



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00432**

(22) Data de depozit: **21/07/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/01/2024 BOPI nr. **1/2024**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" DIN
CLUJ-NAPOCA,
STR.MIHAIL KOGĂLNICEANU NR.1,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **PRO-VITAM S.R.L., STR.MUNCITORILOR,
NR.16, SFÂNTU GHEORGHE, CV, RO**

(72) Inventatori:
• **LEOPOLD NICOLAE, STR.ALMAȘULUI
NR.5, AP.13, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **FEJER SZILARD, STR.PETOFI SANDOR,
NR.25, BL.47, AP.3, TG.SECUIESC, CV, RO;**
• **IANCU ȘTEFANIA DANA, STR.BARTOK
BELA, NR.5, AP.41, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **KORODI MONIKA, STR.BISERICII,
NR.520E, TUSNADU NOU, HR, RO;**
• **RAKOSI KINGA, STR.NOUA, NR.3,
BL.14A, AP.6, TG.SECUIESC, CV, RO;**
• **JENEI ZSUZSANNA, STR.SPITALULUI,
NR.4, TG.SECUIESC, CV, RO**

(54) **PROCEDEU DE CUANTIFICARE A ALBUMINEI GLICATE
DIN PROBE DE PLASMĂ SANGVINĂ PRIN ADSORBȚIE
PE NANOPARTICULE DE ARGINT ȘI ANALIZĂ
PRIN SPECTROSCOPIE RAMAN**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de cuantificare a albuminei glicate în probe de plasmă sanguină. Metoda, conform invenției, constă în etapele: mixarea probei de plasmă cu o soluție coloidală de nanoparticule de argint activate cu iodură, adsorbția albuminei pe suprafața nanoparticulelor de argint folosite ca substrat pentru amplificarea semnalului Raman, înregistrarea spectrului probei folosind spectrometrul Raman cu excitație laser

la 638 nm, determinarea concentrațiilor de albumină glicate din plasmă pe baza profilului spectral SERS pre-procesate, folosind un model matematic bazat pe metode de regresie, rezultând o eroare medie de predicție a valorilor de albumină glicată de 1,98 mg/ml.

Revendicări: 1
Figuri: 2

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).



18

Procedeu de cuantificare a albuminei glicate din probe de plasmă sanguină prin adsorbție pe nanoparticule de argint și analiză prin spectroscopie Raman

Invenția se referă la un procedeu de cuantificare a albuminei glicate în probe de plasmă sanguină. Detecția și cuantificarea albuminei are loc în urma adsorbției acesteia pe suprafața nanoparticulelor de argint și detecția Raman a proteinei adsorbite. Cuantificarea albuminei glicate se realizează pe baza profilului spectral, analizat matematic folosind un model matematic bazat pe metode de regresie.

Diabetul zaharat se caracterizează printr-o reglare defectuoasă a glicemiei, fiind cea mai frecventă tulburare endocrină, sute de milioane de persoane fiind afectate la nivel mondial [American Diabetes, A., *Standards of Medical Care in Diabetes-2019 Abridged for Primary Care Providers*. Clinical diabetes: a publication of the American Diabetes Association, 2019. 37(1): p. 11-34]. Deoarece opțiunile terapeutice sunt limitate, controlul glicemic eficient este imperativ în menținerea sub control a afecțiunii, evitând complicații grave acute și cronice. În acest sens, se impune screening-ul pentru variațiile nivelului de glucoză din sânge. Cuantificarea directă a glucozei prin glucometre convenționale oferă o valoare de moment a glicemiei, în schimb cuantificarea proteinelor glicate (glicozilate), cum ar fi hemoglobina sau albumina, oferă o valoare medie a glicemiei, pe o perioadă de câteva săptămâni.

Albumina glicată reflectă concentrația medie de glucoză din sânge în ultimele 2-4 săptămâni și poate confirma mai rapid eficacitatea unui eventual tratament datorită unui timp de înjumătățire mai scurt decât cel al hemoglobinei.

