

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2740423

Способ выбора оптимального доступа для ортотопической трансплантации фрагмента опухоли рака яичника человека в яичник самки иммунодефицитной мыши

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

Автор: *Вереникина Екатерина Владимировна (RU)*

Заявка № 2020125416

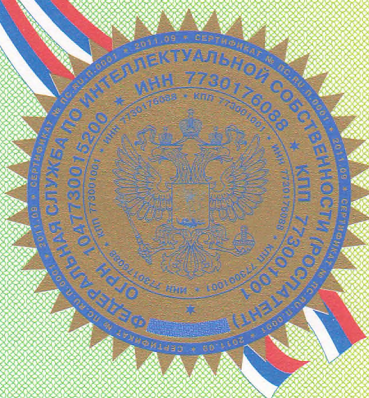
Приоритет изобретения 22 июля 2020 г.

Дата государственной регистрации в
Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 14 января 2021 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 22 июля 2040 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G09B 23/28 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020125416, 22.07.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.07.2020

Дата регистрации:
14.01.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.07.2020

(45) Опубликовано: 14.01.2021 Бюл. № 2

Адрес для переписки:

344037, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63,
НМИЦ онкологии, Ишониной О.Г.

(72) Автор(ы):

Вереникина Екатерина Владимировна (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: ELIZABETH MAGNOTTI, WAYNE
A. MARASCO. The latest animal models of
ovarian cancer for novel drug discovery. Expert
Opin Drug Discov. 2018. N 13(3). P. 249-25. RU
2533739 C2, 20.11.2014. RU 2676437 C1,
28.12.2018. КИТ О.В. и др. Тканевые факторы
роста семейства vegf в динамике развития
рака яичников. Российский онкологический
журнал. 2017, N23(3). (см. прод.)

(54) Способ выбора оптимального доступа для ортотопической трансплантации фрагмента опухоли рака яичника человека в яичник самки иммунодефицитной мыши

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной онкологии. Рассекают кожу по линии, соединяющей точку, расположенную на 4 мм левее позвоночного столба вдоль нижнего края реберной дуги, с проекцией левого тазобедренного сустава. Затем производят второй разрез перпендикулярно первому длиной 5 мм из каудальной точки первого разреза латерально. Отсепаровывают кожу от подкожной клетчатки, поднимают вверх, визуализируют через подкожную клетчатку и брюшину условный прямоугольный треугольник, гипотенуза которого пересекает каудальный край селезенки

под углом к позвоночнику, длинный катет пересекает краниальный край почки под углом к позвоночнику. Определяют точку пересечения биссектрис непрямых углов треугольника, через полученную точку рассекают брюшину параллельно позвоночнику, выводят в рану яичник животного. Способ позволяет получить ортотопическую пациентоподобную модель рака яичников, наиболее достоверно отражающую особенности онкогенеза и являющуюся важной тест-системой для доклинических исследований различных способов лечения рака яичников. 1 пр., 5 ил.

(56) (продолжение):

С.149-152. ТРЕЩАЛИНА Е.М. Иммунодефицитные мыши Balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований. РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ. 2017, N3 (16)6. С.6-13. JING GUOL, JING CAIL, YUNXIA ZHANG et al. Establishment of two ovarian

cancer orthotopic xenograft mouse models for in vivo imaging: A comparative study; Emerging and Evolving Ovarian Cancer Animal Models. International journal of oncology. 2017, N 51. P. 1199. SELENE NUNEZ-CRUZ et al. An Orthotopic Model of Serous Ovarian Cancer in Immunocompetent Mice for in vivo Tumor Imaging and Monitoring of Tumor Immune Responses. J Vis Exp. 2010, N(45): 2146.

