



Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования
«Крымский федеральный университет
имени В.И. Вернадского»

295007 Республика Крым, г. Симферополь,
проспект Академика Вернадского, 4

Отдел интеллектуальной собственности

Начальник отдела:
Бондаренко Даниил Владимирович
Тел. раб. +7(3652)51 08 69
Тел. моб. +7(978) 618 63 17
[E-mail:work.daniil@mail.ru](mailto:work.daniil@mail.ru)

г. Симферополь, ул. Ялтинская, 20, каб. 308

**КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ В.И. ВЕРНАДСКОГО**



*Отдел интеллектуальной
собственности*

**МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКИЕ
НАУКИ № 5**

2026 г.

Патент на изобретение № 2864143

Авторы:

**Зяблицкая Евгения Юрьевна,
Асанова Эльвина Рефатовна,
Максимова Полина Евгеньевна,
Головкин Илья Олегович,
Реган Ольга Васильевна**

Способ культивирования мононуклеаров периферической крови от пациентов с хроническим лимфолейкозом

Изобретение относится к области медицины и биотехнологии, и может быть использовано для культивирования клеток периферической крови с целью получения увеличенного числа В-лимфоцитов в стадии митоза у пациентов с хроническим лимфолейкозом.

Техническим результатом является повышение эффективности культивирования мононуклеаров периферической крови от пациентов с хроническим лимфолейкозом за счет сокращения сроков культивирования путем применения новых комбинаций дополнительных стимулирующих агентов, что позволит получать образцы биоматериалов больных хроническим лимфолейкозом с содержанием метафазных ядер В-лимфоцитов, пригодных для цитогенетического исследования и FISH-анализа. Способ осуществляют следующим образом.

В лунку пластикового планшета для определения группы крови вносят 95 мкл 5% раствора уксусной кислоты и 5 мкл крови, перемешивают пипетированием пластиковой пипеткой Пастера. Переносят 5 мкл смеси в подготовленную камеру Горяева и под микроскопом на увеличении 10х подсчитывают клеточность материала. По пропорции высчитывают объем крови, в котором будет 2×10^6 кл/мл.

Клетки крови помещают в среду для

культивирования не позднее чем через 48 часов после взятия материала в вакуумную пробирку с гепарином. До начала исследования материал транспортируют и хранят при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

Собирают среду для культивирования следующим образом: 4 мл RPMI с гентамицином, 1 мл эмбриональной сыворотки, 200 мкл L-глутамин, 200 мкл митогена CpG ODN 2006 в концентрации 1 мкМ, 200 мкл митогена TPA (12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат) в концентрации 100 нг/мл, 200 мкл человеческого IL-2 в концентрации 10 нг/мл.

Добавляют рассчитанный объем крови.

Помещают в инкубатор на 48 часов при температуре 37°C и 5% CO_2 .

Через 48 часов культивирования в среду добавляют 125 мкл коллемеда и культивируют в течение двух часов.

Полученные указанным способом В-лимфоциты используют для цитогенетического исследования, а также для исследования другими генетическими методами, например, такими как флуоресцентная гибридизация *in situ*, секвенирование методом Сенгера для определения тактики лечения и прогноза течения болезни.

Формула изобретения

Способ культивирования мононуклеаров периферической крови от пациентов с хроническим лимфолейкозом путем культивирования всего пула клеток периферической крови пациентов в течение 48 часов в CO_2 -инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в среде, содержащей 4 мл RPMI с гентамицином, 1 мл эмбриональной сыворотки, 200 мкл L-глутамин, человеческий интерлейкин IL-2, отличающийся тем, что в культуральную среду

дополнительно добавляют митоген CpG ODN 2006 в количестве 200 мкл и концентрации 1 мкМ, 200 мкл митогена TPA (12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат) в концентрации 100 нг/мл, 200 мкл человеческого интерлейкина IL-2 в концентрации 10 нг/мл, через 48 часов культивирования в среду добавляют 125 мкл коллемеда и культивируют в течение двух часов.