Spectroscopia optică de tip Raman este o metodă de analiză moleculară nedistructivă ce se bazează pe împrăștierea inelastică a fotonilor în urma ciocnirii cu molecule. Adsorbția moleculelor pe suprafața unei nanoparticule metalice, cu proprietăți plasmonice, cum ar fi nanoparticulele de argint, determină o amplificare a semnalului Raman cu mai multe ordine de mărime, fiind raportată în literatură chiar și detecție la nivel unimolecular [Stefancu, A., și colab., *Halide–Metal Complexes at Plasmonic Interfaces Create New Decay Pathways for Plasmons and Excited Molecules*. ACS Photonics, 2022. 9(3): p. 895-904.]. Metodologia analizei Raman a moleculelor adsorbite pe suprafața nanoparticulelor metalice este cunoscută în literatura de specialitate sub denumirea surface-enhanced Raman scattering (SERS).

Proprietatea de a oferi informație structurală moleculară la limite de detecție comparabile cu metoda de emisie în fluorescență, determină utilitatea metodei SERS în aplicații de spectroscopie clinică. În acest sens, metoda SERS a fost validată în numeroase studii clinice cum ar fi detecția probelor prelevate de la pacienți cu diferite tipuri de cancer [Cervo, S., și colab., *SERS analysis of serum for detection of early and locally advanced breast*

cancer. Anal Bioanal Chem, 2015. **407**(24): p. 7503-9; Moisoiu, V., și colab., *SERS liquid biopsy: An emerging tool for medical diagnosis*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021. **208**: p. 112064] sau detecția și cuantificarea albuminei în probe de urină la concentrații de până la 3 $\mu\text{g/mL}$ [Stefancu, A., și colab., *SERS-based quantification of albuminuria in the normal-to-mildly increased range*. Analyst, 2018. **143**(22): p. 5372-5379].

În figurile anexate, care fac parte din prezenta invenție, sunt redată următoarele:

Figura 1, prezintă o imagine de microscopie electronică reprezentativă pentru nanoparticulele de argint folosite ca substrat pentru amplificarea semnalului Raman și obținerea spectrelor SERS.

Figura 2, ilustrează spectrul SERS mediu și deviația standard pentru 45 de probe de plasmă, obținute în urma adsorbției proteinelor la suprafața de argint modificată cu iodură și achiziționarea spectrelor folosind spectrometrul Raman cu excitare laser la 638 nm.

Invenția prezintă o modalitate rapidă și relativ simplă pentru cuantificarea albuminei glicate în probe de plasmă sanguină. Se prezintă în continuare un exemplu concret, nelimitativ, de realizare a invenției.

- Pentru analiză, s-a folosit o soluție coloidală de nanoparticule de argint, obținută printr-o metodă de sinteză convențională [Leopold, N. and B. Lendl, *A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride*. The Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(24): p. 5723-5727] (Figura 1). Suprafața nanoparticulelor a fost activată cu ioni de iodură, prin adăugarea de iodură de potasiu (KI), 10^{-3} M concentrație finală. În continuare s-au mixat 10 μl probă de plasmă cu 10 μl soluție coloidală de argint activată cu iodură.
- S-a acoperit cu folie de aluminiu o lamelă de microscop. S-au depus 10 μl din mixtura plasmă sanguină/nanoparticule de argint pe lamela de microscop acoperită cu folie de aluminiu.
- Laserul spectrometrului cu emisie la 638 nm și putere ~ 50 mW, este direcționat pe picătura de probă. Au fost achiziționate spectre SERS ale probelor de plasmă la o rezoluție spectrală de 8-10 cm^{-1} . Spectrele înregistrate reprezintă media a 4 achiziții a câte 10 secunde expunere fiecare.
- Spectrele SERS au fost procesate după achiziționare. Pașii de procesare au fost următorii: s-a păstrat doar domeniul spectral 800-1800 cm^{-1} ; s-a aplicat o funcție matematică pentru reducerea liniei de bază (de exemplu funcția tip Rubber-band); s-a realizat normalizarea spectrelor (de exemplu, normalizare la unitate).