R U 2 7 4 0 4 2 3 C 1

1 C 2 7 4 0 4 2 3 R U



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G09B 23/28 (2020.08)

(21)(22) Application: **2020125416, 22.07.2020**

(24) Effective date for property rights:
22.07.2020

Registration date:
14.01.2021

Priority:

(22) Date of filing: **22.07.2020**

(45) Date of publication: **14.01.2021** Bull. № 2

Mail address:

**344037, g. Rostov-na-Donu, 14-ya liniya, 63,
NMITS onkologii, Ishoninoj O.G.**

(72) Inventor(s):

Verenikina Ekaterina Vladimirovna (RU)

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij
issledovatel'skij tsentr onkologii" Ministerstva
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)**

(54) **METHOD OF SELECTING OPTIMAL ACCESS FOR ORTHOTOPIC TRANSPLANTATION OF HUMAN OVARIAN CANCER TUMOR INTO OVARY OF IMMUNE-DEFICIENT MOUSE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to experimental oncology. Skin is dissected along the line connecting point located 4 mm to the left of the spinal column along the lower edge of the costal arch, with a projection of the left hip joint. That is followed by a second incision perpendicular to first 5 mm length from the caudal point of the first incision laterally. Separated skin is separated from subcutaneous fat, is lifted up, visualized through subcutaneous fat and peritoneum the conditional rectangular triangle, which hypotenuse crosses caudal edge of spleen at an angle

to spine, long cat crosses cranial edge of kidney at an angle to spine. Point of intersection of the bisectors of the triangle's indirect angles is determined; a peritoneum is dissected through the obtained point in parallel to the spine; the ovary of the animal is brought into the wound.

EFFECT: method enables to obtain an orthotopic patient-like model of ovarian cancer, most authentically reflecting features of oncogenesis and is an important test system for preclinical studies of various methods of treating ovarian cancer.

1 cl, 1 ex, 5 dwg

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной онкологии, и касается способа трансплантации фрагмента рака яичника человека в яичник самки иммунодефицитной мыши для получения ортотопической пациентоподобной модели, достоверно передающей особенности опухоли и наиболее адекватно отражающей

5 картину развития рака яичников у человека.

Рак яичников является вторым по частоте гинекологическим злокачественным новообразованием. Более чем в 60% случаев заболевание диагностируется на III-IV стадии, когда в процесс вовлекаются органы брюшной полости, малого таза или ретроперитонеальные лимфоузлы, (см. К.Д. Гусейнов, И.В. Берлев, А.М. Беляев, А.Ф. Урманчеева, Т.В. Городнова, Г.С. Киреева, М.Г. Яковлева, М.Г. Шихзадаева.

10 Возможности гипертермической интраперитонеальной интраоперационной химиоперфузии в лечении рецидивирующего рака яичников // Гинекологическая онкология. 2020. Т 19. №1 С. 62). Вместе с тем, для рака яичников характерно бессимптомное течение заболевания (см. Белинская М.К. Особенности метастазирования рака яичников // Инновации в медицине и фармации. - 2018. - С. 71.). В связи с этим, рак яичников несет в себе ряд трудностей в терапии (Кузнецов С.А., Шубина И.Ж., Мамедова Л.Т. и др. Неоадьювантная химиотерапия при распространенном раке яичников: данные литературы и исследования *in vitro* // Опухоли женской репродуктивной системы. - 2015. - №3. - С. 61). В настоящее время в клинической

15 практике ведется поиск индивидуального подхода к лечению этой патологии (Савинова А.Р., Гатауллин И.Г. Индивидуальный подход к лечению рака яичников // Казанский медицинский журнал. - 2016. Т. 97. №3. С. 388). Одним из основным методом является химиотерапевтический.

Для изучения особенностей механизмов развития рака яичников и новых терапевтических препаратов необходимо создание моделей данного заболевания, наиболее адекватно отражающие индивидуальные черты патологического процесса.

Данному требованию может отвечать ортотопическая пациентоподобная модель рака яичников, клеточный состав которой является гетерогенным сходным реальным опухолям, а ортотопическое микроокружение оказывает влияние на онкогенез. Кроме

30 того, при ортотопической имплантации опухолевого материала высока вероятность развития метастазов (см. Хохлова С.В. Новое в лечении high grade серозного рака яичников // Эффективная фармакотерапия. 2019. Т. 15. №38. С. 24-29.; An Advanced Orthotopic Ovarian Cancer Model in Mice for Therapeutic Trials).

