

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2779358

Способ создания экспериментальной модели опухолевого роста в условиях гипотиреоза

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

Авторы: *Франциянц Елена Михайловна (RU), Бандовкина Валерия
Ахтямовна (RU), Каплиева Ирина Викторовна (RU), Шихлярова Алла
Ивановна (RU), Нескубина Ирина Валерьевна (RU), Сурикова
Екатерина Игоревна (RU), Погорелова Юлия Александровна (RU),
Трепитаки Лидия Константиновна (RU), Аракелова Алина Юрьевна
(RU), Салатова Айна Майрбековна (RU)*

Заявка № 2021137771

Приоритет изобретения 20 декабря 2021 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 06 сентября 2022 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 20 декабря 2041 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 (2022.05); G09B 23/28 (2022.05)

(21)(22) Заявка: 2021137771, 20.12.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.12.2021

Дата регистрации:
06.09.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 20.12.2021

(45) Опубликовано: 06.09.2022 Бюл. № 25

Адрес для переписки:

344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я Линия, 63,
ФГБУ НМИЦО МЗРФ, Ишонина О.Г.

(72) Автор(ы):

Франциянц Елена Михайловна (RU),
Бандовкина Валерия Ахтямовна (RU),
Каплиева Ирина Викторовна (RU),
Шихлярова Алла Ивановна (RU),
Нескубина Ирина Валерьевна (RU),
Сурикова Екатерина Игоревна (RU),
Погорелова Юлия Александровна (RU),
Трепитаки Лидия Константиновна (RU),
Аракелова Алина Юрьевна (RU),
Салатова Айна Майрбековна (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 2715891 C1, 04.03.2020.

ЗАПОРОЖАН В.Н. и др. РОЛЬ
ИНТЕРФЕРИРУЮЩЕЙ РНК В
РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО НАДЗОРА
И ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ
НА ПРИМЕРЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
МОДЕЛИ РАКА ЭНДОМЕТРИЯ В
УСЛОВИЯХ ПАТОЛОГИИ
ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ / Казанский
медицинский журнал, 2013 г, том 94, N 3, стр.
340-343. МУРАВЬЕВА А.Б. и др.
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ
ГИПОТИРЕОЗА. (см. прод.)

(54) Способ создания экспериментальной модели опухолевого роста в условиях гипотиреоза

(57) Реферат:

Изобретение относится к онкологии, а именно к экспериментальной онкологии, и может быть использовано для изучения в эксперименте влияния гипотиреоза на рост злокачественных опухолей различной гистологической структуры у животных обоего пола. Нелинейным белым

крысам обоего пола воспроизводят гипотиреоз путем введения рег ос препарата Мерказолил в ежедневной дозировке 2,5 мг/100 г веса и суммарной дозировке 75 мг/100 г веса. Затем после подтверждения состояния гипотиреоза подкожно под лопатку вводят опухолевую взвесь:

карциному Герена или Саркому-45 в дозе по 2 млн клеток в 0,5 мл физиологического раствора. Изобретение обеспечивает создание экспериментальной модели опухолевого роста на фоне гипотиреоза у крыс обоего пола для

изучения влияния гипотиреоза на развитие злокачественных опухолей различной гистологической структуры у животных обоего пола. 5 табл.

(56) (продолжение):

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ГИПОТИРЕОЗА / Национальная ассоциация ученых (НАУ), 2016, N 1 (17), стр. 44-45. LOPEZ-FONTANA C.M. et al. Experimental hypothyroidism increases apoptosis in dimethylbenzanthracene-induced mammary tumors / ONCOLOGY REPORTS, 2013, 30, pages 1651-1660. JORDAN B.F. et al. Thyroid Status is a Key Modulator of Tumor Oxygenation: Implication for Radiation Therapy / RADIATION RESEARCH, 2007, 168, pages 428-432.

RU 2 7 7 9 3 5 8 C 1

RU 2 7 7 9 3 5 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G09B 23/00 (2022.05); G09B 23/28 (2022.05)(21)(22) Application: **2021137771, 20.12.2021**(24) Effective date for property rights:
20.12.2021Registration date:
06.09.2022

Priority:

(22) Date of filing: **20.12.2021**(45) Date of publication: **06.09.2022** Bull. № 25

Mail address:

**344037, g. Rostov-na-Donu, ul. 14-ya Liniya, 63,
FGBU NMITSO MZRF, Ishonina O.G.**

(72) Inventor(s):

**Frantsiiants Elena Mikhailovna (RU),
Bandovkina Valeriia Akhtiamovna (RU),
Kapljeva Irina Viktorovna (RU),
Shikhliarova Alla Ivanovna (RU),
Neskubina Irina Valerevna (RU),
Surikova Ekaterina Igorevna (RU),
Pogorelova Iuliia Aleksandrovna (RU),
Trepitaki Lidiia Konstantinovna (RU),
Arakelova Alina Iurevna (RU),
Salatova Aina Mairbekovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD FOR CREATING AN EXPERIMENTAL MODEL OF TUMOR GROWTH IN CONDITIONS OF HYPOTHYROIDISM**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to oncology, namely experimental oncology, and can be used to study in an experiment the effect of hypothyroidism on the growth of malignant tumors of various histological structures in animals of both sexes. Non-linear white rats of both sexes reproduce hypothyroidism by administering the drug Mercazolil per os at a daily dosage of 2.5 mg/100 g of weight and a total dosage of 75 mg/100 g of weight. Then, after confirming the state of hypothyroidism, a tumor suspension is injected

subcutaneously under the shoulder blade: Guerin's carcinoma or Sarcoma-45 in a dose of 2 million cells in 0.5 ml of saline solution.

EFFECT: invention provides for the creation of an experimental model of tumor growth against the background of hypothyroidism in rats of both sexes to study the effect of hypothyroidism on the development of malignant tumors of various histological structures in animals of both sexes.

