

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2818464

Способ создания ортотопической модели рака эндометрия

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Франциянц Елена Михайловна (RU), Шихлярова Алла Ивановна (RU), Каплиева Ирина Викторовна (RU), Бандовкина Валерия Ахтямовна (RU), Позорелова Юлия Александровна (RU), Нескубина Ирина Валерьевна (RU), Тренички Лидия Константиновна (RU), Сурикова Екатерина Игоревна (RU), Моисеенко Татьяна Ивановна (RU), Черярина Наталья Дмитриевна (RU), Котиева Виолетта Михайловна (RU), Верескунова Александра Алексеевна (RU), Меньшенина Анна Петровна (RU), Rogozin Mark Andreevich (RU), Кутилин Денис Сергеевич (RU), Ишонина Оксана Георгиевна (RU)*

Заявка № 2024103023

Приоритет изобретения 07 февраля 2024 г.

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 02 мая 2024 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 07 февраля 2044 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G09B 23/00 (2024.01); G09B 23/28 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2024103023, 07.02.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.02.2024

Дата регистрации:
02.05.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.02.2024

(45) Опубликовано: 02.05.2024 Бюл. № 13

Адрес для переписки:

344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я Линия, 63,
ФГБУ "НМИЦ Онкологии", Ишонина О.Г.

(72) Автор(ы):

Франциянц Елена Михайловна (RU),
Шихлярова Алла Ивановна (RU),
Каплиева Ирина Викторовна (RU),
Бандовкина Валерия Ахтямовна (RU),
Погорелова Юлия Александровна (RU),
Нескубина Ирина Валерьевна (RU),
Трепитаки Лидия Константиновна (RU),
Сурикова Екатерина Игоревна (RU),
Моисеенко Татьяна Ивановна (RU),
Черярина Наталья Дмитриевна (RU),
Котиева Виолетта Михайловна (RU),
Верескунова Александра Алексеевна (RU),
Меньшенина Анна Петровна (RU),
Рогозин Марк Андреевич (RU),
Кутилин Денис Сергеевич (RU),
Ишонина Оксана Георгиевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение " Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2750127 C1, 22.06.2021. RU
2743960 C1, 01.03.2021. КЕЦА О.В. и др. Роль
митохондриальной NO-синтазы в реализации
противоопухолевых эффектов
полиненасыщенных жирных кислот на модели
карциномы Герена в условиях in vivo /
ВОПРОСЫ ОНКОЛОГИИ, 2018, т. 64, N 1,
стр. 138-143. NYEN T.V. et al. Modeling
Endometrial Cancer: Past, Present, and Future /
(см. прод.)

(54) Способ создания ортотопической модели рака эндометрия

(57) Реферат:

Изобретение относится к онкологии, а именно
к экспериментальной онкологии, и может быть
использовано для создания ортотопической

модели рака эндометрия у самок белых
беспородных крыс. Крысам-самкам в просвет
правого маточного рога с помощью

внутривенного катетера с инъекционным портом 22G 0,9×25 мм вводят 0,5 мл опухолевой взвеси карциномы Герена, содержащей $2,5-3,5 \times 10^6$ клеток. Изобретение позволяет воспроизвести модель рака эндометрия в условиях эксперимента

путем ортотопической трансплантации карциномы Герена, что позволит изучать патогенез злокачественного процесса и влияние на него любой коморбидной патологии, а также проводить поиск мишеней для таргетной терапии. 8 ил.

(56) (продолжение):

Int. J. Mol. Sci., 2018, 19, 2348, 18 pages. Alyssa M. FEDORKO A.M. et al. An immune competent orthotopic model of endometrial cancer with metastasis / Heliyon, 2020, 6, e04075, pages 1-11.

RU 2818464 C1

RU 2818464 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G09B 23/00 (2024.01); G09B 23/28 (2024.01)(21)(22) Application: **2024103023, 07.02.2024**(24) Effective date for property rights:
07.02.2024Registration date:
02.05.2024

Priority:

(22) Date of filing: **07.02.2024**(45) Date of publication: **02.05.2024** Bull. № 13

Mail address:

**344037, g. Rostov-na-Donu, ul. 14-ya Liniya, 63,
FGBU "NMITS Onkologii", Ishonina O.G.**

(72) Inventor(s):

**Frantsiiants Elena Mikhailovna (RU),
Shikhliarova Alla Ivanovna (RU),
Kaplieva Irina Viktorovna (RU),
Bandovkina Valeriia Akhtiamovna (RU),
Pogorelova Iuliia Aleksandrovna (RU),
Neskubina Irina Valerevna (RU),
Trepitaki Lidiia Konstantinovna (RU),
Surikova Ekaterina Igorevna (RU),
Moiseenko Tatiana Ivanovna (RU),
Cheriarina Natalia Dmitrievna (RU),
Kotieva Violetta Mikhailovna (RU),
Vereskunova Aleksandra Alekseevna (RU),
Menshenina Anna Petrovna (RU),
Rogozin Mark Andreevich (RU),
Kutulin Denis Sergeevich (RU),
Ishonina Oksana Georgievna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
uchrezhdenie «Natsionalnyi meditsinskii
issledovatel'skii tsentr onkologii» Ministerstva
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)**

(54) **METHOD FOR CREATING ORTHOTOPIC ENDOMETRIAL CANCER MODEL**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to oncology, namely to experimental oncology, and can be used to create an orthotopic model of endometrial cancer in female white outbred rats. Female rats into the lumen of the right uterine horn using an intravenous catheter with injection port 22G 0.9×25 mm, 0.5 ml of a tumour suspension of Guerin's carcinoma containing

2.5–3.5×10⁶ cells.

EFFECT: invention enables to reproduce a model of endometrial cancer in an experiment by orthotopic transplantation of Guerin's carcinoma, which will allow studying the pathogenesis of the malignant process and the effect of any comorbid pathology on it, as well as searching for targets for targeted therapy.

1 cl, 8 dwg

Изобретение относится к онкологии, а именно к экспериментальной онкологии, и может быть использовано для создания ортотопической модели карциномы Герена у самок белых беспородных крыс.