Известен способ ортотопической имплантации рака яичников, включающий рассечение кожи и брюшной стенки мыши, инъекцию опухолевой суспензии в яичник самки иммунодефицитной мыши, полученной из фрагмента человеческой опухоли рака яичников. Недостатком данного способа является имплантация опухолевой взвеси, а не целого участка опухоли, взятого от пациента (см. Ying Zhang, Li Luo, Xueling Zheng et al. An Advanced Orthotopic Ovarian Cancer Model in Mice for Therapeutic Trials // BioMed

40 Research International. - 2016. №4. P. 1.).

Известен способ трансплантации культуры клеток рака яичников серозной клеточной линии аденокарциномы SKOV3 и прозрачной клеточной карциномы ES-2 сначала методом инъекции в бурсу яичника самки иммунодефицитной мыши, а затем извлечение выросшей опухоли из тела самки иммунодефицитной мыши и трансплантируют его в

45 виде фрагмента в жировую прослойку, окружающую яичник, ниже левой почки (см. Jing Guol, Jing Cail, Yunxia Zhang et al. Establishment of two ovarian cancer orthotopic xenograft mouse models for *in vivo* imaging: A comparative study; Emerging and Evolving Ovarian Cancer Animal Models // International journal of oncology. 2017. №51. P. 1199.). Данный способ

также не лишен недостатков, поскольку не предполагает пересадки опухолевого материала от человека в яичник животного.

Известен способ трансплантации культуры клеток карциномы яичников ES-2 и OVCA 429 методом внутрибрюшинной инъекции. Недостатком данного способа является имплантация культуры клеток в несоответствующий сайт трансплантации. Из технических трудностей метода является потенциальная утечка клеток в брюшную полость (см. Elizabeth Magnotti, Wayne A. Marasco. The latest animal models of ovarian cancer for novel drug discovery // Expert Opin Drug Discov. 2018. №13(3). P. 249-257).

В качестве прототипа нами выбран способ трансплантации культуры клеток рака яичников HO-8910PM сначала методом подкожной инъекции в лопаточную область самки иммунодефицитной мыши и трансплантация опухоли в виде фрагмента в яичник самки иммунодефицитной мыши, для чего делают спинной разрез в области почек 1,5 см. Яичник частично выводят наружу, делают надрез (1-2 мм) и опухоль имплантируют в яичник. Преимуществом данного способа является ортотопический сайт имплантации. Недостатком данного способа является первоначальная имплантация культуры клеток, а не гетерогенного материала, взятого от пациента. Как известно, гетерогенный состав клеточной популяции опухолей повторяют индивидуальные черты онкогенеза (см. Ying Zhang, Li Luo, Xueling Zheng et al. An Advanced Orthotopic Ovarian Cancer Model in Mice for Therapeutic Trials // BioMed Research International. - 2016. №4. P.1.; Elizabeth Magnotti, Wayne A. Marasco. The latest animal models of ovarian cancer for novel drug discovery // Expert Opin Drug Discov. 2018. №13(3). P. 249-257). Кроме того, способ не предполагает создания удобных условий для манипулирования с яичником животного в ходе имплантации.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является разработка способа трансплантации фрагмента опухоли рака яичников человека в яичник самки иммунодефицитных мышей, позволяющего получить ортотопическую пациентоподобную модель рака яичников, достоверно отражающую особенности онкогенеза данного заболевания у человека.

Технический результат изобретения достигается тем, что рассекают кожу по линии, соединяющей точку, расположенную на 4 мм левее позвоночного столба вдоль нижнего края реберной дуги, с проекцией левого тазобедренного сустава, затем производят второй разрез перпендикулярно первому длиной 5 мм из каудальной точки первого разреза латерально, отсепааровывают кожу от подкожной клетчатки, поднимают вверх, визуализируют через подкожную клетчатку и брюшину условный прямоугольный треугольник, гипотенуза которого пересекает каудальный край селезенки под углом к позвоночнику, длинный катет пересекает краниальный край почки под углом к позвоночнику, определяют точку пересечения биссектрис не прямых углов треугольника, через полученную точку рассекают брюшину параллельно позвоночнику, выводят в рану яичник животного.