1 cl, 5 tbl

Изобретение относится к онкологии, а именно к экспериментальной онкологии, и может быть использовано для изучения в эксперименте влияния гипотиреоза на рост злокачественных опухолей различной гистологической структуры у животных обоего пола.

5 Активность щитовидной железы регулируется изменением уровня гипофизарного гликопротеинового гормона - тиреотропного гормона (ТТГ). В свою очередь к факторам, которые регулируют синтез и секрецию ТТГ относятся тиреотропин-рилизинг гормон (ТГ-рилизинг) и эффекты обратной циркуляции тиреоидных гормонов (ТГ) на уровне гипоталамуса и гипофиза. Следствием динамического взаимодействия этих двух
10 доминирующих влияний на секрецию ТТГ, положительного эффекта ТГ-рилизинга, с одной стороны, и отрицательных эффектов тиреоидных гормонов, с другой, является удивительно стабильная утренняя концентрация ТТГ в кровообращении и, как следствие, незначительное изменение уровня циркулирующих гормонов щитовидной железы изо дня в день и год за годом. Это правило настолько тщательно соблюдается, что
15 аномальный ТТГ в сыворотке крови у большинства пациентов, как полагают, указывает на наличие нарушения функции щитовидной железы.

Была признана полезность измерений ТТГ, и ее использование значительно увеличилось из-за разработки иммунометрических методик для его точного количественного определения в сыворотке крови, хотя критерии определения
20 «нормального диапазона» по-прежнему остаются предметом споров (см. Mariotti S, Beck-Peccoz P. Physiology of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis. 2021 Apr 20. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W).

25 Динамическая способность поддерживать гибкие гомеостатические равновесия в ответ на экологические проблемы является отличительной чертой здорового состояния организма. Гормоны щитовидной железы принимают двойную роль в гомеостатической регуляции, действуя как контролирующие, так и контролируемые элементы. Они нацелены на широкий спектр метаболических эффектов, но одновременно сильно
30 регулируются.

Основное понимание контроля щитовидной железы с участием тиреотропина гипофиза было легко использовано для диагностики заболеваний щитовидной железы (см. Garber JR, Cobin RH, Gharib H, Hennessey JV, Klein I, Mechanick JL, et al. Woeber for the American Association of Clinical Endocrinologists and American Thyroid Association
35 Taskforce on hypothyroidism in adults KA. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association. Thyroid (2012) 22:1200–35.10.1089/thy.2012.0205). В результате измерение ТТГ, хотя и является косвенным показателем гомеостаза щитовидной железы, но стало центральным в современном тестировании функции щитовидной железы (см.
40 Jonklaas J, Bianco AC, Bauer AJ, Burman KD, Cappola AR, Celi FS, et al. Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the American Thyroid Association task force on thyroid hormone replacement. Thyroid (2014) 24:1670–751.10.1089/thy.2014.0028).

Наше знание механизмов, связанных с регуляцией тиреоидных гормонов, значительно изменилось в последние годы. Основная система является гораздо более сложной, чем считалось ранее, поэтому требует пересмотра устоявшихся упрощенных концепций и способствует многофакторным концепциям управления с обратной связью между щитовидной железой и гипофизом (см. Hoermann R, Midgley JEM, Giacobino A, Eckl WA, Wahl HG, Dietrich JW, et al. Homeostatic equilibria between free thyroid hormones and pituitary

thyrotropin are modulated by various influences including age, body mass index and treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)* (2014) 81:907–15. doi: 10.1111/cen.12527).

Дисфункция щитовидной железы, в том числе гипотиреоз, встречается у женщин в 2–9 раз чаще (см. Vanderpump MPJ. The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull*. 2011; 99:39–51. doi: 10.1093/bmb/ldr030), однако, помимо аспектов фертильности и метаболизма костей, возможное влияние пола на характеристики различных заболеваний не изучено должным образом, ни в одной стране - ни в клинических условиях, ни в эпидемиологических когортах.

Гипотиреоз - это клинический синдром, связанный с дефицитом гормонов щитовидной железы и повышенным уровнем общего холестерина в сыворотке, что может привести к гиперхолестеринемии (см. Shin D. J., Osborne T. F. Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2 (SREBP-2) *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(36):34114–34118. doi: 10.1074/jbc.M305417200). Основной чертой гипотиреоза считается дефицит ТГ. Однако у пациентов с субклиническим гипотиреозом уровни ТГ остаются в пределах нормы, и увеличивается только ТТГ, однако у этих пациентов также повышен уровень общего холестерина в сыворотке (см. Teixeira P. D. F., Reuters V. S., Ferreira M. M., et al. Lipid profile in different degrees of hypothyroidism and effects of levothyroxine replacement in mild thyroid failure. *Translational Research*. 2008;151(4):224–231. doi: 10.1016/j.trsl.2007.12.006.).

Так, субклинический гипотиреоз определяется как повышенная концентрация ТТГ в сыворотке крови и нормальный уровень гормонов щитовидной железы в сыворотке, а также повышенный уровень холестерина (см. Song, Y., Zhang, X., Chen, W., & Gao, L. (2017). Cholesterol Synthesis Increased in the MMI-Induced Subclinical Hypothyroidism Mice Model. *International journal of endocrinology*, 2017, 7921071. <https://doi.org/10.1155/2017/7921071>).

Экспериментальные подходы с использованием моделей на мышах для изучения действия тиреоидных гормонов до сих пор в основном включают мышей только одного пола или, иногда, даже не указывали пол мыши. Призыв к повышению осведомленности о влиянии пола на проявление, прогноз и лечение заболеваний был опубликован в журнале *Nature* в 2014 году и впоследствии был подтвержден Эндокринным обществом (см. Clayton JA, Collins FS. NIH to balance sex in cell and animals studies. *Nature*. 2014;509:282–283. doi: 10.1038/509282a; Hammes SR. Sex matters in preclinical research. *Mol Endocrinol*. 2014;28:1209–1210. doi: 10.1210/me.2014-1209).

