

13  
10.04.2013

54

Федеральная служба по интеллектуальной собственности  
Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Федеральный институт промышленной собственности»  
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПОСТУПЛЕНИИ ЗАЯВКИ

14.03.2013	017101	2013111566
Дата поступления	Входящий №	Регистрационный №

2406015		18 MAR 2013
ФИПС ОТД №17		ОТД №17
(86) <input type="checkbox"/> (регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, установленные патологическим ведомством) (87) <input type="checkbox"/> (номер и дата международной публикации международной заявки)	(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ № (85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу	ВХОДЯЩИЙ №
ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Российской Федерации на изобретение		АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ (указывать почтовый адрес, если для патентных служб) 367000, РД, г. Махачкала, ул. М.Гаджиева, 43-А, ДГУ, УИС Телефон: (8 8722) 67-61-50; 68-23-26, 67-58-17 Факс: (8 8722) 67-61-50; 68-23-26 E-mail: АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ (указывается при подаче заявки на секретной и в-р-р-р-р-р-р)
(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ Способ диагностики мембран эритроцитов рыб		И Федеральную службу по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ (Указывается полное или краткое наименование (согласно учредительному документу), место жительства или место нахождения, включая название страны и почтовый адрес) Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «ДАГЕСТАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ» 367000, РД, г. Махачкала, ул. М.Гаджиева, 43-А, ДГУ		ОГРН 1020502631621 КОД страны по стандарту ВОИС ST. 3 (если он установлен) RU
Указанное лицо является <input type="checkbox"/> государственным заказчиком <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком, исполнитель работ <input type="checkbox"/> исполнителем работ по <input type="checkbox"/> государственному <input type="checkbox"/> муниципальному контракту, заказчик работ (указать наименование)		Является <input checked="" type="checkbox"/> Патентным(и) поверенным(и) <input type="checkbox"/> Иным представителем Телефон: 8 8722 67-61-50 Факс: 8 8722 67-61-50 E-mail:
(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ Указанное(ые) ниже лицо(а) назначено(назначены) заявителем(заявителями) для ведения дела по получению патента от его(их) имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам Фамилия, имя, отчество (если оно имеется) Мугутдинова Хадият Магомедтагировна, №1069, Начальник Управления интеллектуальной собственности и инновационной деятельности ДГУ, Адрес: 367000, РД, г. Махачкала, ул. М.Гаджиева, 43-А		Сроком представительства (заполняется в случае назначения иного представителя без предоставления поверенности)
		Регистрационный (с) номер (а) патентного(ых) поверенного(их) №1069

Бланк заявления ИЗ лист 1

Количество листов	36	Фамилия лица, принявшего документы Сереева Н.Н.
Количество документов, подтверждающих уплату пошлины	1	
Количество изображений	0	

## Способ диагностики мембран эритроцитов рыб

Изобретение относится к области ихтиологии, а именно к лабораторной диагностике состояния мембран эритроцитов рыб, а также диагностике различных анемий, а точнее к анализу кислотной резистентности мембран эритроцитов методом кислотных эритрограмм рыб.

Изобретение наиболее эффективно может быть использовано в токсикологических исследованиях, так как в ней отражается физиологическое состояние организма. Если у контрольных рыб наряду со зрелыми формами, встречаются единичные юные формы, то при интоксикации в прямой зависимости от степени отравления увеличивается количество кислотно-резистентных зрелых эритроцитов при снижении числа менее устойчивых к кислотному гемолизу популяций эритроидных клеток.

Известно то, что существует известный способ определения осмотической стойкости эритроцитов по Лимбеку и Рибьеру (Руководство по клиническим лабораторным исследованиям, Медгиз, 1960, стр. 96-98), при котором используют гипотонические растворы с концентрациями соли от 0,56 до 0,28%. Их разливают в ряд пробирок, затем одной и той же пипеткой от гемометра Сали в каждую пробирку приливают по 0,02 мл крови. Осторожным встряхиванием пробирки достигают равномерности взвеси крови в солевом растворе. Пробирки оставляют в штативе при комнатной температуре на 1 час, затем в течение 5 минут центрифугируют при 2000 об/мин, после чего отмечают максимальный и минимальный уровень осмотической стойкости.

Максимальный и минимальный уровень стойкости - это те концентрации соли, при которых гемолиз начался и закончился.

Уровень максимальной стойкости, то есть первые следы гемолиза определяют на глаз по легкой желтизне, а уровень минимальной стойкости

(полное разрушение эритроцитов) - по интенсивно красному цвету и полной прозрачности раствора.

Нормальные границы осмотической стойкости:

Для минимальной стойкости колебания в пределах 0,48-0,46%; для максимальной - 0,34-0,32%.

Недостатком известного способа является его неточность, связанная с тем, что: результаты учитываются через 3-4-24 часа, тогда как осмотический гемолиз эритроцитов совершается быстро, достигая своего максимума уже через 5 минут; увеличение гемолиза в отдаленные промежутки времени может произойти за счет микробного прироста и за счет поглощения углекислого газа воздуха; неточна визуальная оценка как минимального, так и максимального гемолиза.