Рак эндометрия (РЭ) является вторым по частоте гинекологическим раком во всем мире, сразу после рака шейки матки, и шестым по частоте среди всех типов злокачественных новообразований у женщин (см. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of worldwide incidence and mortality from 36 cancers in 185 countries. *C.A. Cancer J. Clin.* 2021; 71:209-249. doi: 10.3322/caac.21660). Основные ассоциации специалистов по гинекологическим опухолям: ESGO (Европейское общество гинекологической онкологии), ESTRO (Европейское общество лучевой терапии и онкологии) и ESP (Европейское общество патологии) разработали обновленное руководство по классификации РЭ, которое объединяет клинические и молекулярные параметры для оценки риска возникновения рецидива (см. Konkin N., H. Matias-Guyou, I. Vergot, D. Tsybula, M. R. Mirza, S. Marnitz, J. Ledermann, T. Bosse, K. Chargary, A. Fagotti, et al. ESGO Recommendations / ESTRO / ESP for the management of patients with endometrial carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2021;31:12-39. doi: 10.1136/ijgc-2020-002230).

Среди различных клинических классификаций, опухоли оцениваются по следующим параметрам: по гистологическому типу (эндометриоидные и неэндометриоидные), степени дифференцировки опухоли (от низкой до высокой), стадии Международной федерации гинекологии и акушерства (FIGO), инвазии миометрия, инфильтрации лимфатических узлов и остаточной опухоли. Несмотря на успехи в лечении женщин с гинекологическими опухолями, достигнутыми за последние несколько лет, женщины с высоким риском рецидива, который может возникать после терапии первой линии, по-прежнему имеют ограниченные возможности лечения (см. Neri M, Peiretti M, Melis GB, Piras B, Vallerino V, Paoletti AM, Madeddu S, Scartozzi M, Mais V. Systemic therapy for the treatment of endometrial cancer. Expert opinion. *Pharmacother.* 2019;20:2019-2032. doi: 10.1080 / 14656566.2019.1654996).

Таким образом, доклинические методические приемы, такие как экспериментальные модели, могут улучшить понимание развития заболеваний высокого риска и дать оценку новых противоопухолевых методов лечения в доклинических исследованиях, в том числе и для лечения РЭ.

В течение многих лет использование клеточных линий злокачественных опухолей были наиболее осуществимым подходом, используемым при разработке лекарственных препаратов, однако методы *in vitro* не отражают всю сложность живого организма (см. Daniel V.S., Marchionny L., Hierman J.S., Rhodes J.T., Devereaux W.L., Rudin K.M., Jung R., Parmigiani G., Dorsch M., Peacock K. .D. et al. The primary small cell lung cancer xenograft model reveals irreversible changes in gene expression induced by *in vitro* culture. *Cancer Res.* 2009;69:3364-3373. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-08-4210). Модели злокачественных опухолей, полученные от пациента, такие как 3D-сфероиды / органоиды и модели ксенотрансплантата, полученные от пациента (PDX), стали наиболее оптимальными в преодолении предыдущих ограничений (см. Tentler J.J., Tan A.K., Weeks K.D., Himeno A., Leong S., Pitts T.M., Arcaroli J.J., Messersmith V.A., Eckhardt S.G. . Tumor xenografts obtained from patients as models for the development of oncological drugs. *Nat. Rev. Clin. oncol.* 2012;9:338-350. doi: 10.1038/nrclinonc.2012.61.).

PDX модели обеспечивают множество преимуществ, а именно: сохранение экспрессии генов и мутационного статуса, сохранение архитектуры ткани за счет сохранения молекулярных и гистологических особенностей опухоли, а также возможность создания

“идентичной” когорты мышей с опухолями, которая может быть использована для разработки доклинических исследований для тестирования и прогнозирования специфического ответа пациента на противоопухолевые препараты (см. Izumchenko E., Paz K., Zhiznadia D., Sloma I., Katz A., Vasquez-Dandel D., Ben-Zvi I., Stebbing J., McGuire W., Harris W. et al. Xenografts, obtained from patients effectively capture the response to oncological therapy in a heterogeneous cohort of patients with solid tumors. *Ann. oncol.* 2017; 28:2595-2605. doi:10.1093/annonc/mdx416.; см. Moyola S.P., Lopez-Gil S., Cabrera S., Garcia A., Van Nien T., Annibali D., Fonnes T., Vidal A., Villanueva A., Matias-Guyu H. et al. Patient-derived xenograft models for endometrial cancer research. *Int. J. Mol. sci.* 2018;19:2431. doi: 10.3390 / ijms19082431.). Несмотря на ряд преимуществ, тем не менее, они также имеют некоторые недостатки, которые препятствуют их потенциальному превращению в модель, соответствующую выше упомянутым целям (например, длительное время, необходимое для их разработки, постепенная потеря микроокружения опухоли человека, отсутствие компетентной иммунной системы хозяина и возможность накопления случайных мутаций, отличных от исходных у пациента (см. Guerin M. V., Finisguerra V., Van den Einde B. J., Bercovici N., Trautman A. Preclinical mouse tumor models: a structural and functional perspective. *eLife.* 2020;9: e50740. doi:10.7554/eLife.50740.). Учитывая известные преимущества и недостатки PDX моделей в качестве доклинических, очевидно, что все еще не хватает тщательной оценки того, насколько точно модели PDX представляют и коррелируют с заболеванием пациента, чтобы считать их точным инструментом для разработки персонализированной медицины.

Экспериментальная онкология - важное направление онкологии, позволяющее изучать многие патогенетические аспекты злокачественного роста, которые, в силу известных причин, невозможно исследовать в клинике. Базисом экспериментальной онкологии является создание различных экспериментальных моделей злокачественного процесса на животных. Объектом изучения в эксперименте, как правило, являются грызуны - крысы и мыши, на которых перевивают различные штаммы опухолей.