Изобретение иллюстрируется фигурами 1-5.

На Фиг. 1 изображен разрез соединяющей точку, расположенную на 4 мм левее позвоночного столба вдоль нижнего края реберной дуги, с проекцией левого тазобедренного сустава.

На Фиг. 2 визуализируется через подкожную клетчатку и брюшину условный прямоугольный треугольник, гипотенуза которого пересекает каудальный край селезенки под углом к позвоночнику, длинный катет пересекает краниальный край почки под углом к позвоночнику.

На Фиг. 3 изображен выведенный яичник животного в рану в брюшине.

На Фиг. 4 изображен яичник, надсеченный на протяжении 2 мм. Опухолевый фрагмент

прошивают лигатурой 6-0 из не рассасывающегося монофеломентного материала под контролем налобного микроскопа. Затем прошивают одним краем лигатуры правый край разреза яичника, другим краем лигатуры - левый край разреза яичника. Лигатуру затягивают, фиксируя опухолевый материал к яичнику.

5 На Фиг. 5 изображены наложенные швы на кожу.

Способ осуществляют следующим образом.

Фрагмент опухоли рака яичников после иссечения сразу же помещается в среду Хенкса. Перед трансплантацией вырезают кусочки объемом 15 мм^3 . Время от момента резекции опухолевого материала у человека до имплантации в яичник
 10 иммунодефицитной мыши не должно превышать 20 минут. В качестве реципиента опухолевого материала служат самки иммунодефицитные мыши. При премедикации используют ксилазин концентрацией 20 мг/мл. Животных наркотизируют при помощи золетила концентрацией 22,57 мг/мл. Для обеспечения доступа к яичнику рассекают кожу, подкожную клетчатку и брюшину животного в положении его на животе, по
 15 линии, соединяющей точку, расположенную на 4 мм левее позвоночного столба вдоль нижнего края реберной дуги, с проекцией левого тазобедренного сустава, затем производят второй разрез перпендикулярно первому длиной 5 мм из каудальной точки первого разреза латерально (см. Фиг. 1), отсепаровывают кожу от подкожной клетчатки, поднимают ее вверх, визуализируют через подкожную клетчатку и брюшину условный
 20 прямоугольный треугольник, гипотенуза которого пересекает каудальный край селезенки под углом к позвоночнику, длинный катет пересекает краниальный край почки под углом к позвоночнику (см. Фиг. 2), определяют точку пересечения биссектрис не прямых углов треугольника, через полученную точку рассекают брюшину параллельно позвоночнику, выводят в рану яичник животного (см. Фиг. 3). Яичник
 25 надсекают на протяжении 2 мм. Опухолевый фрагмент прошивают лигатурой 6-0 из нерассасывающегося монофиламентного материала под контролем налобного микроскопа, совмещают его с разрезом яичника. Затем прошивают одним краем лигатуры правый край разреза яичника, другим краем лигатуры - левый край разреза яичника. Лигатуру затягивают, фиксируя опухолевый материал к яичнику (см. Фиг. 4).
 30 Яичник погружают в брюшную полость, рану брюшной стенки ушивают послойно (см. Фиг. 5).

Данным способом произведена трансплантация фрагмента опухоли яичников человека в яичник самок иммунодефицитных мышей в нескольких сериях экспериментов. Нами использовались мыши Balb/c Nude и NOG. Всего исследование проведено на 60
 35 мышах, в 10% случаев был получен рост опухоли яичника.

Приводим пример применения способа.

