

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(19) RU<sup>(11)</sup>

2115926<sup>(13)</sup> C1

(51) МПК<sup>6</sup> G01N33/48

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 27.09.2016 - прекратил действие  
Пошлина: учтена за 5 год с 15.06.2000 по 14.06.2001

(21), (22) Заявка: **96112034/14, 14.06.1996**

(45) Опубликовано: **20.07.1998**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **1. SU, 930049 A1 (М.В.Голованов), 15.09.76, G 01 N 1/28, A 61 B5/00. 2. Голованов М.В. Явление образования ореолов вокруг опухолевых и нормальных клеток и его биологическое значение. Автореф. дисс, к.б.н. - Киев, 1984, 21 с. 3. Клемпарская Н.Н. К вопросу о везикулоцитозе. Бюллетень эксперимент.биологии и медицины. - И.: 1977, т.84, вып.7, с.61 - 64.**

(71) Заявитель(и):

**Институт биологии Коми научного центра  
Уральского отделения РАН**

(72) Автор(ы):

**Кичигин А.И.**

(73) Патентообладатель(и):

**Институт биологии Коми научного центра  
Уральского отделения РАН**

(54) СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ОРЕОЛОБРАЗУЮЩИХ КЛЕТОК КРОВИ

(57) Реферат:

Способ может быть использован в биологии и ме- медицине, а также при оценке иммунного статуса. Кровь разводят гипертонической средой на основе хлорида натрия, в которую вводят дополнительно сахарозу. На предметное стекло наносят тонким слоем клеточную суспензию и инкубируют до 30 мин при 18-20°C. Затем препарат высушивают, фиксируют и ок- рашивают общепринятыми в гематологии методами, после чего подсчитывают под микроскопом количество ореолов и лейкоцитов, не образовавших ореолы. Получается постоянно окрашенный препарат, позволяющий провести более глубокий анализ и более рационально использовать рабочее время.

Изобретение относится к биологии и медицине, а именно к способам выявления ореолообразующих клеток, и может быть использовано при оценке иммунного статуса.

Известен способ выявления ореолообразующих клеток [1, 2], согласно которому к гепаринизированной крови или суспензии исследуемых клеток добавляют фоновые клетки (эритроциты, дрожжи) или тушь, смесь разводят гипертоническим раствором хлорида натрия (10-200 мг/мл), затем помещают в камеру Горяева или в камеру из предметного и покровного стекол, изолированных по краю вазелином, и после непродолжительной инкубации (10 мин при 18-20°C) под микроскопом подсчитывают кариоциты, вокруг которых образовались зоны, свободные от фоновых клеток или частиц туши.

Недостатком этого способа является то, что согласно ему готовится препарат, анализ которого необходимо проводить сразу после приготовления. В условиях дефицита времени это обстоятельство ограничивает количество анализируемых проб.

Задачей изобретения является разработка способа выявления ореолообразующих клеток путем приготовления постоянного окрашенного препарата, что при недостатке времени позволяет увеличить количество анализируемых проб путем приостановки анализа на одном из этапов. В этом состоит технический результат, находящийся в причинно-следственной связи с существенными признаками изобретения.

К существенным признакам изобретения относят следующие: стабилизированную кровь разводят гипертонической средой на основе хлорида натрия, в которую дополнительно введена сахароза, полученную суспензию наносят на предметное стекло, размазывают таким образом, чтобы клетки расположились в 1-2 слоя, затем помещают во влажную камеру и при температуре 18-20°C проводят инкубацию продолжительностью не более 30 мин, после чего препарат высушивают, а затем фиксируют и окрашивают общепринятыми в гематологии методами и под микроскопом подсчитывают количество ореолов и количество лейкоцитов, не образовавших ореолы.

Суть способа состоит в следующем. В капле крови, разведенной хлоридом натрия в гипертонической концентрации, некоторые лейкоциты за счет избыточного электрического заряда отталкивают эритроциты от своей поверхности. Под микроскопом они имеют вид клетки в центре свободного от эритроцитов пространства округлой формы. В литературе за этими образованиями закрепилось название "ореолы". Типичная ореолообразующая клетка - это малодифференцированная клетка с высокой функциональной активностью и часто с повышенным пролиферативным потенциалом. В экспериментах на животных увеличение количества ореолов в крови наблюдали в условиях иммунного конфликта или иммуностимуляции, так как в периферической крови способностью к ореолообразованию обладают иммуноциты с высокой функциональной активностью [2, 3]. Поэтому подсчет количества ореолообразующих клеток в крови или в органах иммунной системы является простым, быстрым и дешевым методом анализа состояния иммунитета.