Экспериментальная онкология (греч. *onkos* масса, опухоль + *logos* учение; лат. *experimentum* проба, опыт) - раздел онкологии, занимающийся изучением опухолей в условиях эксперимента, что позволяет всесторонне изучить процесс возникновения и развития опухоли, создать разнообразные экспериментальные опухоли, являющиеся моделями для изучения опухолей человека. Задачами экспериментальной онкологии являются изучение развития опухолевого процесса и модифицирующих его факторов, что способствует улучшению диагностики, лечения и профилактики опухолей человека. Использование различных экспериментальных опухолей позволяет разрабатывать методы лечения новообразований и испытывать новые противоопухолевые средства.

За последние два десятилетия экспериментальные модели сыграли жизненно важную роль в продвижении понимания патогенетических основ канцерогенеза. В современную экспериментальную медицину внедряются новые технологии, продвинувшие наше понимание генеза, прогрессирования и метастазирования опухолей. Несколько основных направлений остаются недооцененными и недостаточно изученными.

Линейные животные широко используются в экспериментальной практике, во многих областях биологии и медицины. Результаты исследований, выполненных на линейных животных, являются сопоставимыми и могут быть повторно воспроизведены в любое отдаленное время и в другом научном центре.

Выбор животного определяется видовой принадлежностью клеточного материала. Для исследования туморогенности клеточных линий и биопрепаратов, полученных на их основе от грызунов, можно использовать здоровых сингенных животных. Для

исследования всех остальных опухолей, рекомендуется использовать иммунодефицитных животных. Наиболее предпочтительными моделями являются стандартные сертифицированные животные с генетически обусловленным иммунодефицитом - бестимусные мыши (голые мыши, Nude). Эти животные являются носителями аутосомно-рецессивной мутации, которая в гомозиготном состоянии приводит к отсутствию внутриутробной закладки тимуса и волосяных луковиц, в результате чего они дефицитны по Т-лимфоцитам и лишены шерстного покрова. Используются как новорожденные, так и взрослые гомозиготные особи (Nu/Nu).

Перевиваемые опухоли имеют ряд значительных преимуществ перед спонтанными и индуцированными. Прежде всего, они делают возможной постановку массовых экспериментов, так как легко и быстро могут быть получены в большом количестве. Другим преимуществом штаммов перевиваемых опухолей является относительное постоянство их строения и биологических свойств.

На данный момент многообразие моделей экспериментальной онкологии предлагает к воспроизведению спонтанные и индуцированные перевиваемые опухоли с помощью гомотрансплантации (аутоотрансплантация, сингенная) гетеротрансплантации (алло- и ксенотрансплантация) различными способами (см. Побяржин В.В., Пашинская Е.С., Семенов В.М., Гончаров А.Е. Методологические аспекты постановки онкологических моделей в условиях эксперимента. Вестник ВГМУ. 2018;17(6):32-45).

При изучении механизмов канцерогенеза важно подобрать соответствующую модель. Для исследования онкогенеза на сегодняшний день наиболее часто используют мышинные и крысиные модели. Мышь как модель имеет ряд преимуществ по сравнению с другими млекопитающими: финансово выгодное содержание, короткий репродуктивный цикл, возможность использования методов генной инженерии. Вместе с тем, моделирование на крысах имеет более широкое применение. Среди солидных опухолей у крыс в эксперименте наиболее часто используют саркомы и аденокарциномы. Штамм саркомы 45 получен в 1947 г. в лаборатории проф. Л. А. Зильбера в результате прививки фибросаркомы, возникшей у крысы в подкожной клетчатке после введения 9,10-диметил-1,2-бензантрацена. По своему морфологическому строению саркома 45 представляет собой веретенноклеточную злокачественную опухоль, состоящую из фибробластов. В опухоли много митозов. Саркома прививается на беспородных крыс почти в 100%. Средняя продолжительность жизни животных - 25-35 дней. При стандартной подкожной перевивке крысам любого пола опухоль растёт в виде солитарного округлого узла и не метастазирует (см. Эмануэль Н.М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов, М., Наука. 1975:415; Двадненко К.В., Гусев С.А., Федоренко Г.М., Матишов Д.Г. Ультроструктурные аспекты биологии злокачественного роста саркомы 45. Сибирский онкологический журнал, 2011, 43(1): 25-28).

Наряду с саркомами, востребованной в экспериментальной онкологии опухолью, поддерживаемой на крысах, является карцинома Герена. Опухоль выделена из матки беспородной белой крысы в 1934 г. П. Герен и М. Герен. В настоящее время по гистологическому строению - малодифференцированный рак, редко образующий железистоподобные структуры. Прививаемость опухоли колеблется от 50 до 90%, составляя в среднем, по данным Е. Е. Погосянц, 75%. Спонтанное рассасывание не наблюдается. Средняя продолжительность жизни - 30-40 дней (см. Ларионов Л.Ф. Химиотерапия злокачественных опухолей. М.:Медгиз, 1962 г.).

В подкожной клетчатке опухоль Герена растет в виде мягких узлов, отграниченных очень тонкой соединительнотканной капсулой. Характерным для карциномы Герена является расположение клеток в виде мелких ячеек и коротких тяжей, разделенных

тонкими, но хорошо выраженными прослойками соединительной ткани. Образования истинных железистых структур не отмечается, на отдельных участках встречаются псевдожелезистые структуры. Регистрируется много патологических митозов. Наряду с обширными полями некроза наблюдаются многочисленные участки некробиоза (пикноз ядер, кариорексис, кариолизис и т. д.). Карцинома Герена по своим биологическим свойствам и морфологии в значительной мере сохранила свой эпителиальный характер, чем такие перевиваемые опухоли эпителиального происхождения, как опухоль Эрлиха, Броуна-Пирса и др. (см. Модели и методы экспериментальной онкологии. Под ред. А. Д. Тимофеевского. «Медгиз», М., 1960; см. Черкашина Д.В., Лебединский А.С., Петренко Ю.А., Штеменко Н.И., Петренко А.Ю. Торможение роста карциномы Герена у крыс после ведения мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека и биорегуляторов стволовых и прогениторных клеток. Журн. АМН України. 2010;16(3):492-506).