Кроме того, «Руководство по исследованию экономики и действия тиреоидных гормонов на грызунах и анализ клеточных моделей действия тиреоидных гормонов», опубликованное Американской тироидной ассоциацией в 2013 году, рекомендовало изучать самцов и самок грызунов отдельно, поскольку реакция на ТГ может отличаться в зависимости от половой принадлежности (см. Bianco AC, Anderson G, Forrest D, Galton VA, Gereben B, Kim BW, et al. American thyroid association guide to investigating thyroid hormone economy and action in rodent and cell models. *Thyroid*. 2014;24:88–168. doi: 10.1089/thy.2013.0109).

Используя мышиную модель, Rakov H. обнаружили заметные половые различия в функциональном поведении, метаболических и биохимических параметрах у мышей с гипотиреозом (см. Rakov, H., Engels, K., Hönes, G. S., Strucksberg, K. H., Moeller, L. C., Köhrle, J., Zwanziger, D., & Führer, D. (2016). Sex-specific phenotypes of hyperthyroidism and hypothyroidism in mice. *Biology of sex differences*, 7(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0089-3>). Авторы показали, что пол является важным модификатором действия ТГ, что приводит к различным фенотипическим, метаболическим и биохимическим

признакам гипотиреоза у самцов и самок мышей.

Важно отметить, что прямой линейной связи между концентрацией ТГ в сыворотке и фенотипом, зависящим от пола, не наблюдалось. Широкий спектр ключевых факторов в действии ТГ, таких как отдельные циркулирующие производные и метаболиты ТГ, тканеспецифические переносчики ТГ, негеномные эффекты и классическое ядерное действие ТГ, иллюстрируют сложные механизмы взаимосвязи в организме (см. Fuhrer D, Brix K, Biebermann H. Understanding the healthy thyroid state in 2015. *Eur Thyroid J.* 2015; 4(Suppl 1):1–8. doi: 10.1159/000431318.).

Экспериментальные данные показали, что тироксин (Т4) и трийодтиронин (Т3) оказывают пролиферативное и антиапоптотическое действие на опухолевые клетки рака молочной железы, регулируя экспрессию генов и стимулируя эстрогеноподобные эффекты (см. Goemann IM, Romitti M, Meyer ELS, Wajner SM, Maia AL. Role of thyroid hormones in the neoplastic process: an overview. *Endocr Relat Cancer.* 2017;24(11):R367-R38; Krashin E, Piekietko-Witkowska A, Ellis M, Ashur-Fabian O. Thyroid hormones and cancer: a comprehensive review of preclinical and clinical studies. *Front Endocrinol.* 2019;10:59), что указывает на связь между дисфункцией щитовидной железы и риском рака молочной железы.

Однако эпидемиологические исследования дали противоречивые результаты (см. Tran TV, Kitahara CM, de Vathaire F, Boutron Ruault MC, Journy N. Thyroid dysfunction and cancer incidence: a systematic review and meta analysis. *Endocr Relat Cancer.* 2020;27(4):245-259). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8267139/> - cam43978-bib-0004 В нескольких исследованиях сообщалось, что более высокие уровни в крови ТТГ, как биомаркера гипотиреоза, связаны со снижением риска рака молочной железы (см. Kim EY, Chang Y, Lee KH, et al. Serum concentration of thyroid hormones in abnormal and euthyroid ranges and breast cancer risk: A cohort study. *Int J Cancer.* 2019;145(12):3257-3266; Yuan S, Kar S, Vithayathil M, et al. Causal associations of thyroid function and dysfunction with overall, breast and thyroid cancer: A two sample Mendelian randomization study. *Int J Cancer.* 2020;147(7):1895-1903) в то время как другие не сообщили об этой связи (см. Khan SR, Chaker L, Ruiter R, et al. Thyroid function and cancer risk: the rotterdam study. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2016;101(12):5030-5036).

В мета-анализе обсервационных исследований, опубликованных до 2019 года, не было обнаружено статистически значимой связи между гипотиреозом и риском рака груди, но еще два недавних исследования сообщили о снижении риска рака груди, связанного с гипотиреозом (см. Yuan S, Kar S, Vithayathil M, et al. Causal associations of thyroid function and dysfunction with overall, breast and thyroid cancer: A two-sample Mendelian randomization study. *Int J Cancer.* 2020;147(7):1895-1903; Weng CH, Okawa ER, Roberts MB, et al. Breast cancer risk in postmenopausal women with medical history of thyroid disorder in the women's health initiative. *Thyroid.* 2020;30(4):519-530). И наоборот, некоторые исследования (см. Yang H, Holowko N, Grassmann F, Eriksson M, Hall P, Czene K. Hyperthyroidism is associated with breast cancer risk and mammographic and genetic risk predictors. *BMC Med.* 2020;18(1):225; Weng CH, Okawa ER, Roberts MB, et al. Breast cancer risk in postmenopausal women with medical history of thyroid disorder in the women's health initiative. *Thyroid.* 2020;30(4):519-53) показали более высокий риск рака груди среди женщин с гипертиреозом по сравнению с женщинами без дисфункции щитовидной железы, что было подтверждено результатами мета-анализа и Менделирующего рандомизированного исследования (см. Yuan S, Kar S, Vithayathil M, et al. Causal associations of thyroid function and dysfunction with overall, breast and thyroid cancer: A two-sample Mendelian randomization study. *Int J Cancer.* 2020;147(7):1895-1903).