Проведенный заявителем анализ уровня техники, включающий поиск по патентным и научно-техническим источникам информации, и выявление источников, содержащих сведения об аналогах заявленного изобретения, позволил установить, что заявитель не обнаружил аналог, характеризующийся признаками, тождественными всем существенным признакам заявленного изобретения.

Задачей настоящего изобретения является изучение кинетики кислотного гемолиза эритроцитов рыб.

Технический результат в повышении физиологического состояния организма за счет метода кислотной устойчивости эритроцитов и изучении динамики гемолитической стойкости эритроцитов и особенности функционирования системы эритрона.

Технический результат достигается созданием метода кислотных эритрограмм рыб. Метод основан на фотоэлектрической регистрации кинетики гемолиза. Скорость этого процесса чувствительна к условиям протекания реакции, поэтому для получения достоверных данных требуется степень стабилизации концентрации эритроцитов и концентрации гемолитика.

Сущность способа диагностики мембран эритроцитов рыб, включает фотоэлектрическую регистрацию кинетики гемолиза, стабилизацию концентрации эритроцитов и гемолитика, затем по кривой падения оптической плотности взвеси, рассчитывают изменения скорости процесса с заданным временным интервалом и строят эритрограмму устойчивости эритроцитарных мембран.

Для стабилизации температуры, реактивов и условий самой реакции используется фотокolorиметр. Установка оснащена датчиком времени.

Для выполнения одного анализа требуется около 4 - 5 мм<sup>3</sup> крови; таким образом, в каждом измерении участвует около 20 000 000 эритроцитов, что обеспечивает статистическую достоверность. Взятая кровь сразу разводится физиологическим раствором приблизительно 1 : 100, полученная взвесь эритроцитов может храниться до анализа в течении 3ч.

Для пояснения изобретения ниже описан пример осуществления способа.

Для того, чтобы иметь уверенность в правильности работы установки, одновременно со взятием исследуемой крови берется кровь здоровой особи. В тех случаях, когда контрольная эритрограмма дает сдвиг, выходящий за пределы точности метода из известных физиологических границ для взрослой особи, производилась проверка методики. Причиной ошибок может быть загрязнение рабочих растворов.

В результате анализа получается ряд убывающих во времени значений оптической плотности, из которых рассчитывается эритрограмма. Ход расчета поясняется табл. 1.

## Расчет эритрограммы

Время гемолиза, мин. (1 мин=60 сек)	Оптическая плотность D	Разность оптических плотностей	Эритроциты данной стойкости
0,3	0,415	0,009	2,3
0,6	0,406	0,004	1,0
0,9	0,402	0,004	1,0
1,2	0,398	0,005	1,3
1,5	0,393	0,022	5,5
1,8	0,371	0,068	17,1
2,1	0,303	0,076	19,1
Сумма	-	0,398	100,1

В первой графе таблицы представлена длительность гемолиза, отсчитываемая от момента введения гемолитика. Вторая графа заполняется значениями оптической плотности, измеренными в указанные в первой графе интервалы времени. Для заполнения третьей графы рассчитываются разности между соседними значениями оптической плотности. Полученная разность относится к предыдущему интервалу времени. Так, например, если разность  $\Delta D$  между значениями  $D$  на 120-й и 140-й сек составляет  $0,371 - 0,303 = 0,068$ , то  $\Delta D = 0,068$  относится к 120-й сек. Физиологический смысл этого расчета следующий. Оптическая плотность пропорциональна числу эритроцитов, сохраняющихся в данный момент в фотометрируемом объеме взвеси. Следовательно, разность между двумя соседними значениями оптической плотности соответствует убыли эритроцитов за время, прошедшее между измерениями, т. е. за 20 сек в стандартных условиях опыта. В нашем примере разность  $\Delta D = 0,068$  пропорциональна убыли эритроцитов, которые еще сохранились на 120-й сек действия гемолитика, но

разрушились к 140-й сек. Отсюда определяется предел их стойкости, равный 3 мин действия гемолитика, поэтому характеризующая эту группу количественная величина  $\Delta D=0,068$  относится к 120-й сек.

Расчет в абсолютных величинах оптической плотности неудобен для сопоставления результатов анализа разных образцов крови. Более удобно и привычно для клинициста представление результата в форме нормированного процентного распределения, по аналогии с лейкограммой. С этой целью подсчитывается сумма полученных в опыте значений  $\Delta D$ , которая принимается за 100. В процентах от нее рассчитываются  $\Delta D$  за каждый интервал времени, полученные величины составляют четвертую графу таблицы.

При расчете эритрограмм следует учитывать одну особенность кинетики гемолиза. Рассматривая ряд значений  $\Delta D$  в третьей графе табл. 1, можно заметить, что на первых отсчетах эта величина сравнительно велика, в течение 140-160 сек убывает, достигая минимума обычно на 160 сек в нормальной крови взрослой рыбы, а затем вновь начинает нарастать. Особенно наглядно эти особенности видны на графическом изображении эритрограммы (рис. 1).