16

- Concentrațiile de albumină glicată din probele de plasmă au fost determinate prin analiza profilelor spectrale SERS pre-procesate, folosind un model matematic bazat pe metode de regresie (de exemplu regresie prin metoda celor mai mici pătrate). Pentru realizarea modelului matematic, s-a folosit un set de 45 de probe de plasmă cu concentrații cunoscute de albumină glicată în urma determinărilor prin metode convenționale de laborator (de exemplu metoda imunologică). Conform analizelor de laborator clinic, valorile concentrațiilor de albumină glicată au fost între 1.02-32.19 mg/ml). Setul de probe a fost împărțit aleator într-un set de 36 de probe (concentrații între 1.02-9.16 mg/ml), folosit pentru antrenarea modelului de regresie, și 9 probe (concentrații între 1.47-32.19 mg/ml) pentru validarea externă a modelului. S-a evaluat acuratețea de predicție a modelului matematic, eroarea medie de predicție a valorilor de albumină glicată folosind metoda Raman/SERS a fost de 1.98 mg/ml.

15

REVENDICĂRI

Metodologie de cuantificare a albuminei glicate din probe de plasmă, caracterizată prin aceea că se înregistrează spectrul Raman/SERS al proteinelor din plasmă adsorbite pe suprafața nanoparticulelor de argint.

14

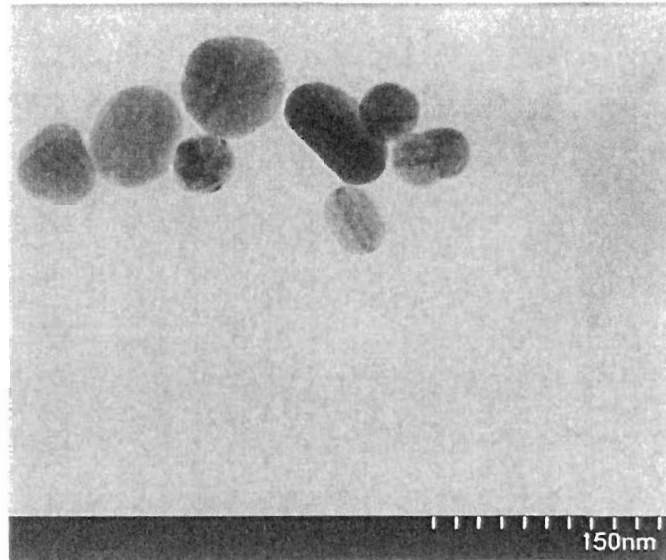


Figura 1. Imagine de microscopie electronică reprezentativă pentru nanoparticulele de argint folosite ca substrat pentru amplificarea semnalului Raman și obținerea spectrelor SERS.

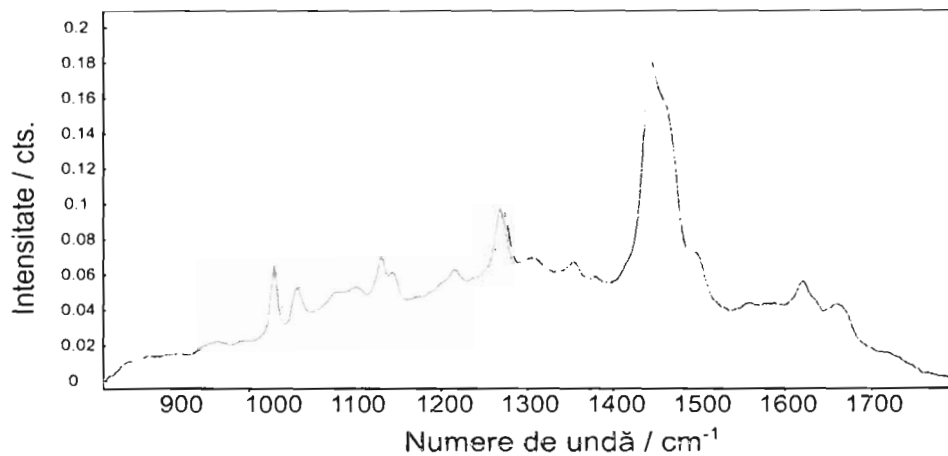


Figura 2. Spectrul SERS mediu și deviația standard pentru cele 45 de probe de plasmă, obținute în urma adsorbției proteinelor la suprafața de argint modificată cu iodură și achiziționarea spectrelor folosind spectrometrul Raman cu excitare laser la 638 nm.