Это могло быть, по крайней мере, частично, из-за лечения гипертиреоза, поскольку терапия радиоактивным йодом была связана с повышенным риском рака груди (см. Kitahara CM, Berrington de Gonzalez A, Bouville A, et al. Association of radioactive iodine treatment with cancer mortality in patients with hyperthyroidism. *JAMA Int Med.* 2019;179(8): 1034 -1042), но мало исследований содержали эту информацию. В исследовании (см. Tran, T. V., Maringe, C., Benitez Majano, S., Rachet, B., Boutron-Ruault, M. C., & Journy, N. (2021). Thyroid dysfunction and breast cancer risk among women in the UK Biobank cohort. *Cancer medicine*, 10(13), 4604–4614. <https://doi.org/10.1002/cam4.3978>) не было выявлено связи между дисфункцией щитовидной железы и риском рака груди в целом. Женщины с гипотиреозом в анамнезе в течение 10 и более лет или с диагнозом до 40 лет имели более низкий риск рака груди. Менопаузальный статус и возраст наступления менопаузы изменили связь леченного гипотиреоза.

В исследование (см. Wu, C. C., Islam, M. M., Nguyen, P. A., Poly, T. N., Wang, C. H., Iqbal, U., Li, Y. J., & Yang, H. C. (2021). Risk of cancer in long-term levothyroxine users: Retrospective population-based study. *Cancer science*, 112(6), 2533–2541. <https://doi.org/10.1111/cas.14908>) было включено в общей сложности 601.733 случая и 2.406.932 контроля. У пациентов с гипотиреозом, получающих левотироксин, на 50% выше был риск рака различной локализации (AOR: 1,50, $P < 0,0001$) по сравнению контролем. Значительно повышенный риск также наблюдался для рака головного мозга (AOR: 1,90, 95% ДИ: 1,48-2,44; $P < 0,0001$), рака кожи (AOR: 1,42, 95% CI: 1,17-1,72; $P < 0,0001$), рака поджелудочной железы (AOR: 1,27, 95% CI: 1,01-1,60; $P = 0,03$) и рак молочной железы (AOR: 1,24, 95% CI: 1,15-1,33; $P < 0,0001$). Результаты этого исследования показали, что использование левотироксина было значительно связано с повышенным риском рака.

Левотироксин остается высокоэффективным средством лечения гипотиреоза; поэтому врачи должны тщательно продумывать терапию левотироксином и следить за состоянием пациентов, чтобы избежать отрицательных результатов. Однако, для подтверждения этих результатов и оценки потенциальных биологических механизмов необходимы дополнительные исследования.

При изучении рака желудка на фоне гипотиреоза было показано, что распространенность гипотиреоза является независимым предиктором смертности от рака желудка. В рамках экологических исследований гипотиреоз, по-видимому, способствует канцерогенезу желудка у мужчин. В этой конкретной группе населения продолжаются клинические исследования, чтобы лучше понять взаимосвязь между раком желудка и гипотиреозом, чтобы обосновать возможное влияние йода на здоровье желудка людей. Более глубокое понимание факторов, влияющих на риск развития рака желудка, приведет к более эффективным рекомендациям по наблюдению за конкретными подгруппами пациентов (см. Pes, G. M., Fanciulli, G., Delitala, A. P., Piana, A. F., Dore, M. P. (2021). Spatial Association between Gastric Cancer Mortality and Goiter in Sardinia. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 22(1), 105–10. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.1.105>).

В исследовании (см. Shao, Y. Y., Cheng, A. L., & Hsu, C. H. (2021). An Underdiagnosed Hypothyroidism and Its Clinical Significance in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *The oncologist*, 26(5), 422–426. <https://doi.org/10.1002/onco.13755>) у 20% пациентов с прогрессирующей гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК), не получавших ранее системной терапии, был выявлен гипотиреоз.

Гипотиреоз, явный или субклинический, был связан с плохим прогнозом даже после поправки на другие потенциальные прогностические факторы. Этот результат согласуется с предыдущим исследованием пациентов с неоперабельным ГЦК, которое

продемонстрировало, что повышенные уровни тиреотропина связаны с более запущенным заболеванием и снижением общей выживаемости больных (см. Pinter M, Haupt L, Huckle F et al. The impact of thyroid hormones on patients with hepatocellular carcinoma. PLoS One 2017;12:e0181878).

- 5 Принимая во внимание высокую распространенность гипотиреоза среди пациентов с прогрессирующим ГЦК и то, что многие одобренные методы лечения позднего ГЦК могут вызывать гипотиреоз (см. Brahmer JR, Lacchetti C, Schneider BJ et al. Management of immune-related adverse events in patients treated with immune checkpoint inhibitor therapy: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. J Clin Oncol 2018;36: 10 1714–1768; Di Nunno V, Frega G, Gatto L et al. Hypothyroidism in patients with hepatocellular carcinoma receiving cabozantinib: An unassessed issue. Future Oncol 2019;15:563–565; Koizumi Y, Hirooka M, Hiraoka A et al. Lenvatinib-induced thyroid abnormalities in unresectable hepatocellular carcinoma. Endocr J 2019;66:787–792; Tada T, Kumada T, Hiraoka A et al. Safety and efficacy of lenvatinib in elderly patients with unresectable hepatocellular carcinoma: A 15 multicenter analysis with propensity score matching. Hepatol Res 2020;50:75–83), существует рутинное обследование функции щитовидной железы у пациентов с запущенным ГЦК перед началом системного лечения.

- Ввиду клинической ситуации, когда как женщины, так и мужчины страдают от гипотиреоза, а последствия заболевания, включая рак, могут зависеть от пола, 20 целесообразно использовать модель на мышах для всестороннего исследования, характеристика влияния пола на действие тиреоидных гормонов. Следовательно, самцов и самок мышей необходимо изучать на предмет изменений метаболических и биохимических процессов в дополнение к анализу действия ТГ на развитие злокачественной опухоли.

