anterior, respectiv fără să își piardă din deformabilitate sau elasticitate.

De asemenea, pierderea deformabilității celulare se mai poate măsura prin ektacitometrie, prin tehnica *resistive pulse spectroscopy*, filtrare prin micropori, principiul *optical tweezers* (Alfano, 2009). Aceste metode nu sunt însă fiabile pentru a fi folosite în testarea sângelui stocat pentru că implică un protocol de lucru complicat și o durată de timp care nu permite efectuarea testării rapide necesare în transfuzie.

Alte posibile metode de determinare a viabilității eritrocitelor pe perioada stocării sunt: măsurarea impedanței electrice; măsurarea parametrilor fiziologici precum nivelul ATP, nivelul 2,3-DPG,  $K^+$ ,  $Cl^-$  și  $Na^+$ , măsurarea nivelului de pH, măsurarea proprietăților electrice ale sângelui. Toate aceste tipuri de teste sunt scumpe și îndelungate (Ulgen & Sezdi 2007)

Prin aplicarea invenției propuse se înlătură dezavantajele metodelor de determinare a calității eritrocitelor stocate amintite anterior prin faptul că: evidențiază un spectru mult mai larg al aspectelor morfo-funcționale ale eritrocitelor stocate; permite măsurarea/cuantificarea eritrocitelor viabile din punct de vedere al integrității membranei; evidențiază specific și în detaliu modificările morfologice ale membranei celulare; poate evidenția stadiile timpurii ale alterării hematiilor stocate; permite aprecierea exactă a nivelului de alterare a hematiilor; poate completa setul de teste pre-stocare ajutând la trierea sângelui nu numai pe baza contaminării ci și a nivelului de eritrocite îmbătrânite; poate evidenția anumite maladii hematologice, fără consum mare de reactivi; oferă rezultate ușor de interpretat; este un test rapid și eficient; implică un procedeu tehnic simplu și netoxic; necesită resurse financiare minime; metoda este pretabilă la automatizări. Toate aceste caracteristici specifice conferă metodei inventate de testare a calității eritrocitelor stocate avantajul rezultatelor exacte, specifice și rapide.

Handwritten signatures and initials, including "Acant" and "Sturza".

Aplicarea invenției presupune două etape de lucru, și anume aplicarea soluției de hipericină peste proba de eritrocite prelevate din unitatea stocată și vizualizarea fluorescenței hipericinei la microscopul confocal.

Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a invenției prin figurile:

- fig. 1. Eritrocite în prima zi de stocare.
- fig. 2. Eritrocite în ziua de stocare 21.
- fig. 3. Eritrocite în ziua de stocare 42.
- fig. 4. Evidențierea morfologiei eritrocitelor decongelate.

**Aparatura necesară pentru efectuarea determinărilor:**

- set lamă-lamelă de sticlă pentru preparat;
- microscop confocal pentru vizualizarea fluorescenței;

**Mod de lucru**

Preparatul pentru microscopia confocală se obține din aplicarea a 5 μl soluție de hipericină peste 5 μl masă eritrocitară fluidă. Din acest amestec se pipetează 5 μl între lamă și lamelă. Excitarea hipericinei se obține cu laser, la o lungime de undă între 480-490 nm, iar emisia se obține în intervalul de lungimi de undă 550-600 nm. Concentrația de hipericină utilizată în soluția de marcarea este de  $1,01 \times 10^{-2}$  μmoli/ml.

**Interpretarea rezultatelor**

Hipericina se leagă preferențial de colesterolul din membrana celulară care este o componentă deosebit de importantă a acesteia. Membrana eritrocitelor este bogată în colesterol, iar marcarea cu hipericină evidențiază detaliat modificările morfologice care apar datorită degradării, respectiv deformare și fragmentare.

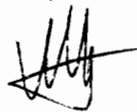
Scăderea intensității fluorescenței generate de hipericina legată de membrana eritrocitară indică pierderea de colesterol membranar și, implicit, degradarea membranei plasmatică.

Fluorescența din interiorul eritrocitelor este generată de aportul de hipericină al acestora indicând permeabilizarea excesivă a membranei, ca stadiu avansat al alterării. Intensitatea fluorescenței din interiorul eritrocitelor este strâns corelată cu gradul de permeabilizare, respectiv alterare, a celulelor.