Полученный в результате анализа ряд значений процента эритроцитов, отнесенный ко времени гемолиза, представляет собою процентное распределение эритроцитов по стойкости — эритрограмма резистентности. Ее графическое изображение представлено на рис. 1.

Поскольку эритрограммы получаются в стабилизированных условиях, они сопоставимы для разных обследуемых и различных сроков исследования.

К специальным методам исследования крови прибегают в тех случаях, когда необходимо и возможно установить диагноз на уровне изучения морфологических характеристик клеток в мазке или изменения их функциональных свойств под воздействием различных факторов. В первом случае исследования ведут с использованием цитохимических красителей,

специфически реагирующих с определенными включениями или компонентами клеток; функциональные свойства клетки определяют как ответ на физико-химические воздействия.

Для выявления характера анемии прибегают к исследованиям клеток на резистентность и специальным цитохимическим исследованиям.

Резистентность (или устойчивость) эритроцитов значительно снижается при некоторых гемолитических анемиях, обусловленных дефектом эритроцитов. Наиболее распространено в клинике исследование осмотической резистентности эритроцитов, основанное на определении максимальной и минимальной степени гемолиза эритроцитов при инкубации их в растворе с различной концентрацией хлорида натрия. При снижении резистентности эритроцитов появление гемолиза наступает при более высокой концентрации соли (0,6-0,7% раствор и даже 0,8%).

Резкое снижение устойчивости мембран эритроцитов наблюдается при микросфероцитозе, а повышенное - в случае талассемии.

Кислотная резистентность определяется на основании различной кислотоустойчивости эритроцитов, определяемой по времени наступления гемолиза. При графическом выражении кривая кислотоустойчивости имеет треугольную форму, начало гемолиза отмечается на 60-й сек, максимум приходится на 120-140-й сек, а полный гемолиз наблюдается через 200 секунд.

Под влиянием токсикантов (тяжелые металлы, пестициды, нефть) рыбы подвергаются стрессу.

Применение метода позволяет изучить реакцию системы красной крови при различных формах интоксикации, стресса и т.д. Что крайне важно при проведении различных ихтиологических, ихтиопатологических и других исследований и рыбоводных мероприятий.

# Способ диагностики мембран эритроцитов рыб

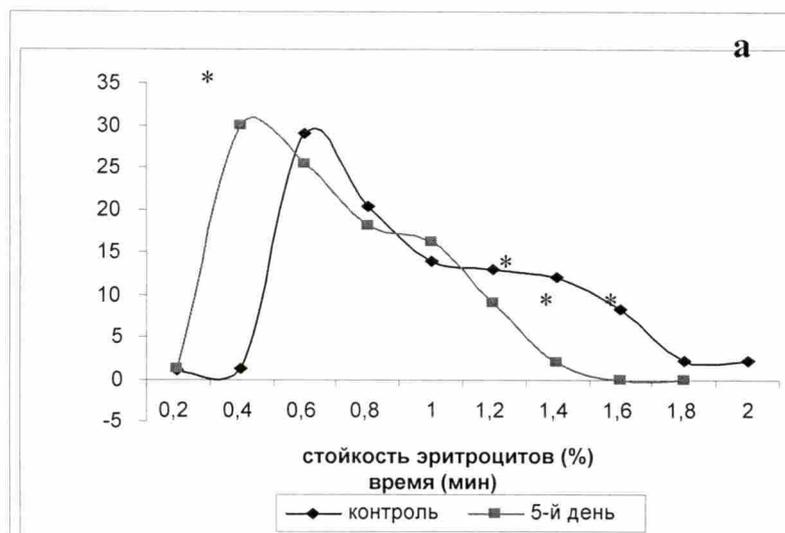


Рис. 1

## Формула изобретения

Способ диагностики мембран эритроцитов рыб, включающий фотоэлектрическую регистрацию кинетики гемолиза, стабилизацию концентрации эритроцитов и гемолитика, затем по кривой падения оптической плотности взвеси, рассчитывают изменения скорости процесса с заданным временным интервалом и строят эритрограмму устойчивости эритроцитарных мембран.

## Реферат

Изобретения относится к области ихтиологии, а именно к лабораторной диагностике состояния мембран эритроцитов рыб, а также диагностики различных анемий. А точнее к анализу кислотной резистентности мембран эритроцитов методом кислотных эритрограмм рыб.

Задачей настоящего изобретения является изучение кинетики кислотного гемолиза эритроцитов рыб.

Технический результат в повышении физиологического состояния организма за счет метода кислотной устойчивости эритроцитов и изучении динамики гемолитической стойкости эритроцитов и особенности функционирования системы эритрона.

Применение метода позволяет изучить реакцию системы красной крови при различных формах интоксикации, стресса и т.д. Что крайне важно при проведении различных ихтиологических, ихтиопатологических и других исследований и рыбоводных мероприятий.