- 25 Создание экспериментальных моделей является важной составной частью изучения природы злокачественных опухолей и поиска методов воздействия на них. Так, «Способ получения экспериментальных злокачественных опухолей легких» (см. Пат. RU № 2375758 C1, опубл. 10.12.2009, Бюл. № 34) и «Способ воспроизведения злокачественного процесса в эксперименте» (см. Пат. RU № 2388064 C1, опубл. 27.04.2010, Бюл. № 12) 30 позволили воссоздать модели злокачественного поражения легких первичной и вторичной природы, что позволило изучить патогенез этих процессов, а также разработать способы воздействия (см. Пат. RU № 2546034 C1, опубл. 10.04.2015, Бюл. № 10 и см. Пат. RU № 2123342, опубл. 20.12.1998).

- Разработанный «Способ получения метастазов печени в эксперименте» (см. Пат. 35 RU № 2538243 C1, опубл. 10.01.2015, Бюл. № 1) позволил показать этапы развития метастатического поражения печени и возможность метастазирования из метастазов печени в легкое.

- Особый интерес имеют модели доказывающие, что коморбидная патология играет важную роль в развитии злокачественных опухолей. Так, «Способ модификации 40 хронической болью злокачественного роста меланомы B16 у мышей» (см. Пат. RU № 2650587 C1, опубл. 16.04.2018, Бюл. № 11), «Способ стимуляции хронической болью злокачественного роста в легких крыс» (см. Пат. RU № 2676641 C1, опубл. 09.01.2019, Бюл. № 1) и «Способ отмены генетически детерминированного ингибирования роста злокачественной опухоли в эксперименте» (см. Пат. № 2718671 C1, опубл. 13.04.2020, 45 Бюл. № 11) показали, что нейрогенная хроническая боль является фактором, стимулирующим рост и развитие злокачественных опухолей различного гистогенеза и даже отменяет замедление роста меланомы у животных, нокаутированных по гену урокиназы, что предполагает замедление ее развития.

Еще одним важным коморбидным заболеванием для развития рака является первичный иммунодефицит. Созданные экспериментальные модели роста злокачественных опухолей на фоне первичного иммунодефицита показали особенности развития неоплазмы в зависимости от гистологического строения двух разных опухолей (см. см. Пат. RU № 2750127 C1, опубл. 22.06.2021, Бюл. № 18; см. Пат. RU № 2751930 C1, опубл. 20.07.2021, Бюл. № 20).

Техническим результатом настоящего изобретения является создание экспериментальной модели опухолевого роста на фоне гипотиреоза у крыс обоего пола для изучения влияния гипотиреоза на развитие злокачественных опухолей различной гистологической структуры у животных обоего пола.

Технический результат достигается тем, что самки (n=30) и самцы (n=30) белых беспородных крыс в течение 30 дней получают мерказолил в суточной дозе 2,5 мг/100г веса (суммарная доза составила 75 мг/100г веса). Через месяц в течение 3-х дней в крови животных определяют уровень тиреоидных гормонов Т3 и Т4, а также ТТГ. При получении стойкого гипотиреоза, животным обоего пола для изучения в эксперименте роста злокачественных опухолей различной гистологической структуры под кожу спины перевивают: одной группе самцов и самок по 15 животных аденокарциному Герена, другой группе самцов и самок по 15 животных саркому 45 (С45), в дозе по 2 млн клеток в 0,5 мл физиологического раствора.

Изобретение «Способ создания экспериментальной модели опухолевого роста в условиях гипотиреоза» является новым, так как оно неизвестно в области экспериментальных исследований в онкологии о влиянии гипотиреоза на рост опухоли.

Новизна изобретения заключается в создании экспериментальной модели развития злокачественного процесса на фоне гипотиреоза у самок и самцов крыс. Воспроизведение модели заключается в подкожной перевивке карциномы Герена или саркомы 45 на фоне стойкого гипотиреоза, имеет половую специфичность и у самок ослабляет злокачественный потенциал опухолей, тогда как у самцов не оказывает значимого влияния.

Изобретение «Способ создания экспериментальной модели опухолевого роста в условиях гипотиреоза» является промышленно применимым, так как может быть использовано в научно-исследовательских учреждениях онкологического профиля для воспроизведения экспериментальной модели роста злокачественных опухолей с разной гистоструктурой на самках и самцах крыс с гипотиреозом, изучение особенностей ее роста, поиска способов воздействия.

«Способ создания экспериментальной модели опухолевого роста в условиях гипотиреоза» выполняется следующим образом.

Белые нелинейные крысы обоего пола весом от 150 г в течение 30 дней ежедневно путем введения рег ос с помощью специального зонда получают фармакопейный тиреостатик - препарат «Мерказолил» («Акрихин» Россия) из расчета дозы 2,5 мг/100г веса для создания состояния гипотиреоза (основная группа). Животные не отказывались от еды, прибавили в весе, зарегистрировано ухудшение внешнего вида кожи и волосяного покрова, вялость и сонливость. Гипотиреоз у животных подтверждают определением содержания в сыворотке крови общего тироксина и тиреотропного гормона, радиоиммунным методом с помощью стандартных наборов (Immunotech, Чехия) результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Уровень тиреоидных гормонов в сыворотке у крыс обоего пола при приеме
Мерказолила**

Группы животных	Гормоны	T4 (пМ/л)	T3 (пМ/л)	ТТГ (мкМЕ/мл)
Интактные самки (n=10)		61,2±5,9	1,05±0,1	0,085±0,007
Самки получающие «Мерказолил» (n=30)		8,41±0,81 ¹	1,25±0,11	0,14±0,013 ¹
Интактные самцы (n=10)		75,58±7,2	1,46±0,12	0,08±0,06
Самцы получающие «Мерказолил» (n=30)		38,06±3,4 ¹	1,11±0,09	0,12±0,009 ¹

Примечание: значимо по сравнению с интактными животными соответствующего пола $p < 0,05$.