Известны различные модификации использования экспериментальных опухолей, так описан способ воспроизведения злокачественного процесса в эксперименте путем перевивки злокачественной опухоли в селезенку белых беспородных крыс (см. Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Евстратова О.Ф. Способ получения метастазов печени в эксперименте. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014;157(6):745-747).

Известен способ для получения злокачественной опухоли, растущей в ткани легкого (см. патент на изобретение RU 2388064 C1, опубл. 24.04.2010 г., Бюл. № 12). Взвесь опухолевых клеток перед введением разводят стерильным физиологическим раствором 1:5 по объему и набирают в стерильный шприц. Самцам белых беспородных крыс, после фиксации их на спине, вводят опухолевую взвесь в подключичную вену в дозе 0,5 мл. На 14-21 сутки от момента перевивки саркомы C-45 у самцов развивается визуализируемая опухоль, которую можно извлечь и перевить. По мнению авторов, этот способ должен обеспечивать 100% воспроизводимость, приводя к перевивке опухолевых трансплантатов во всех случаях, что, в свою очередь, даст возможность постановки массовых экспериментов за относительно короткий срок и в большом количестве при простоте исполнения.

Известен способ для получения злокачественной опухоли, растущей в ткани легкого путем введения самцам белых беспородных крыс в подключичную вену бензпирена в дозе 0,5 мл. Опухоль развивается через 4-4,5 месяца. На этой модели удобно изучать патогенез злокачественного роста. Модель дает возможность постановки массовых экспериментов при простоте исполнения (см. патент на изобретение RU 2375758 C1, опубл. 10.12.2009, Бюл. № 34).

Для изучения рака эндометрия доступны пять основных классов экспериментальных моделей: модели спонтанного онкогенеза эндометрия у инбредных животных (крысы Dongyu, крысы DA / Nan, крысы BDII / Nan), инокуляционные опухоли из фрагментов опухолей (эндоопухоль крысы, опухоль EnCa 101 человека) или из инокулированных линий опухолевых клеток (клетки RUCa-I крысы, клетки Ишикавы и ECC-1 человека), эстрогенное влияние или воздействие химического канцерогена на мышей CD-1 и ICR, трансгенные подходы при использовании мышей гетерозиготных по гену-супрессору опухоли PTEN (pten (+/-)-мышь) и линий опухолевых клеток эндометрия, культивируемых в соответствующих условиях подобным условиям *in vivo*, например, культура клеток на восстановленной базальной мембране. Известно, что ортотопические модели лучше моделируют клинический рак, особенно в отношении микроокружения опухоли, по сравнению с подкожными моделями (см. Zhang W., Fan W., Rachagani S., Zhou Z., Lele

S.M., Batra S.K., Garrison J.C. Comparative Study of Subcutaneous and Orthotopic Mouse Models of Prostate Cancer: Vascular Perfusion, Vascular Density, Hypoxic Load, and Effectiveness of BB2r Targeting. *sci. Rep.* 2019;9:11117. doi: 10.1038 / s41598-019-47308-zet.). Хотя количество моделей сравнительно невелико, большинство аспектов, связанных с функциями эстрогенных или гестагенных веществ, поддаются оценке, особенно если комбинировать различные экспериментальные модели (см. Vollmer G. Endometrial cancer: experimental models useful for studying the molecular aspects of endometrial cancer and carcinogenesis. *Cancer associated with the endometrium.* 2003 Mar;10(1):23-42. doi: 10.1677/erc.0.0100023.).

В результате модели, основанные на использовании клеток аденокарциномы эндометрия человека, широко применяются, в то же время свойства и преимущества моделей животного происхождения до сих пор в основном игнорировались.

Техническим результатом настоящего изобретения является разработка способа, позволяющего создавать ортотопическую модель карциномы Герена у самок белых беспородных крыс.

Технический результат достигается тем, что крысам-самкам в просвет правого маточного рога с помощью внутривенного катетера с инъекционным портом 22G: 0,9 x 25 mm вводят 0,5 мл опухолевой взвеси карциномы Герена, содержащей $2,5-3,5 \times 10^6$ клеток.

Изобретение «Способ создания ортотопической модели рака эндометрия» является новым, так как оно неизвестно в области экспериментальных исследований в онкологии о развитии трансплантированной карциномы Герена в матке самок крыс.

Новизна изобретения заключается в том, что крысам-самкам в просвет правого маточного рога с помощью внутривенного катетера с инъекционным портом 22G 0,9 x 25 mm вводят 0,5 мл опухолевой взвеси карциномы Герена, содержащей $2,5-3,5 \times 10^6$ клеток.

Изобретение «Способ создания ортотопической модели рака эндометрия» является промышленно применимым, так как может быть использовано в научно-исследовательских учреждениях онкологического профиля для воспроизведения экспериментальной модели роста злокачественной опухоли в матке, как модели рака эндометрия, изучение ее роста, особенностей метастазирования.

Для лучшего понимания способа приводим фигуры.

Фиг. 1. Увеличение живота животного.

Фиг. 2. Геморрагический выпот в брюшной полости животного.

Фиг. 3. Матка с опухолью, на брыжейке определяются пораженные опухолевыми отсевами участки - лимфоузлы.

Фиг. 4. а), б) - опухолевое поражение печени.

Фиг. 5. Фрагмент перевитой под кожу карциномы Герена с высокой плотностью клеточного роста, участками кровоизлияния и некротических изменений. Окр. гематокс.-зоз., ув.об.х10.

Фиг. 6. Фрагменты перевитой под кожу карциномы Герена: а) - в) - конгломерации клеток неправильной овоидной формы с наличием множества вакуолей и цитоплазматических тяжей, укрепляющих стромальную основу; г) полиморфный тип ядер с многочисленными глыбками, фигурами патологического митоза и участками дегенерации. Окр. гематоксилин-эозином. Ув. об. х 40.

Фиг. 7. Фрагмент правого рога матки крысы после трансплантации клеточной взвеси карциномы Герена: а), б) - воспалительные и некротические поля со значительными участками нейтрофильной инфильтрации; в) демаркационная зона с опухолевой тканью; г)-е) - плотный рост опухолевых клеток с типичной для карциномы Герена структурой.