Fluorescența difuză a membranei plasmatică este generată de întreruperea continuității acesteia ca urmare a alterării și pierderii colesterolului membranar, având drept consecință destabilizarea membranei. Aceasta indică alterarea puternică se coroborează cu diminuarea capacității antioxidante a membranei eritrocitare și a funcțiilor celulare.

a-2010-01123--  
17-11-2010

Beas  
A Cant  
Sturza



Fluorescența intercelulară este generată de fragmente membranare și/sau conținut citosolic eritrocitar, indicând nivelul veziculării și/sau hemolizei, dar și aprecierea cantității de resturi celulare distruse din compoziția produsului sanguin (eritrocite, leucocite, plachete).

Amplitudinea situațiilor caracterizate, în ordinea generării acestora, este proporțională cu nivelul respectiv de degradare al eritrocitelor.

2  
lib  
Account  
Hess

### Referințe bibliografice

- Alfano, K.M., 2009. *A red blood cell fragility meter for facilitating blood triage*. American College of Clinical Engineering, Student Paper Competition.
- Card, R., Mohandas, N., Perkins, H., Shohet, S., 1982. *Deformability of stored red-blood-cells: relationship to degree of packing*. *Transfusion*, 22: 96-101.
- Hess, J.R., Sparrow, R.L., van der Meer, P.F., Acker, J.P., Cardigan, R.A., Devine, D.A., 2009. *Red blood cell hemolysis during blood bank storage: using national quality management data to answer basic scientific questions*. *Transfusion*.
- Hovav, T., Yedgar, S., Manny, N., Barshtein, G., 1999. *Alteration of red cell aggregability and shape during blood storage*. *Transfusion*, 39: 277-81.
- Izzo, P., Manicone, A., Spagnuolo, A., et al., 1999. *Erythrocytes stored in CPD SAG-mannitol : evaluation of their deformability*. *Clin. Hemorheol. Micro.*, 21: 335-339.
- Schulzki, T., Reinhart. W.H., 2010. *Overhead rotation: A simple method to assess the mechanical stability of stored erythrocytes*. *J. Clin. Hem. Micro.*, 45(2-4): 383-389.
- Kaplan, H. S., Skerrett D. L., 2007. *Blood transfusion*. The Merck Manuals, Online Medical Library.
- Koch, G., Li, L., Sessler, I., (2008): *Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery*. *N. Engl. J. Med.*, 358:1229-1239.
- Leal-Noval, S., Jara-Lopez, I., Garcia-Garmendia, J., 2003. *Influence of erythrocyte concentrate storage time on post-surgical morbidity in cardiac surgery patients*. *Anesthesiology*, 98:815-822.
- Marik, P., Sibblad, W., 1993. *Effect of stored-blood transfusion on oxygen delivery in patients with sepsis*. *J. Am. Med. Assoc.*, 269: 3024-3029.
- Moore, F., Moore, E., Sauaia, A., 1997. *Blood transfusion: an independent risk factor for postinjury multiple organ failure*. *Arch. Surg-Chicago*, 132: 620-625.
- Purdy, F., Tweeddale, M., Merrick, P., 1997. *Association of mortality with age of blood transfused in septic ICU patients*. *Can. J. Anaesth.*, 44:1256-1261.
- Shander A., Hofmann A., Gombotz H., Theusinger O.M., Spahn D.R., 2007. *Estimating the Cost of Blood: Past, Present, and Future Directions*. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, 21(2): 271-89.
- Sweeney, J.D., Rizk, Y., 1999. *Clinical Transfusion Medicine*. Landes Bioscience, USA, ISBN: 1-57059-494-5.
- Ulgen, Y., Sezdi, M., 2007. *Physiological quality assessment of stored whole blood by means of electrical measurements*. *Med. Bio. Eng. Comput.*, 45: 653-660.

a-2010-01123--  
17-11-2010

Beck  
Hunt  
Hurst

Walker, H., 1993. *Technical manual* 11th Ed. Arlington, VA: American Association of Blood Banks.