У самок крыс, получавших в течение 30 дней препарат «Мерказолил» вызвал снижение в крови уровня общего тироксина в 7,3 раза и повышение ТТГ в 1,6 раза ($p < 0,05$). У самцов крыс, получавших в течение 30 дней препарат «Мерказолил» вызвал снижение уровня общего тироксина в 2 раза и повышение ТТГ в 1,5 раза ($p < 0,05$) (таблица 1). Установленное у крыс обоего пола снижение в крови уровня общего тироксина и повышение содержания ТТГ после 30 дневного приема препарата «Мерказолил» в дозировке 2,5 мг/100г веса животного свидетельствует о формировании у животных стойкого гипотиреоза.

Для исследования влияния гипотиреоза на рост злокачественных опухолей различной гистологической структуры группам животных обоего пола (30 самцов и 30 самок), с подтвержденным гипотиреозом подкожно перевивают одной группе (по 15 самок и 15 самцов) - аденокарциному Герена, другой группе (по 15 самок и 15 самцов) - саркому-45 в дозировке по 2 млн клеток в 0,5 мл физиологического раствора.

Для этого, соблюдая все условия асептики, описанные выше, ассистент фиксирует крысу спиной вверх, предварительно сбрав шерсть и обработав кожу 5% спиртовым раствором йода книзу от угла правой лопатки. Экспериментатор рукой в стерильной перчатке захватывает обработанную кожную складку, иглой шприца прокалывает кожу и вводит опухолевую взвесь. Затем извлекает иглу, и место введения плотно прижимает ватным тампоном, смоченным в 70% спирте с небольшим добавлением йода, на 1 минуту, чтобы исключить вытекание вводимой взвеси. Все манипуляции с животными производятся в боксе. Инструменты, посуду, руки дезинфицируют общепринятым способом.

Контролями самостоятельного роста опухоли служили половозрелые крысы обоего пола с подкожной перевивкой карциномы Герена (n=10 самок и n=10 самцов) и Саркомы-45 (n=10 самок и n=10 самцов) в той же дозе и объёме, что и у животных из основных групп, но без предварительного воспроизведения модели гипотиреоза.

Особенности роста опухолей при стандартной перевивке карциномы Герена и перевивке на фоне гипотиреоза у крыс обоего пола представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Динамика роста опухолей и выживаемость у самок крыс с карциномой Герена

5	Сроки исследования	Основная группа Гипотиреоз +Герен (V опухолей см3)	Контрольная группа Герен (V опухолей см3)
	4 дня	0,125±0,012 ¹	0,165±0,058
	7 дней	2,275±0,53 ¹	3,18±0,33
	10 дней	13,21±0,926 ¹	18,4±2,42
10	14 дней	27,28±1,62 ¹	44,76±3,98
	18 дней	55,94±5,4 ¹	70,3±4,78
	21 день	75,73±6,88 ¹	107,96±9,01
	Появление аллопеции на коже	Начиная с 11 суток	нет
	Появление некроза на коже	нет	Начиная с 14 суток
15	Средняя продолжительность жизни (сутки)	29,3± 1,16 ¹	18,2±1,38
	Гибель первого животного в группе	24 сутки	13 сутки
	Гибель последнего животного в группе	33 сутки	26 сутки

Примечание. 1-значимые отличия по сравнению с показателями у животных контрольной группы $p<0,05$.

20 Подкожная опухоль у самок крыс основной группы ($n=15$) начала определяться через 4 дня после перевивки, ее средний объем в этот период составил 0,125 см³. Опухоль выходила у 80% самок, тогда как у 20% ($n=3$) крыс-самок с гипотиреозом карцинома Герена не перевилась. На этапе 1 неделя роста объем опухоли возрастал в 18,2 раза, по сравнению с 4 днями роста, через 10 дней в 5,8 раза, по сравнению с предыдущим
25 этапом, через 2 недели в 2,1 раза. Через 3 недели после перевивки рост карциномы Герена замедлялся и объемы опухоли у самок основной группы превышали показатели через 18 дней в 1,4 раза ($p<0,05$). По мере роста опухолевого узла с 11 суток на коже покрывающей опухоль выявлены очаги аллопеции, которые далее увеличивались. Через 24 дня роста опухолей у самок основной группы зафиксирована гибель первого
30 животного. Средняя продолжительность жизни составила 29 суток, максимальная – 33 дня (таблица 1).

У крыс-самок контрольной группы ($n=10$), рост карциномы Герена на фоне нормальных показателей тиреоидных гормонов и ТТГ, подкожная опухоль определялась через 4 суток, средний объем опухолевого узла был 0,165 см³, перевиваемость опухоли
35 составила 100%. Через 1 неделю после перевивки средний объем опухоли возрос в 1,9 раза, по сравнению с показателями через 4 дня, через 10 дней в 5,8 раза, через 2 недели в 2,4 раза по сравнению с предыдущими этапами. Через 18 дней эксперимента средний объем опухоли увеличился в 1,3 раза ($p<0,05$), а через 3 недели в 1,9 раза, по сравнению с предыдущими этапами измерения. У самок крыс контрольной группы, начиная со
40 второй недели, были отмечены некрозы опухоли. Гибель первого животного в контрольной группе зафиксирована на 13 сутки, последнего на 26 сутки, средняя продолжительность жизни составила 18 дней.

Было установлено, что у самок с ростом карциномы Герена на фоне гипотиреоза на всех этапах измерения опухолей, средние объемы были меньше, чем у животных
45 контрольной группы: через 4 день в 1,3 раза ($p<0,05$), через 7 и 10 дней в 1,4 раза ($p<0,05$), через 14 дней в 1,5 раза ($p<0,05$), через 18 дней в 1,3 раза ($p<0,05$) и через 21 день в 1,4 раза ($p<0,05$). При этом выживаемость крыс-самок основной группы оказалась в 1,6 раза больше ($p<0,05$), по сравнению с крысами контрольной группы. Первая гибель

животных основной группы наступила через 24 дня, на 11 дней позже, по сравнению с первой гибелью животных контрольной группы.