Данным способом была прооперирована самка иммунодефицитной мыши Balb/c Nude возрастом 6 недель массой 24,5 г. Трансплантантом служил фрагмент опухоли яичников объемом 12 мм, который после выделения из организма человека был
 40 незамедлительно помещен в среду Хенкса. Время от момента резекции опухолевого материала у человека до имплантации в яичник самки иммунодефицитной мыши составило 11 минут. Проводили премедикацию с использованием ксилазина концентрацией 20 мг/мл. Наркоз животных осуществляли при помощи золетила концентрацией 22,57 мг/мл. Для обеспечения доступа к яичнику рассекали кожу,
 45 подкожную клетчатку и брюшину животного в положении его на животе, по линии, соединяющей точку, расположенную на 4 мм левее позвоночного столба вдоль нижнего края реберной дуги, с проекцией левого тазобедренного сустава, затем производили второй разрез перпендикулярно первому длиной 5 мм из каудальной точки первого

разреза латерально, отсепаровывали кожу от подкожной клетчатки, поднимали ее вверх, визуализировали через подкожную клетчатку и брюшину условный прямоугольный треугольник, гипотенуза которого пересекает каудальный край селезенки под углом к позвоночнику, длинный катет пересекает краниальный край почки под углом к позвоночнику, определяли точку пересечения биссектрис не-
 5 прямых углов треугольника, через полученную точку рассекали брюшину параллельно позвоночнику, выводили в рану яичник животного. Яичник надсекали на протяжении 2 мм. Опухолевый фрагмент прошивали лигатурой 6-0 из нерассасывающегося монофиламентного материала под контролем налобного микроскопа, совмещали его
 10 с разрезом яичника. Затем прошивали одним краем лигатуры правый край разреза яичника, другим краем лигатуры - левый край разреза яичника. Лигатуру затягивали, фиксируя опухолевый материал к яичнику. Яичник погружали в брюшную полость, рану брюшной стенки ушивали послойно.

Через 6 недель при вскрытии животного обнаружили опухолевый инфильтрат, исходящий из яичника, прорастающий в почку. При морфологическом исследовании
 15 опухоли определен рак яичников.

Технико-экономическая эффективность данного способа заключается в том, что он позволяет получить ортотопическую пациентоподобную модель рака яичников наиболее достоверно отражающую особенности онкогенеза, и являющуюся важной тест-системой
 20 для доклинических исследований различных способов лечения рака яичников.

(57) Формула изобретения

Способ выбора оптимального доступа для ортотопической трансплантации фрагмента опухоли рака яичника человека в яичник самки иммунодефицитной мыши, включающий рассечение кожи, подкожной клетчатки и брюшины на спине животного
 25 в положении его на животе, отличающийся тем, что рассекают кожу по линии, соединяющей точку, расположенную на 4 мм левее позвоночного столба вдоль нижнего края реберной дуги, с проекцией левого тазобедренного сустава, затем производят второй разрез перпендикулярно первому длиной 5 мм из каудальной точки первого
 30 разреза латерально, отсепаровывают кожу от подкожной клетчатки, поднимают вверх, визуализируют через подкожную клетчатку и брюшину условный прямоугольный треугольник, гипотенуза которого пересекает каудальный край селезенки под углом к позвоночнику, длинный катет пересекает краниальный край почки под углом к позвоночнику, определяют точку пересечения биссектрис не-
 35 прямых углов треугольника, через полученную точку рассекают брюшину параллельно позвоночнику, выводят в рану яичник животного.