Zallen, G., Offner, P., Moore, E., et al., 1999. *Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure.* Am. J. Surg

VA



Miss  
H. Cant  
H. Cant  
H. Cant

## Revendicări

1. Metoda pentru determinarea calității eritrocitelor umane stocate pentru transfuzie **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde următoarele etape:
  - a. Se prelevează 5  $\mu$ l eritrocite din unitatea de stocare de interes;
  - b. Se adaugă 5  $\mu$ l soluție de hipericina de concentrație  $1,01 \times 10^{-2}$   $\mu$ mol/ml;
  - c. Din amestec se folosesc, imediat, 5  $\mu$ l pentru obținerea preparatului microscopic între lama și lamela de sticlă;
  - d. Fluorescența generată de hipericina legată de membrana eritocitară se vizualizează la microscopul confocal imediat după obținerea preparatului microscopic;
  - e. Rezultatele de microscopie se interpretează astfel:
    - marcarea cu hipericină evidențiază detaliat modificările morfologice care apar datorită degradării, respectiv de deformare și fragmentare a eritrocitului;
    - scăderea intensității fluorescenței generate de hipericina legată de membrana eritocitară indică pierderea de colesterol membranar și, implicit, degradarea membranei plasmaticice;
    - fluorescența din interiorul eritrocitelor este generată de aportul de hipericină al acestora indicând permeabilizarea excesivă a membranei, ca stadiu avansat al alterării. Intensitatea fluorescenței din interiorul eritrocitelor este strâns corelată cu gradul de permeabilizare, respectiv alterare, ale celulelor;
    - fluorescența difuză din zona membranei plasmaticice este generată de destabilizarea, alterarea și pierderea colesterolului membranar. Aceasta indică alterarea puternică a membranei eritocitare și a funcțiilor celulare;
    - fluorescența intercelulară este generată de fragmente membranare și/sau conținut citosolic eritocitar, indicând nivelul veziculării și/sau hemolizei;
    - amplitudinea situațiilor caracterizate, în ordinea generării acestora, este proporțională cu nivelul respectiv de degradare a eritrocitelor;
2. Procedeu de configurare a parametrilor microscopului confocal **caracterizat prin aceea că** acesta cuprinde următoarele etape:
  - a. Excitarea hipericinei se obține cu laser la lungimea de undă 480-490 nm;
  - b. Emisia fluorescenței se obține pe intervalul lungimii de undă 530-600 nm;
  - c. Grosimea secțiunii optice: 0,23  $\mu$ m;

8  
L. R.  
AC  
H. J.  
H. J.

3. Figurile 1, 2, 3, și 4 **caracterizate prin aceea că** sunt obținute în urma cercetărilor întreprinse pentru obținerea metodei și demonstrează veridicitatea acesteia;
4. Aplicabilitatea **caracterizată prin aceea că** metoda poate fi utilizată pentru determinarea calității eritrocitelor stocate, aproape de sau la momentul efectuării transfuziei, parcurgându-se etapele descrise în revendicările 1 și 2.
5. Aplicabilitatea **caracterizată prin aceea că** metoda poate fi utilizată pentru determinarea calității eritrocitelor prelevate de la donatori, în stadiul de prestocare, completând setul de analize pentru depistarea contaminărilor virale, biologice și chimice, prin parcurgerea etapelor descrise în revendicările 1 și 2.
6. Aplicabilitatea **caracterizată prin aceea că** metoda poate fi utilizată pentru determinarea calității eritrocitelor congelate, după decongelare.
7. Aplicabilitatea **caracterizată prin aceea că** metoda poate fi utilizată pentru determinarea calității leucocitelor și plachetelor, sau a resturilor acestora, care contaminează concentratele eritrocitare.
8. Aplicabilitatea **caracterizată prin aceea că** metoda poate fi utilizată pentru evidențierea exozomilor din suspensiile eritrocitare filtrate.
9. Aplicabilitatea **caracterizată prin aceea că** metoda poate fi extinsă pentru analiza stării eritrocitelor la persoane suferind de diverse maladii (malaria, hipertensiune, diabet, etc.), stări patologice în care este afectată structura și funcțiile eritrocitului, prin parcurgerea etapelor descrise în revendicările 1 și 2.