Исследование динамики роста перевивной карциномы Герена на фоне гипотиреоза у самцов крыс представлено в таблице 3.

Таблица 3

Динамика роста опухолей и выживаемость у самцов крыс с карциномой Герена на фоне гипотиреоза

Сроки исследования	Основная группа Гипотиреоз +Герен (V опухолей см ³)	Контрольная группа Герен (V опухолей см ³)
4 дня	0,0375±0,0037 ¹	0,5±0,035
7 дней	0,5±0,0023 ¹	3,82±0,27
10 дней	7,94±0,80 ¹	14,74±1,15
14 дней	15,61±1,395 ¹	40,68±3,8
18 дней	44,9±3,74	52,84±5,48
21 день	72,93±7,09	77,5±6,25
Появление некроза на коже	нет	Начиная с 7 суток
Средняя продолжительность жизни (сутки)	23,7± 2,12	20,0±1,27
Гибель первого животного в группе	20 суток	14 суток
Гибель последнего животного в группе	25 суток	24 суток

Примечание. 1-значимые отличия по сравнению с показателями у животных контрольной группы $p < 0,05$.

Подкожная опухоль у самцов крыс основной группы (n=15) начала определяться через 4 дня после перевивки, ее средний объем в этот период составил 0,0375 см³. Опухоль выходила у 100 % самцов. На этапе 1 неделя роста объем опухоли возрастал в 13,3 раза, по сравнению с 4 днями роста, через 10 дней в 15,9 раза, по сравнению с предыдущим этапом, через 2 недели в 1,96 раза ($p < 0,05$), через 18 дней в 2,9 раза. Через 3 недели после перевивки объемы опухоли у самцов основной группы возросли в 1,6 раза, по сравнению с показателями через 18 дней. Через 20 дня роста опухолей у самцов основной группы зафиксирована гибель первого животного. Средняя продолжительность жизни составила 23,7 суток, максимальная – 25 дней (таблица 2).

У самцов контрольной группы (n=10) подкожная опухоль также начала определяться через 4 суток после перевивки, объем составил 0,5 см³, через 7 дней средний объем возрос в 7,6 раза, через 10 дней в 3,9 раза, через 14 дней в 2,8 раза, по сравнению с предыдущими этапами измерения. Через 18 дней рост опухоли замедлился и средний объем возрос в 1,3 раза ($p < 0,05$), а через 21 день еще в 1,5 раза ($p < 0,05$). Гибель первого животного в контрольной группе зафиксирована через 14 суток после перевивки карциномы Герена, а последнего через 29 дней, средняя продолжительность жизни составила 27 суток.

У самцов основной группы, при росте карциномы Герена на фоне гипотиреоза, по сравнению с показателями у контрольных животных средние объемы опухоли, на этапах эксперимента с 4 по 14 день оказались меньше: через 4 суток в 13,3 раза, через 7 дней в 7,5 раза, через 10 дней в 1,9 раза ($p < 0,05$), через 14 дней в 2,6 раза. Однако через 18 дней и через 21 сутки не выявлено значимых отличий в объемах опухоли. Средняя продолжительность жизни у животных не имела значимых отличий, по сравнению с показателями у самцов контрольной группы.

Исследование динамики роста объемов опухоли и продолжительности жизни у самок крыс с перевивкой саркомы 45 на фоне гипотиреоза представлено в таблице 4.

Таблица 4

Динамика роста опухолей и выживаемость у самок крыс с перевивной саркомой 45 (С 45)

Сроки исследования	Основная группа Гипотиреоз +С45 (V опухолей см ³)	Контрольная группа С45 (V опухолей см ³)
4 дня	0,29±0,012	0,23±0,020
7 дней	0,68±0,06 ¹	1,1±0,10
10 дней	0,95±0,09 ¹	3,08±0,31
14 дней	1,39±0,14 ¹	5,42±0,50
18 дней	1,4±0,15 ¹	6,68±0,7
Средняя продолжительность жизни (сутки)	32,4± 1,2 ¹	18,0±1,38
Гибель первого животного в группе	24 сутки	12 сутки
Гибель последнего животного в группе	34 сутки	20сутки

Примечание. 1-значимые отличия по сравнению с показателями у животных контрольной группы $p<0,05$.

Подкожная опухоль С45 у самок крыс основной группы (n=15) начала определяться через 4 дня после перевивки, ее средний объем в этот период составил 0,29 см³. Опухоль выходила у 100 % самок. На этапе 1 неделя роста объем опухоли возрастал в 2,3 раза, по сравнению с 4 днями роста, через 10 дней в 1,4 раза ($p<0,05$), по сравнению с предыдущим этапом, через 2 недели в 1,46 раза ($p<0,05$).

Через 18 дней после перевивки рост саркомы замедлялся, и объемы опухоли не имели значимых отличий по сравнению с предыдущим сроком измерения. Через 24 дня роста опухолей у самок основной группы зафиксирована гибель первого животного. Средняя продолжительность жизни составила 32 дня, максимальная – 33 дня (таблица 4).

У крыс-самок контрольной группы (n=10), рост Саркомы-45 на фоне нормальных показателей тиреоидных гормонов и ТТГ, подкожная опухоль определялась через 4 суток, средний объем опухолевого узла был 0,23 см³, перевиваемость опухоли составила 100%. Через 1 неделю после перевивки средний объем опухоли возрос в 4,8 раза, по сравнению с показателями через 4 дня, через 10 дней в 2,8 раза, через 2 недели в 1,8 раза по сравнению с предыдущими этапами.

Через 18 дней эксперимента средний объем опухоли увеличился в 1,3 раза ($p<0,05$). Гибель первого животного в контрольной группе зафиксирована на 12 сутки, последнего на 20 сутки, средняя продолжительность жизни составила 18 дней.