Окр. Гематоксилин-эозином, ув.об. х 5, х10, х40.

Фиг. 8. Фрагмент правого рога матки крысы после трансплантации клеточной взвеси карциномы Герена: а) - плотное расположение опухолевых клеток с доминирующей овоидной формой ядер с глыбчатой формой хроматина, скопления клеток в форме псевдожелезистых структур; б) - участки с выраженными отростками цитоплазмы, значительное число фигур патологического митоза. Окр. гематоксилин - эозином. Ув. об. х40.

Способ создания ортотопической модели рака эндометрия выполняется следующим образом.

Подготовка карциномы Герена к перевивке. Инструменты, посуду, руки дезинфицируют обычным способом. Помощник декапitiрует животное (самца белых беспородных крыс с растущей под кожей карциномой Герена), обрабатывает кожу над опухолью 70% спиртом. Отступив от опухоли 1 - 2 см экспериментатор отсепаровывает кожу и отгибает её таким образом, чтобы шерсть не попала внутрь. Подкожный опухолевый узел карциномы Герена выделяют, промывают стерильным физиологическим раствором и разрезают вдоль. Вырезают кусочки жизнеспособной ткани, имеющей серовато-розовый цвет, и переносят в стерильную чашку Петри, после чего иссекают оставшиеся мелкие участки некроза, прослойки соединительной ткани, сгустки крови, наличие которых ухудшает условия последующего приживания; кусочки ополаскивают стерильным физиологическим раствором. Опухолевую ткань измельчают механическим гомогенизатором и разводят стерильным физиологическим раствором. Для перевивки используют 0,5 млн. опухолевых клеток в 0,5 мл физиологического раствора.

Трансплантация карциномы Герена в матку самок крыс. Анестезию проводили стандартно ксилазин-зоветиловым наркозом. Ксиланит (ЗАО «НИТА-ФАРМ, Россия, г. Саратов) вводили внутримышечно 0,1 мл/100г веса животного. Далее через 10-15 минут вводили золетил («Virbac» Франция) в дозе 5мг/100г веса животного. Через 1-2 минуты пропадал рефлекс переворачивания, максимальный эффект достигался через 5-7 минут после инъекции. Наркоз верифицировали по исчезновению реакции на болевые раздражители (укол лапы) и угнетению роговичного рефлекса.

В качестве объекта оперативного вмешательства выступали нелинейные белые лабораторные крысы, общим числом 15, массой 250 ± 25 гр.

Белым беспородным крысам-самкам в условиях наркоза в асептических условиях (удаление шерсти и двукратная обработка дезинфицирующим раствором операционного поля) скальпелем проводится срединная лапаротомия. Длина разреза 2 см. Мочевой пузырь, как правило, наполненный, выводится в рану и отклоняется кпереди. Осторожно потягивая за дольки сальника, в рану выводятся маточные рога. Правый маточный рог фиксируется мягким пинцетом. В просвет правого маточного рога с помощью внутривенного катетера с инъекционным портом 22G (0,9 x 25 mm) вводят 0,5 мл

опухолевой взвеси, т.е. вводится $2,5-3,5 \times 10^6$ клеток. Рог матки перевязывают кетгутом для предотвращения излития взвеси в брюшную полость. После этого рана трижды обрабатывается антисептическим раствором (фурацилин 1:5000). Матка с ее рогами, мочевой пузырь, доли сальника возвращаются в брюшную полость. Кетгутом 4/0 на атравматической игле тремя одиночными узловыми швами ушивается дефект брюшины. Таким же способом ушивается кожа, операционная рана обрабатывается 2% раствором H_2O_2 . Повязка на рану не накладывается в связи со сложностью ее фиксации и низким риском нагноения раны.

Наблюдение за развитием опухолевого процесса проводилось в течение 21 суток.

После умерщвления животных под эфирным наркозом по стандартной методике были изготовлены срединные продольные гистологические срезы с опухолевого узла, толщиной 5-7 мкм, окрашенные гематоксилин-эозином и по Ван-Гизон.

Результаты. Указанным образом было прооперировано 15 самок крыс.

5 Через 10 суток с момента прививки 3 животных были подвергнуты эвтаназии для контроля роста саркомы. В этот срок макроскопически определяется опухолевый узел в области соединения тела и правого рога матки крыс, его размеры составляют $25,5 \pm 2,3$ мм.

10 Через 21 суток у оставшихся животных диагностировано увеличение живота в объеме (см. Фиг. 1). Животные были подвергнуты эвтаназии. При вскрытии: в брюшной полости определялось небольшое количество геморрагического выпота (см. Фиг. 2). Макроскопически матка была представлена опухолевым узлом. На брыжейке определялись пораженные опухолевыми отсевами участки - лимфоузлы (см. Фиг. 3), опухолевое поражение печени (ми. Фиг. 4а, б).

15 Микроскопическое исследование гистологических препаратов опухоли. Морфологический контроль клеточной структуры карциномы Герена при подкожной перевивке, как традиционно используемой модели опухолевого роста для решения задач экспериментальной онкологии, выявил образование низкодифференцированной солидной опухоли с высокой плотностью клеточной популяции с незначительными участками кровоизлияния и некроза и отсутствием железистой структуры (см. Фиг. 5).

20 Световая микроскопия клеточной структуры с разрешением объектива $\times 100$ позволила выявить характерные для карциномы Герена признаки клеточной структуры: расположение клеток в виде мелких хаотичных ячеек или коротких тяжей, разделенных тонкими, но хорошо выраженными прослойками соединительной ткани, без образования каких-либо железистых структур или их подобия. Цитоплазма клеток умеренно развита с четкими контурами, а при тесном соприкосновении клеток, образующая конгломерации с наличием множества вакуолей и цитоплазматических перемычек - тяжей, укрепляющих стромальную основу (см. Фиг. 6 а-г).