α-2010-01123--  
17-11-2010

7  
Liss  
H. Carrut  
M. 2009  
M

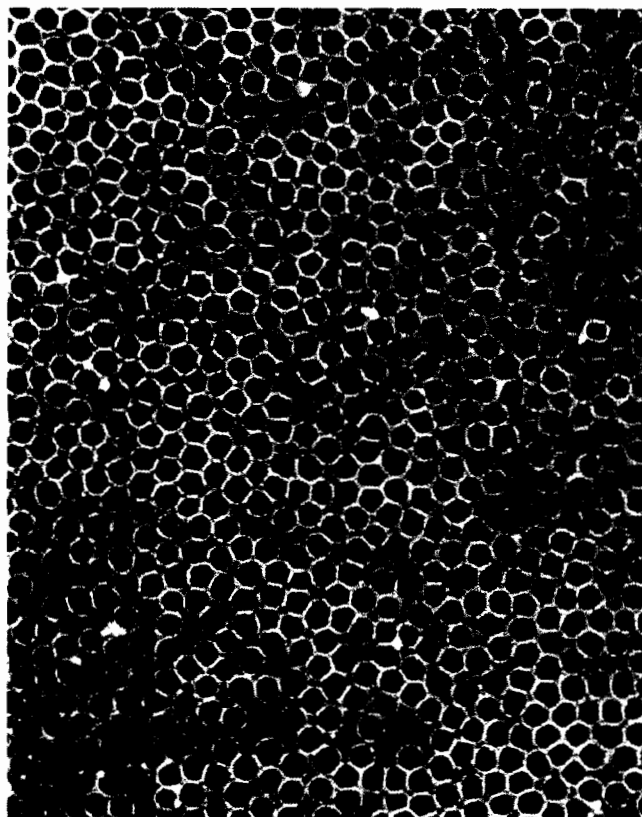


Figura 1.

a-2010-01123--  
17 -11- 2010

6

*Handwritten signatures and initials:*  
LBB  
Hant  
Hurog  
HLS

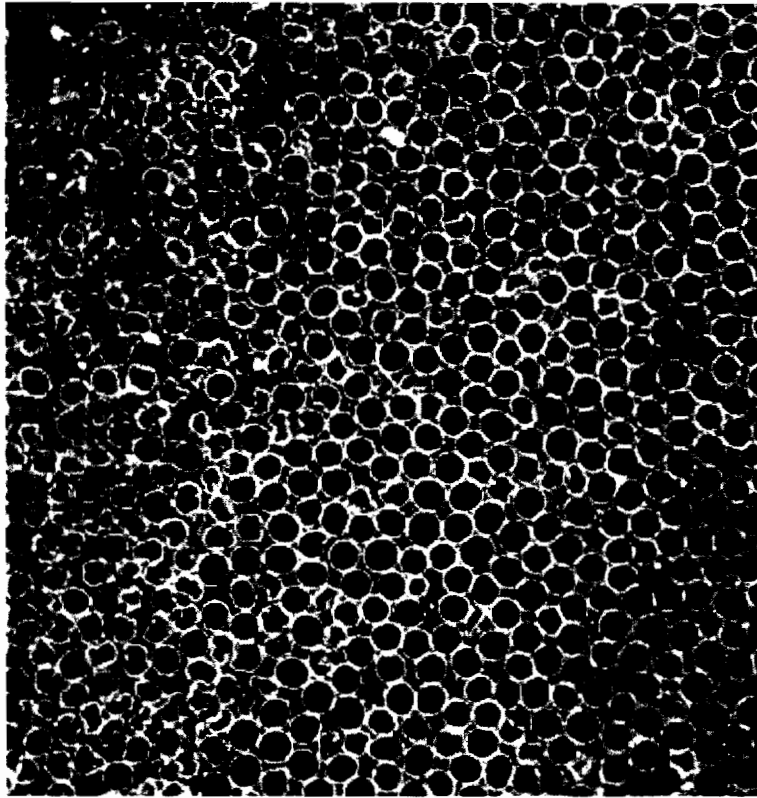


Figura 2.