Было установлено, что у самок с ростом Саркомы-45 на фоне гипотиреоза на всех этапах измерения опухолей, средние объемы были меньше, чем у животных контрольной группы: через 4 день в 1,4 раза ($p<0,05$), через 7 и 10 дней в 1,6 раза и в 3,2 раза ($p<0,05$), через 14 дней в 3,9 раза, через 18 дней в 4,8 раза.

При этом выживаемость крыс-самок основной группы оказалась в 1,8 раза больше ($p<0,05$), по сравнению с крысами контрольной группы. Первая гибель животных основной группы наступила на 12 дней позже, по сравнению с первой гибелью животных контрольной группы.

Динамика роста перевивной саркомы С45 на фоне гипотиреоза у самцов крыс и средняя продолжительность жизни животных представлены в таблице 5.

Таблица 5

Динамика роста опухолей и выживаемость у самцов крыс с перевивной С-45

Сроки исследования	Основная группа Гипотиреоз + С45 (V опухолей см ³)	Контрольная группа С45 (V опухолей см ³)
4 дня	0,125±0,018	0,25±0,020
7 дней	0,39±0,18	0,56±0,08
10 дней	2,75±0,40	3,36±0,58
14 дней	4,05±0,60	4,2±0,7
18 дней	9,44±0,99	9,24±0,7
21 сутки	14,8±1,5	11,8±1,5
Появление некроза на коже	нет	Начиная с 14 суток
Средняя продолжительность жизни (сутки)	21,3± 1,2 ¹	20,0±1,38
Гибель первого животного в группе	15 сутки	14 сутки
Гибель последнего животного в группе	22 сутки	22 сутки

Примечание. 1-значимые отличия по сравнению с показателями у животных контрольной группы $p<0,05$.

Подкожная опухоль С-45 у самцов крыс основной группы ($n=15$) начала определяться через 4 дня после перевивки, ее средний объем в этот период составил 0,125 см³. Опухоль выходила у 100 % самок. На этапе 1 неделя роста объем опухоли возрастал в 3,1 раза, по сравнению с 4 днями роста, через 10 дней в 7,1 раза, по сравнению с предыдущим этапом, через 2 недели в 1,5 раза ($p<0,05$), через 18 дней в 2,3 раза и через 21 день в 1,6 раза. Средняя продолжительность жизни составила 21 день, максимальная – 22 дня (таблица 5). У крыс-самцов контрольной группы ($n=10$), рост Саркомы -45 на фоне нормальных показателей тиреоидных гормонов и ТТГ, подкожная опухоль определялась через 4 суток, средний объем опухолевого узла был 0,25 см³, перевиваемость опухоли составила 100%. Через 1 неделю после перевивки средний объем опухоли возрос в 2,2 раза, по сравнению с показателями через 4 дня, через 10 дней в 6 раз, через 2 недели в 1,25 раза ($p<0,05$) по сравнению с предыдущими этапами. Через 18 дней эксперимента средний объем опухоли увеличился в 2,2 раза, через 3 недели в 1,3 раза ($p<0,05$). Гибель первого животного в контрольной группе зафиксирована на 14 сутки, последнего на 22 сутки, средняя продолжительность жизни составила 20 дней. У самцов основной группы, при росте Саркомы-45 на фоне гипотиреоза, по сравнению с показателями у контрольных животных средние объемы опухоли, на этапах эксперимента с 4 по 7 день оказались меньше: через 4 суток в 2 раза, через 7 дней в 1,4 раза ($p<0,05$). На этапах через 10 дней – 21 сутки роста саркомы -45 значимых отличий в объемах опухоли у самцов основной и контрольной групп не выявлено. Средняя продолжительность жизни у самцов основной группы не имела значимых отличий, по сравнению с показателями у самцов контрольной группы.

Таким образом, у самок нелинейных белых крыс с установленным гипотиреозом (по низким величинам в сыворотке крови общего тироксина и повышенному содержанию ТТГ) увеличение объемов опухолевых узлов карциномы Герена и Саркомы-45, перевиваемых подкожно, развивалось медленнее, чем в группе контроля, а продолжительность жизни животных была значимо дольше. У самцов нелинейных белых крыс с установленным гипотиреозом (по низким величинам в сыворотке крови общего тироксина и повышенному содержанию ТТГ) увеличение объемов опухолевых узлов карциномы Герена и Саркомы-45, перевиваемой подкожно развивалось не равномерно, в сроки до 14 дней медленнее, однако затем не отличались от показателей групп контроля. При этом продолжительность жизни не имела значимых отличий.

Технико-экономическая эффективность «Способ создания экспериментальной модели опухолевого роста в условиях гипотиреоза» заключается в том, что воспроизведение

экспериментальной модели влияния гипотиреоза на развитие злокачественной опухоли (карциномы Герена или Саркомы-45) у животных обоего пола позволило установить уменьшение злокачественного потенциала опухоли у самок крыс за счёт уменьшения ее роста и увеличения продолжительности жизни животных, а также отсутствие влияния на рост опухолей и продолжительность жизни у самцов. Это дает возможность изучать патогенез злокачественного роста на фоне коморбидной патологии, какой является гипотиреоз, что важно для клиники, а также проводить поиск адекватных воздействий на опухоль. Способ экономичен, доступен.

(57) Формула изобретения

Способ создания экспериментальной модели опухолевого роста в условиях гипотиреоза, заключается в том, что нелинейным белым крысам обоего пола воспроизводят гипотиреоз путем введения per os препарата Мерказолил в ежедневной дозировке 2,5 мг/100 г веса и суммарной дозировке 75 мг/100 г веса, затем после подтверждения состояния гипотиреоза подкожно под лопатку вводят опухолевую взвесь: карциному Герена или Саркому-45 в дозе по 2 млн клеток в 0,5 мл физиологического раствора.