

- (11) Patento numeris: **4121**
- (21) Paraiškos numeris: **95-057**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1995 06 01**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1996 12 27**
- (45) Patento paskelbimo data: **1997 03 25**
- (51) Int. Cl.⁶: **C12Q 1/00**
C12Q 1/28
G01N 33/53
A61M 35/00
- (72) Išradėjas:
Vladas-Algirdas Bumelis, LT
Algimantas Antanas Pauliukonis, LT
Henrikas Kęstutis Šebeka, LT
- (73) Patento savininkas:
Akcinė bendrovė "BIOFA", V. Graičiūno g. 8, 2028 Vilnius, LT
- (74) Patentinis patikėtinis:
Liudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Rinkinys cholesterolo vizualiniam nustatymui odos paviršiuje ir jam skirtas konjugato gavimo būdas
- (57) Referatas:

Siūlomas rinkinys cholesterolo vizualiniam nustatymui odos paviršiuje susideda iš konjugato, turinčio giminingumą epidermio cholesterolui ir ryškalo tirpalo, kur pastarasis susideda iš (mg/ml):

citrinos rūgštis	1000 - 2000
3,3',5,5'-tetrametil-4,4'-diaminodifenilo	70 - 83
vandenilio peroksido	250 - 300
dinatrio etilendiaminotetraacetato	300 - 400
dinatrio divandenilio pirofosfato	15 - 30
acetanilido	5 - 30
vandens	likusi dalis iki 1 l

Konjugatą, turintį giminingumą epidermio cholesterolui, siūloma gauti, veikiant N-vinilpirolidono ir maleino rūgšties anhidrido kopolimerą pradžioje digitoninu, po to prijungiant fermentą peroksidazę, modifikuotą glutraldehido ir 1,6-heksametilendiamino poveikiu.

Išradimas priklauso biologinės ir bioorganinės chemijos sričiai, tiksliau diagnostinėms priemonėms, skirtoms nustatymui susirgimų, kuriems būdingas cholesterino koncentracijos odos paviršiuje padidėjimas pvz., aterosklerozės.

Rinkiniai, skirti vizualiniam cholesterino nustatymui odos paviršiuje susideda iš 2 pagrindinių komponentų: konjugato, turinčio giminingumą epidermio cholesterinui ir ryškalo tirpalo. Be to, rinkinio sudėtyje būna pagalbiniai komponentai: buferinis tirpalas konjugato ištirpinimui, kitos pagalbinės medžiagos, pipetės ir pan.

Rinkiniai, skirti vizualiniam nustatymui yra labai populiarūs pastaraisiais metais. Jų privalumas - greitas, paprastas ir akivaizdus tam tikros medžiagos nustatymas.

Paprastai vizualiniam cholesterino nustatymui konjugatas yra ištirpinamas buferiniame tirpale ir gauto tirpalo lašas užlašinamas ant delno odos. Po tam tikro fiksuoto laiko (pvz., 1 min) konjugato perteklius nuplaunamas vandeniu, o surišto su delno cholesterinu konjugato kiekis įvertinamas pridėjus lašą ryškalo tirpalo pagal spalvotos dėmės susidarymą bei jos intensyvumą.

Pagrindinio rinkinio komponento - konjugato, turinčio giminingumą epidermio cholesterinui - artimiausias gavimo būdas aprašytas TSRS autoriniame liudijime SU 1675769. Šiame išradime aprašytas iš esmės panašus konjugato, turinčio giminingumą epidermio cholesterinui, gavimo būdas prijungiant prie N-vinilpirolidono ir maleino rūgšties anhidrido kopolimero

pradžioje digitoniną, po to fermentą peroksidazę. Deja, taip gautas konjugatas yra nelabai stabilus ilgai laikant.

Kito esminio rinkinio komponento - ryškalo tirpalo sudėtis žinoma, pvz., iš apžvalgos [Yu. M. Lopukhin, The Skin and Atherosclerosis, Physicochemical Aspects of Medicine, Reviews, 1992, vol. 3, part 4, psl. 46-501]. Tai yra vandeninis tirpalas, kurio sudėtyje yra N,N-dietil-p-fenillen-diamino sulfatas, vandenilio peroksidas, natrio tiosulfatas, stabilizuojantis tirpalas ir kalio bromidas.

Toks ryškalo tirpalas yra nestabilus ir gali būti panaudotas (išlieka bespalvis) tik 6-8 valandų laikotarpyje.

Minėti trūkumai žymiu mastu riboja viso rinkinio panaudojimo klinikinėje praktikoje galimybes.

Pramoninei rinkinių gamybai būtina, kad rinkiniai išlaikytų savo funkcionalines savybes pakankamai ilgą laiką (pvz., 6 mėn.), reikalingą rinkinio transportavimui, saugojimui iki panaudojimo bei panaudojimo metu. Naudojant šiame išradime pasiūlytos sudėties ryškalo tirpalą ši problema išsprendžiama.

Tikslu pagerinti komponentų ir viso rinkinio stabilumą, ryškalo tirpalu siūloma naudoti tirpalą, gaunamą tirpinant vandenyje šiuos komponentus nurodytais kiekiais (mg/l):

citrinos rūgštis	1000 - 2000
3,3', 5,5'-tetrametil-4,4'-diaminodifenilas	70 - 83
vandenilio peroksidas	250 - 300
dinatrio etilendiaminotetraacetatas	300 - 400
dinatrio divandenilio pirofosfatas	15 - 30
acetanilidas	5 - 30

Konjugatą, turintį giminingumą epidermio cholesterinui siūloma gauti, veikiant N-vinilpirolidono ir maleino rūgšties anhidrido kopolimerą pradžioje digitoninu, po to prijungiant fermentą peroksidazę, modifikuotą glutaraldehido ir 1,6-heksametilendiamino poveikiu.