*Handwritten notes:*  
Lush  
Kant  
Hura  
WA

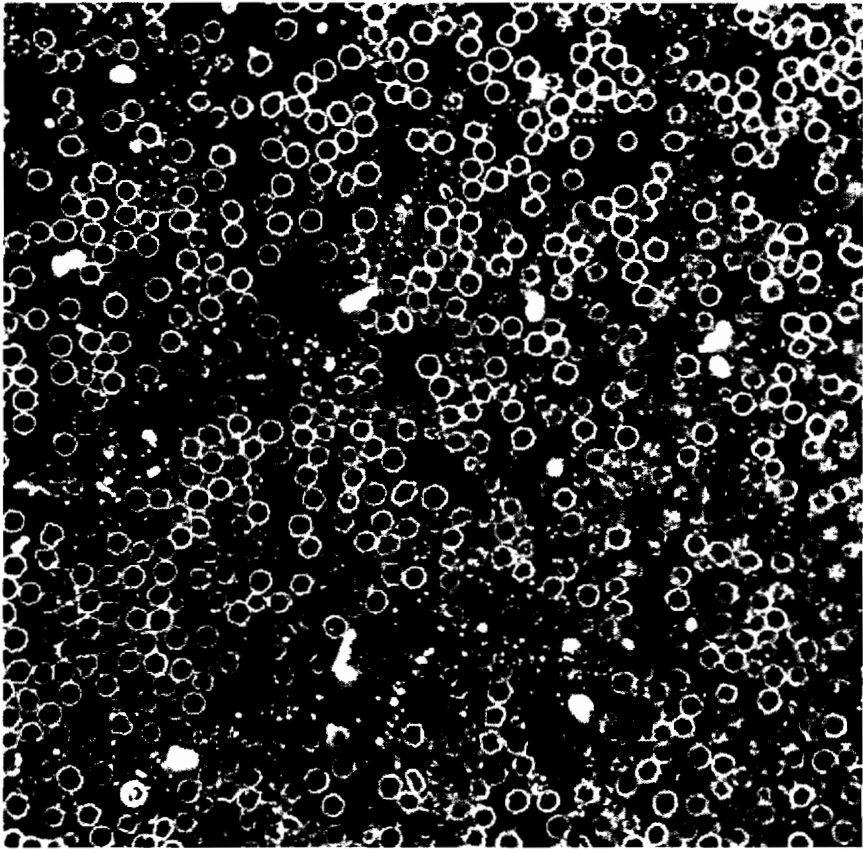


Figura 3.

a-2010-01123--  
0102-11-21

4  
Liss  
Kunt  
Sturz  
W

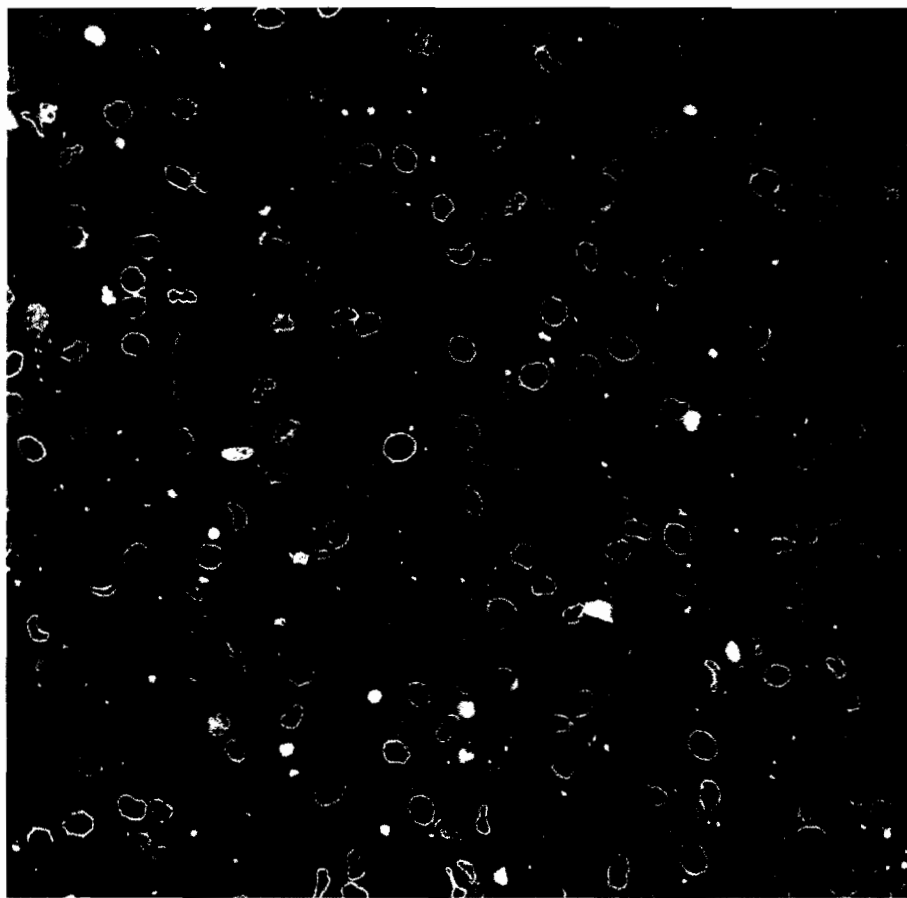


Figura 4.