Как видно из Фиг. 6 а-г, цитоплазматическо-ядерное соотношение приближается к 30 1:1 за счет развитой цитоплазмы и достаточно крупного ядра. При этом, по виду ядра клеток доминирует овоидная форма, однако нередко встречаются ядра округлой, пластинчатой и даже веретеновидной форм, что в целом может характеризовать полиморфный тип ядер. Отмечено множество фигур патологического митоза, что указывает на высокую пролиферативную активность клеток. Наблюдаются и 35 многочисленные участки дегенерации ядер: пикноз, кариорексис, кариолизис, характеризующие некробиоз клеток. В целом, рост карциномы Герена в подкожной клетчатке по морфологическим признакам сохраняет свой эпителиальный характер с полной утратой железистых структур, даже в рудиментарной форме, напоминающей о маточном генезе опухоли у крыс.

40 Морфологические исследования, проведенные после трансплантации в правый рог матки белых беспородных крыс фрагмента карциномы Герена с целью создания ортотопической модели рака эндометрия, выявили следующую картину (см. Фиг. 7). На срезе рога матки видны обширные поля тотальной нейтрофильной инфильтрации, значительное сужение просвета рога матки с крупноочаговым поражением призматического эпителия сосочковых структур (см. Фиг. 7 а-б). При большем 45 увеличении отчетливо проявляется демаркационная зона между некротизированной и опухолевой тканью с атипичными клетками (см. Фиг. 7 в).

Как видно (см. Фиг. 7 г-е), расположение клеток в виде мелких хаотичных ячеек или

коротких тяжей, вплотную подходящих к реснитчатому эпителию.

Гистологические особенности опухолевых клеток характеризуются типичной для карциномы Герена картиной, что продемонстрировано на Фиг. 8. Прежде всего, сохраняется цитоплазматическо-ядерное соотношение и цитоплазматические отростчатые соединения, соединяющие опухолевую конгломерацию. Доминирующей формой ядра остается неправильная овоидная, хотя сохраняются вариации вытянутой или лопастной формы.

Особое внимание обращает повторяемость глыбчатой хроматиновой структуры, а также наличие ядер на разных стадиях патологического митоза, что сопоставимо с характерной для карциномы Герена высокой пролиферативной активностью.

Вместе с тем, структуры аденокарциномы Герена, перевитой в рог матки, имели тенденцию рудиментарного расположения клеток (см. Фиг.7 е, Фиг. 8 а, б) в виде закрученных сосочкоподобных конгломераций, отдаленно напоминающих железистую ткань, т.е. отдаленных морфологических признаков изначального генеза опухоли в матке крыс.

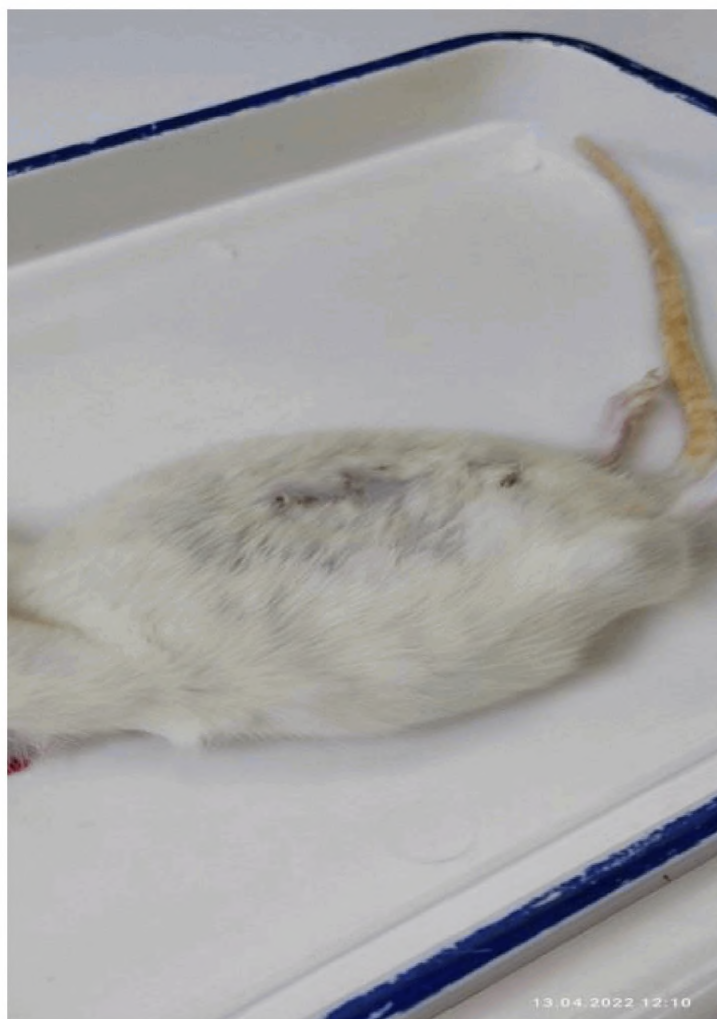
Подобные рудименты могут служить косвенным подтверждением не только онкотропного влияния «исторической платформы» развития карциномы Герена, но и самой возможности реализации новой ортотопической модели рака эндометрия.

Технико-экономическая эффективность способа создания ортотопической модели рака эндометрия заключается в том, что воспроизведение модели в условиях эксперимента путем ортотопической трансплантации карциномы Герена изменяет ее злокачественный потенциал. Это дает возможность изучать патогенез злокачественного процесса и влияния на него любой коморбидной патологии, а также проводить поиск мишеней для таргетной терапии. Способ экономичен, доступен для исполнения.

(57) Формула изобретения

Способ создания ортотопической модели рака эндометрия, заключающийся в том, что крысам-самкам в просвет правого маточного рога с помощью внутривенного катетера с инъекционным портом 22G 0,9×25 mm вводят 0,5 мл опухолевой взвеси карциномы Герена, содержащей $2,5-3,5 \times 10^6$ клеток.