Получить постоянный препарат из временного препарата, приготовленного по способу [1], невозможно: при высушивании клеточной суспензии на предметном стекле препарат разрушается образующимися кристаллами хлорида натрия, а ореолы деформируются силами поверхностного натяжения по фронту высыхающей жидкости. Поэтому способ был модифицирован путем добавления в гипертоническую среду сахарозы, которая, блокируя кристаллообразующие центры, препятствует образованию крупных кристаллов хлорида натрия, а повышая вязкость среды, препятствует разрушению ореолов силами поверхностного натяжения.

Для получения препарата кровь, стабилизированную гепарином или цитратом натрия, разводят 1:1 гипертонической средой, представляющей собой 12%-ный раствор сахарозы на 9%-ном растворе хлорида натрия. Каплю полученной суспензии переносят пипеткой на предметное стекло и размазывают до квадрата с размером сторон 1,5 см так, чтобы клетки разместились на стекле в один-два слоя без разрывов и пузырьков. Предметное стекло с клеточной суспензией помещают для инкубации во влажную камеру при температуре 18-20°C. По окончании инкубации крышку влажной камеры открывают и дают препарату высохнуть. В течение всего периода инкубации препарат следует предохранять от случайных встряхиваний. Высохший препарат фиксируют и окрашивают общепринятыми в гематологии методами. Под микроскопом подсчитывают количество ореолов и количество лейкоцитов, не образовавших ореолы.

В препарате ореол имеет вид округлой свободной от эритроцитов зоны с остатками ореолообразующей клетки. Величина ореола зависит от плотности клеточной суспензии и, по-видимому, от состояния самой ореолообразующей клетки. Сама ореолообразующая клетка разрушена. Ее остатки находятся в центре или реже с краю и имеют лучевидные тяжи, словно клетка "взорвалась". При высыхании препарата ореол может немного деформироваться, иногда

внутри "затягиваются" два-три эритроцита. Не образующие ореолов клетки имеют плотную окраску и сморщены.

Довольно часто на препарате встречаются набухшие и частично разрушившиеся клетки, вокруг которых не образовался ореол или он очень мал (диаметром не больше двух диаметров эритроцита). По-видимому, это клетки с набухшим гликокаликсом, но с низким электрическим зарядом, недостаточным для образования ореола. Их следует учитывать отдельно.

Иногда встречаются округлые свободные от эритроцитов зоны без центральной клетки, но заполненные зернистой слабоокрашенной базофильной субстанцией. На наш взгляд, эта субстанция тромбоцитарного происхождения и не имеет отношения к ореолообразующим клеткам. Необходимо отличать эти артефакты от настоящих ореолов.

Пример. Для получения препарата 0,02 мл гепаринизированной крови разводят 1: 1 гиперосмотической средой, представляющей собой 12%-ный раствор сахарозы на 9%-ном растворе хлорида натрия. Каплю полученной суспензии переносят пипеткой на предметное стекло и размазывают до квадрата с размером сторон 1,5 см так, чтобы клетки разместились на стекле в один-два слоя без разрывов и пузырьков. Предметное стекло с клеточной суспензией помещают для инкубации во влажную камеру, которая представляет собой чашку Петри со смоченным ватным тампоном. Продолжительность инкубации 30 мин, температура 18-20°C. По окончании инкубации крышку влажной камеры открывают и дают препарату высохнуть. Высохший препарат фиксируют 5 мин метанолом и окрашивают по Романовскому-Гимза. Под микроскопом при 1000-кратном увеличении просматривают 300 лейкоцитов, отмечая ореолообразующие клетки и лейкоциты, не образовавшие ореолы. Результат выражают как долю ореолообразующих клеток (в %) от общего количества лейкоцитов и, если известна концентрация лейкоцитов в крови, как количество ореолообразующих клеток в 1 мкл крови.

Для приготовления клеточной суспензии на предметном стекле требуется не более 30 с (время с момента взятия крови до начала инкубации препарата). Снятие через 30 мин крышки влажной камеры не требует много времени. Фиксацию препаратов можно провести в конце рабочего дня, а окраску и анализ - в любое удобное время. Таким образом, предлагаемый способ позволяет рационально использовать рабочее время при проведении анализов.

#### Формула изобретения

Способ выявления ореолообразующих клеток крови, включающий разведение стабилизированной крови гиперосмотической средой на основе хлорида натрия, нанесение клеточной суспензии тонким слоем на предметное стекло, ее инкубацию и подсчет ореолообразующих клеток, отличающийся тем, что в гиперосмотическую среду дополнительно вводят сахарозу, а по окончании инкубации препарат высушивают, фиксируют и окрашивают.

---

**ММ4А Досрочное прекращение действия патента Российской Федерации на изобретение из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе**

Дата прекращения действия патента: **15.06.2001**

Номер и год публикации бюллетеня: **7-2003**

Извещение опубликовано: **10.03.2003**

---