40

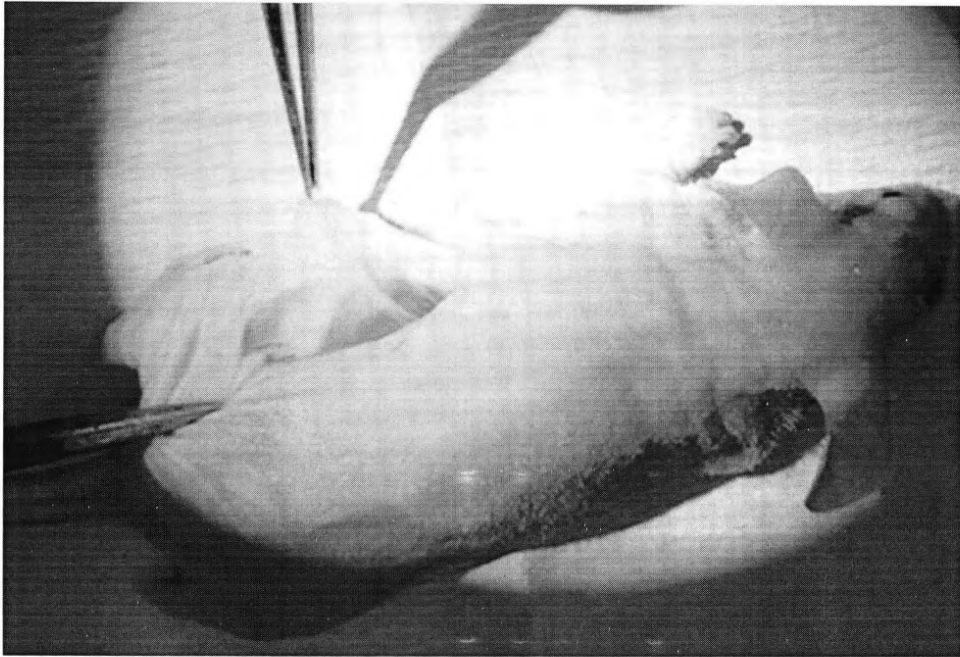
45

1

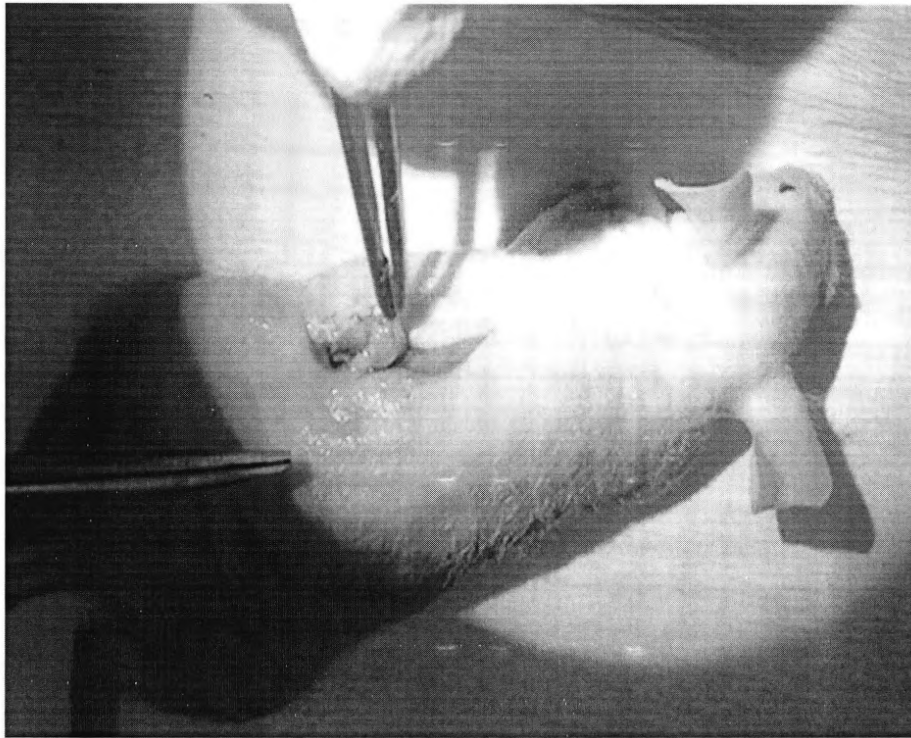


Фиг. 1