1

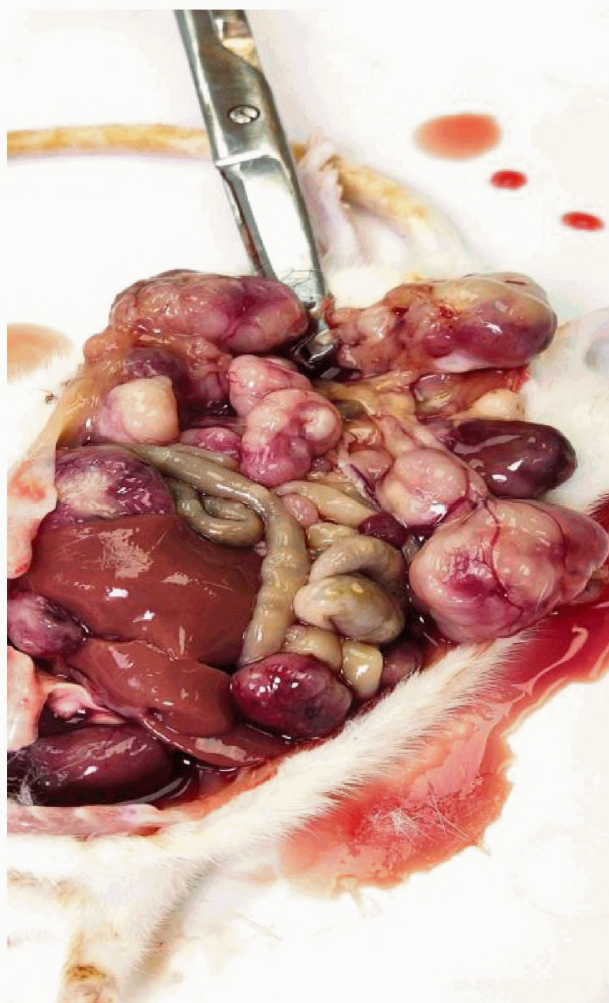


Фиг. 1

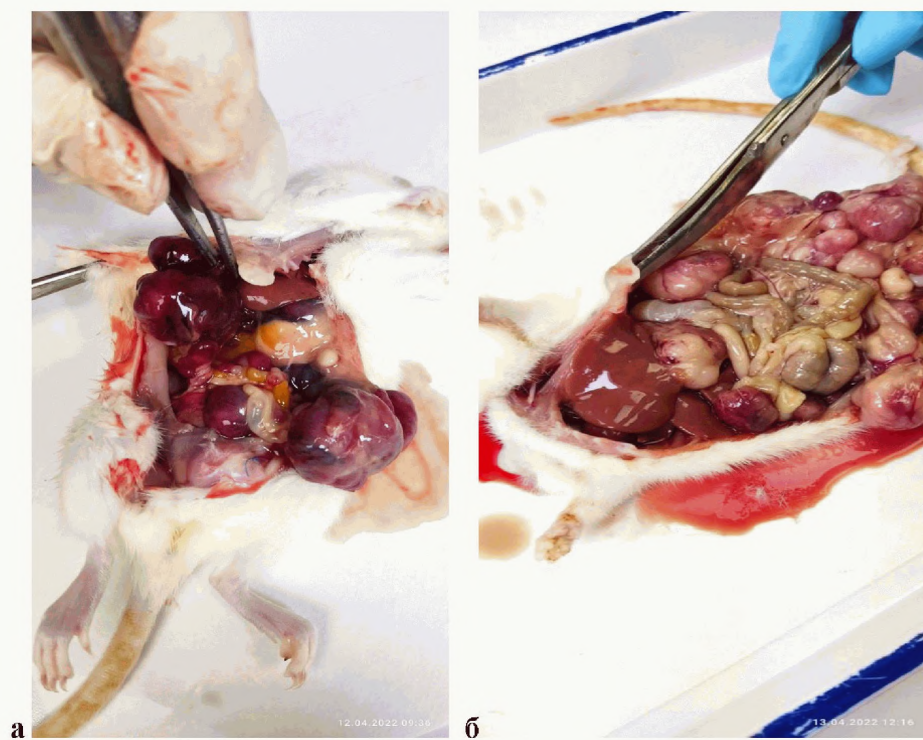
2



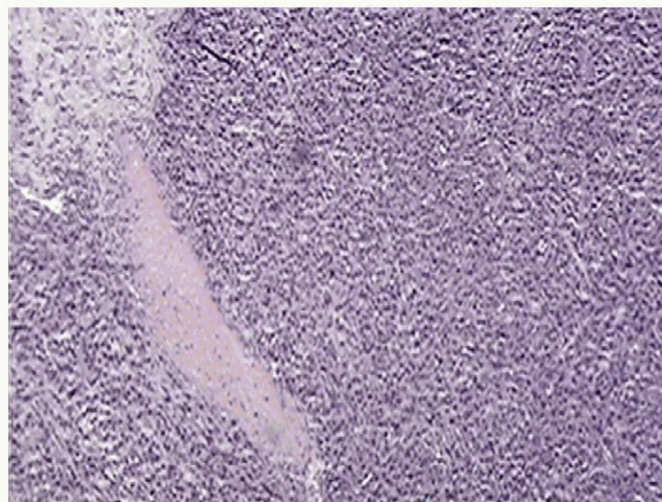
Фиг. 2



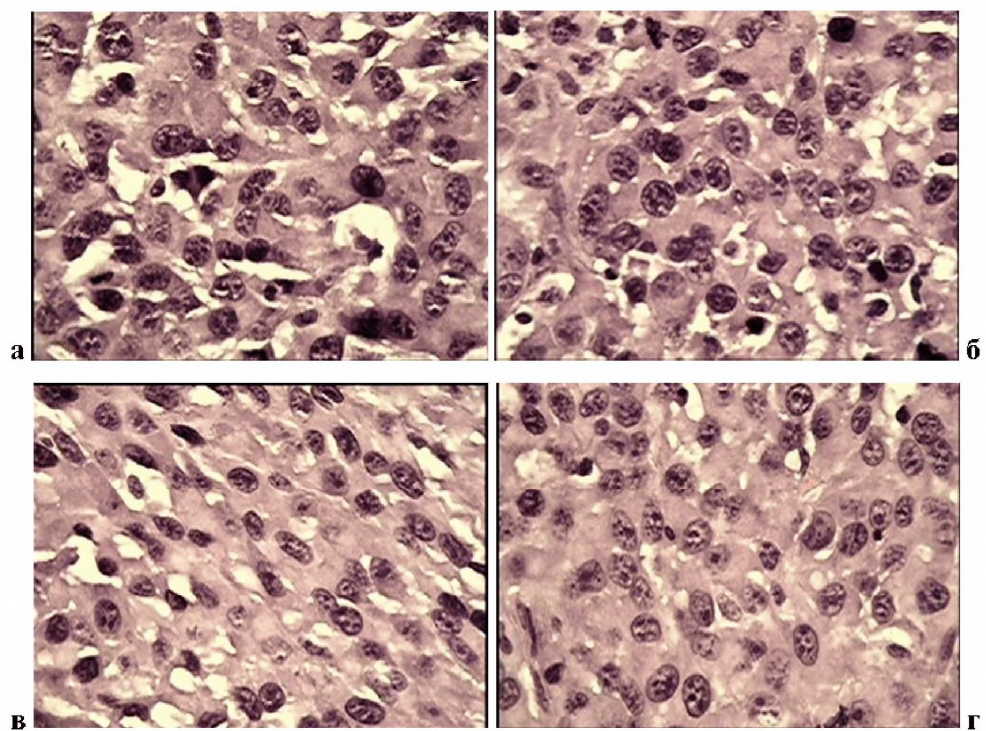