Pavyzdys 1.

Rinkinys paruošiamas iš tokių komponentų:

- konjugatas t.y. N-vinilpirolidino ir maleino rūgšties anhidrido kopolimeras su prijungtais digitoninu ir peroksidaze arba modifikuota glutaraldehido ir 1,6-heksametilendiamino poveikiu peroksidaze;

- ryškalo tirpalas;

- buferinis tirpalas konjugato ištirpinimui.

Ryškalo tirpalas paruošiamas taip:

Citrinos rūgštis ištirpinama distiliuotame vandenyje, pridedama koncentruotos druskos rūgšties iki pH 2,5, ištirpinamas 3,3', 5,5'-tetrametil-4,4'-diaminodifenilas, pridedama 10%-nio natrio šarmo tirpalo iki pH 3,5 ir gautame mišinyje ištirpinama 90% viso dinatrio etilendiaminotetraacetato kiekio. Atskirai paruošiamas tirpalas, turintis vandenilio peroksida, 10% viso dinatrio etilendiaminotetraacetato kiekio, dinatrio divandenilio pirofosfatą ir acetanilidą. Abu tirpalai gerai sumaišomi. Ryškalo tirpalo sudėties įtaką jo stabilumui iliustruoja lentelė.

Konjugato su modifikuota peroksidaze peroksidazinis aktyvumas stabilizuojasi. Tai yra labai svarbu rinkinio naudojimo laikui, kadangi abiejų komponentų stabilumo terminas praktiškai susilygina.

Lentelė

Ryškalio tirpalo Nr.	Komponentų koncentracijos, mg/l						Stabilumas* mėn.
	A	B	C	D	E	F	
1	1600	83	283	344	22	13	> 6
2	2000	83	283	344	22	13	6
3	1000	83	283	344	22	13	6
4	1600	70	283	344	22	13	> 6
5	1600	83	300	344	22	13	6
6	1600	83	250	344	22	13	> 6
7	1600	83	283	400	22	13	> 6
8	1600	83	283	300	22	13	6
9	1600	83	283	344	30	13	> 6
10	1600	83	283	344	15	13	6
11	1600	83	283	344	22	30	> 6
12	1600	83	283	344	22	5	6

kur A - citrinos rūgštis

B - 3,3', 5,5'-tetrametil-4,4'-diaminodifenilas

C - vandenilio peroksidas

D - dinatrio etilendiaminotetraacetatas

E - dinatrio divandenilio pirofosfatas

F - acetanilidas

*Laikas, per kurį tirpalo spalvos intensyvumas, matuojant spektrofotometru prie 652 nm, esant kontroliniame pavyzdyje vandeniui, neviršija 0.05.

Pavyzdys 2: Konjugato gavimo būdas

200 mg peroksidazės ištirpinami 15 ml 0,2 M fosfatinio buferio, pH 7,0. Į tirpalą lašais pridedami 9,0 ml 25% glutaraldehido tirpalo. Mišinys maišomas 24 val, po to praplaunamas 6 kartus 0,2 M fosfatinio buferiu pH 7,0 ultrafiltracijos aparate. Tada į tirpalą pridedamas 1 ml 30% - nio vandeninio 1,6-heksametilendiamino tirpalo ir mišinys maišomas 24 val. Toliau reakcijos mišinys praplaunamas 8 kartus 0,2 M fosfatinio buferiu ultrafiltracijos aparate. Gautas modifikuotos peroksidazės tirpalas inkubuojamas su N-vinilpirolidono ir maleino rūgšties anhidrido kopolimeru, prie kurio prijungtas digitoninas. Gautas tokiu būdu konjugatas išlaiko daugiau 80% peroksidazinio aktyvumo saugojant 6 mėn.

Šio išradimo panaudojimas suteikia sekančius pranašumus:

1. Siūlomo ryškalo stabilumas (laikas per kurį tirpalas išlieka bespalvis) padidėja nuo 6-8 val iki 6 mėnesių, t.y. 540-720 kartų, o konjugato stabilumas (laikas per kurį išsilaiko ne mažiau 80 % peroksidazinio aktyvumo) padidėja nuo 2-3 mėn. iki 6 mėn., t.y. 2-3 kartus.

2. Konjugato peroksidazinio aktyvumo ir ryškalo tirpalo stabilizavimas pagerina rinkinio eksploatacines savybes.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Rinkiny s cholesterino vizualiniam nustatymui odos paviršiuje, susidedantis iš konjugato, turinčio giminingumą epidermio cholesterinui ir ryškalo tirpalo, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ryškalas susideda iš (mg/l):

citrinos rūgšties	1000 - 2000
3,3', 5,5'-tetrametil-4,4'-diaminodifenilo	70 - 83
vandenilio peroksido	250 - 300
dinatrio etilendiaminotetraacetato	300 - 400
dinatrio divandenilio pirofosfato	15 - 30
acetanilido	5 - 30
vandens	likusi dalis iki 1 l

2. Konjugato, turinčio giminingumą epidermio cholesterinui gavimo būdas prijungiant prie N-vinilpirolidono ir maleino rūgšties anhidrido kopolimero digitoniną ir po to peroksidazę, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad peroksidazę modifikuoja, veikiant ją glutaraldehidu ir 1,6-heksametilendiaminu.