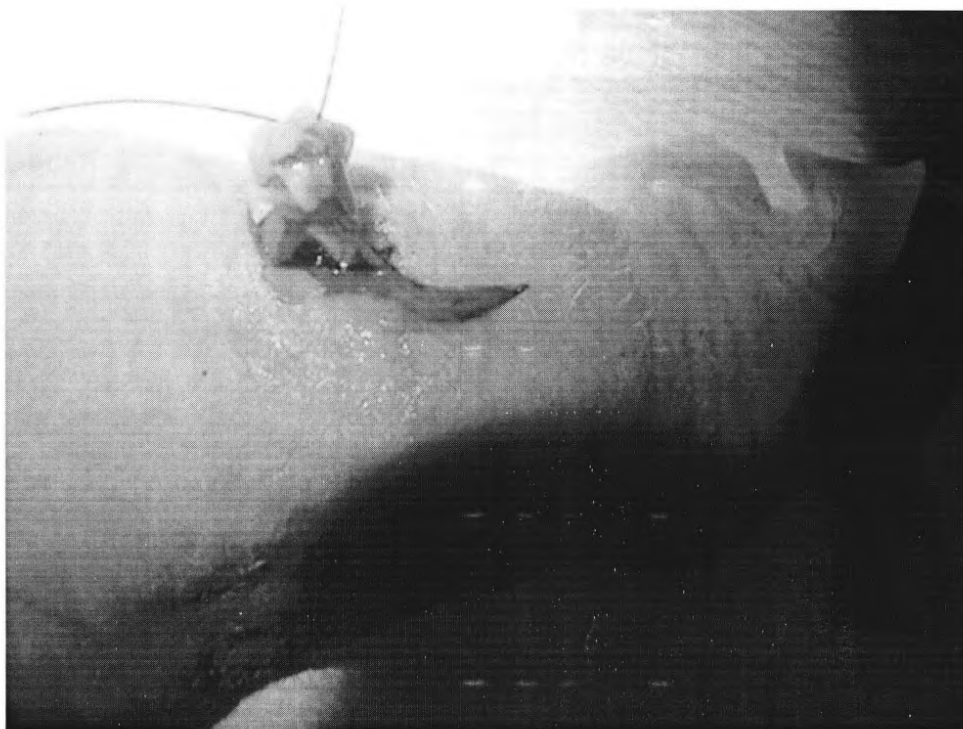
2



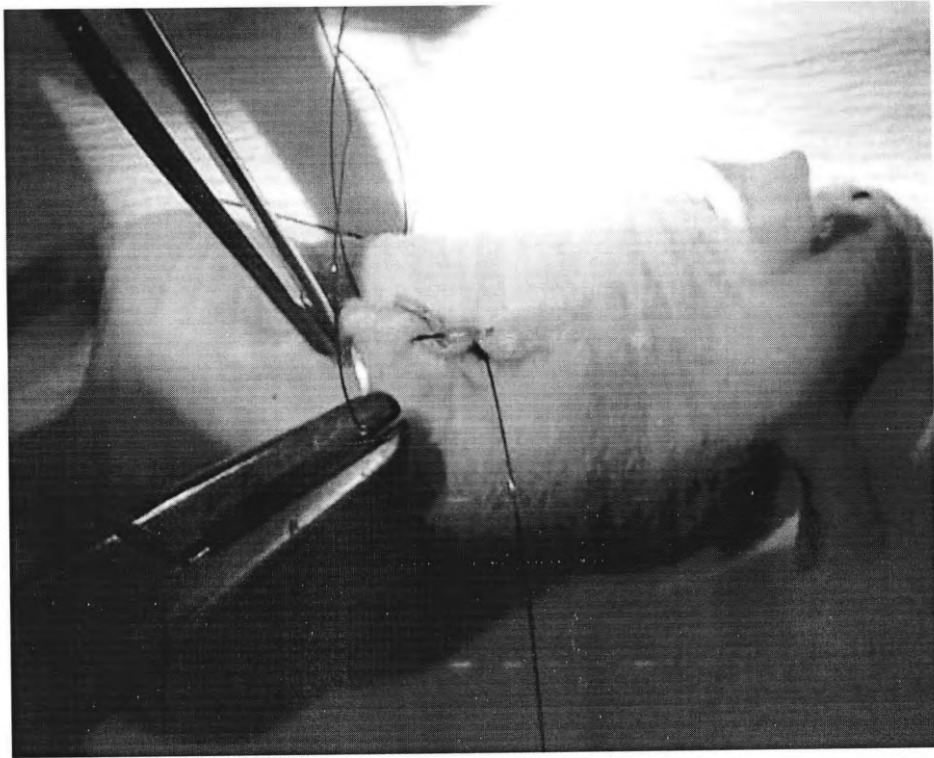
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5