Фиг. 3



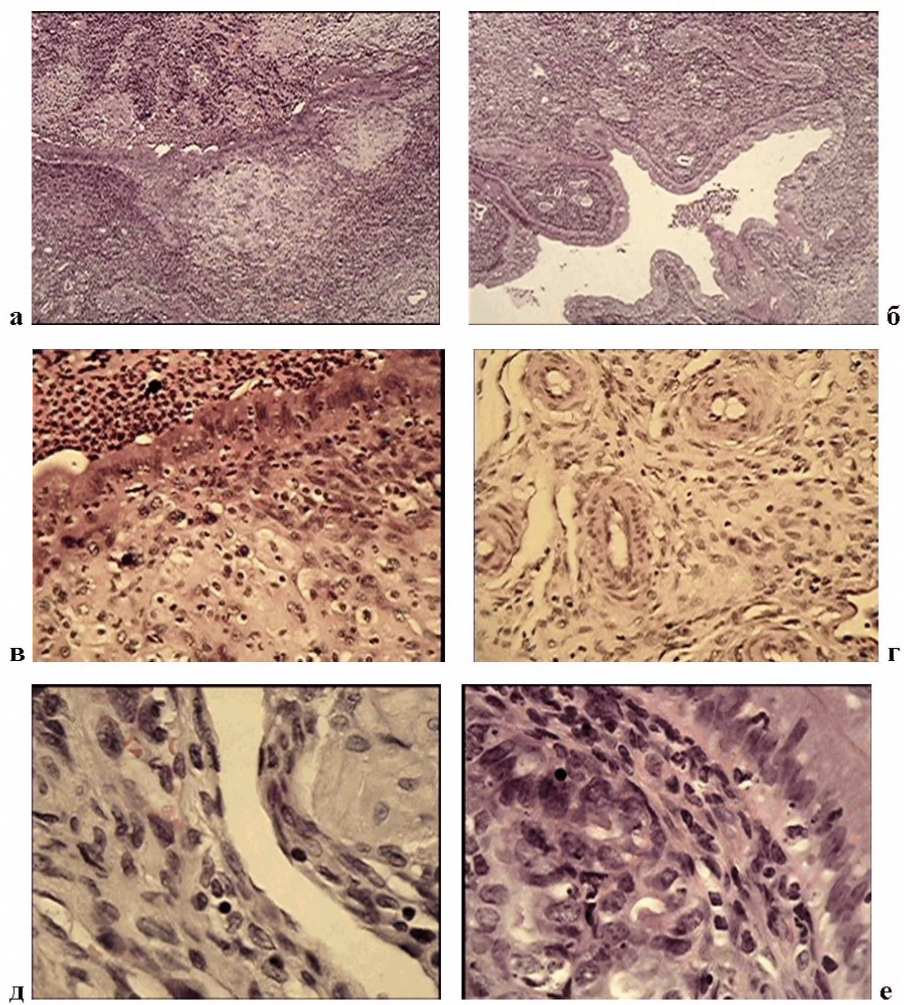
Фиг. 4



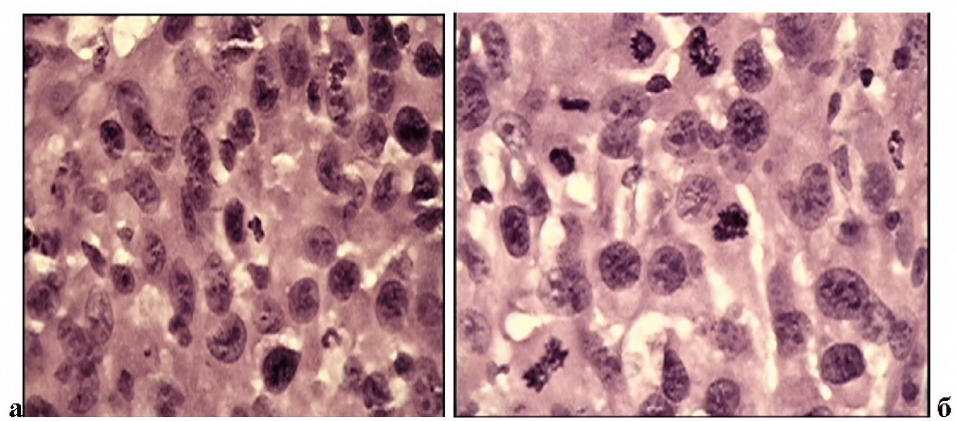
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8