

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2833143

Способ моделирования карциномы Герена в матке на фоне сахарного диабета

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), Погорелова Юлия Александровна (RU), Нескубина Ирина Валерьевна
(RU), Трепитаки Лидия Константиновна (RU), Сурикова Екатерина
Игоревна (RU), Черярина Наталья Дмитриевна (RU), Котиева Виолетта
Михайловна (RU), Верескунова Александра Алексеевна (RU), Черкасова Анна
Анатольевна (RU), Женило Оксана Евгеньевна (RU), Ишонина Оксана
Георгиевна (RU)*

Заявка № 2024121299

Приоритет изобретения 26 июля 2024 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 14 января 2025 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 26 июля 2044 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 833 143** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК
A61B 17/00 (2006.01)
A61M 25/01 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61K 35/13 (2015.01)
A61P 43/00 (2006.01)
G09B 23/28 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61B 17/00 (2024.08); A61M 25/01 (2024.08); A61K 31/505 (2024.08); A61K 35/13 (2024.08); A61P 43/00 (2024.08); G09B 23/28 (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2024121299, 26.07.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.07.2024

Дата регистрации:
14.01.2025

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 26.07.2024

(45) Опубликовано: 14.01.2025 Бюл. № 2

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),
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),
Черярина Наталья Дмитриевна (RU),
Котиева Виолетта Михайловна (RU),
Верескунова Александра Алексеевна (RU),
Черкасова Анна Анатольевна (RU),
Женило Оксана Евгеньевна (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: ФРАНЦИЯНЦ Е. М. и др. Влияние
сахарного диабета на содержание половых
гормонов и их рецепторов в ткани опухоли
при росте карциномы герена у самок крыс //
Research'n Practical Medicine Journal. 2022. N 1
стр. 23-32. RU 2498415 C1, 10.11.2013. RU
2776727 C1, 26.07.2022. CABRERA S. et al.,
Generation and characterization of orthotopic
murine models (см. прод.)

(54) Способ моделирования карциномы Герена в матке на фоне сахарного диабета

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно
к онкологии. Самкам белых беспородных крыс
внутрибрюшинно вводят аллоксан в дозе 15 мг/
100 г массы тела. Через 24 часа животным 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 в количестве (2,5-3,5)×10⁶
клеток. После введения маточный рог
перевязывают. Способ позволяет воспроизвести

RU 2 833 143 C1

RU 2 833 143 C1

модель карциномы Герена, развивающуюся на фоне сахарного диабета, что в свою очередь дает возможность изучить патогенез злокачественного

процесса и влияние на него коморбидной патологии, а также проводить поиск мишеней для таргетной терапии. 1 пр., 4 ил.

(56) (продолжение):

for endometrial cancer. Clin Exp Metastasis. 2012 Mar; 29 (3) p. 217-227. AL-JARRAH M. et al., Exercise training prevents endometrial hyperplasia and biomarkers for endometrial cancer in rat model of type 1 diabetes. J Clin Med Res. 2010 Oct 11; 2(5), p. 207-214. YANG X. et al., Targeting Cancer Metabolism Plasticity with JX06 Nanoparticles via Inhibiting PDK1 Combined with Metformin for Endometrial Cancer Patients with Diabetes. Adv Sci (Weinh). 2022 Mar;9(8), 2104472, p. 1-13. WARR C.G. et al., "Using Mouse and Drosophila Models to Investigate the Mechanistic Links between Diet, Obesity, Type II Diabetes, and Cancer" International Journal of Molecular Sciences 2018, 19, no. 12: 4110, p. 1-16.

RU 2833143 C1

RU 2833143 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61B 17/00 (2006.01)*A61M 25/01* (2006.01)*A61K 31/505* (2006.01)*A61K 35/13* (2015.01)*A61P 43/00* (2006.01)*G09B 23/28* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61B 17/00 (2024.08); *A61M 25/01* (2024.08); *A61K 31/505* (2024.08); *A61K 35/13* (2024.08); *A61P 43/00* (2024.08); *G09B 23/28* (2024.08)

(21)(22) Application: **2024121299, 26.07.2024**

(24) Effective date for property rights:
26.07.2024

Registration date:
14.01.2025

Priority:

(22) Date of filing: **26.07.2024**(45) Date of publication: **14.01.2025** Bull. № 2

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),
Shikhliarova Alla Ivanovna (RU),
Kaplueva Irina Viktorovna (RU),
Bandovkina Valeriia Akhtiamovna (RU),
Pogorelova Iuliia Aleksandrovna (RU),
Neskubina Irina Valerevna (RU),
Trepitaki Lidiia Konstantinovna (RU),
Surikova Ekaterina Igorevna (RU),
Cheriarina Natalia Dmitrievna (RU),
Kotieva Violetta Mikhailovna (RU),
Vereskunova Aleksandra Alekseevna (RU),
Cherkasova Anna Anatolevna (RU),
Zhenilo Oksana Evgenevna (RU),
Ishonina Oksana Georgievna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe biudzhetnoe
uchrezhdenie "Natsionalnyi meditsinskii
issledovatel'skii tsentr onkologii" Ministerstva
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)**

(54) **METHOD FOR MODELLING GUERIN CARCINOMA IN UTERUS WITH UNDERLYING DIABETES MELLITUS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to oncology. Alloxan is injected intraperitoneally in female white outbred rats in dose of 15 mg/100 g of body weight. After 24 hours, the animals into the lumen of the right uterine horn using an intravenous catheter with an injection port of 22G, 0.9×25 mm, 0.5 ml of a tumour suspension of Guerin carcinoma is introduced in amount of $(2.5-3.5) \times 10^6$ cells. After insertion, the

uterine horn is ligatured.

EFFECT: method enables to reproduce the Guerin carcinoma model developing with underlying diabetes mellitus, which in turn makes it possible to study the pathogenesis of the malignant process and the effect of the comorbid pathology on it, as well as to search for targets for the targeted therapy.

1 cl, 1 ex, 4 dwg

Изобретение относится к онкологии, а именно к экспериментальной онкологии, и может быть использовано для создания модели рака эндометрия на фоне сахарного диабета с целью изучения в эксперименте патогенеза рака эндометрия, развивающегося на фоне сахарного диабета.

- 5 Рак эндометрия (РЭ) является одним из наиболее распространенных гинекологических злокачественных новообразований и шестым по распространенности видом рака у женщин во всем мире, и его заболеваемость заметно возросла за последние два десятилетия. В 2020 году было зарегистрировано 544 000 новых случаев и 260 000 смертей от рака эндометрия во всем мире, при этом самые высокие показатели
- 10 заболеваемости и смертности в Северной Америке и Европе (см. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram J., Jemal A., et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209–249. doi: 10.3322/caac.21660.).

- Наиболее часто встречающиеся эндометриоидные карциномы низкой степени
- 15 злокачественности (ранее называемые карциномами I типа), как правило, связаны с хорошим прогнозом выживаемости пациентов (см. Morice P., Leary A., Creutzberg C., Abu-Rustum N., Darai E. Endometrial cancer. *The Lancet.* 2016; 387(10023):1094–1108. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00130-0.). Напротив, опухоли высокой степени злокачественности (эндометриоидные и неэндометриоидные опухоли высокой степени злокачественности),
- 20 такие как серозные светлоклеточные карциномы и недифференцированные карциномы и карциносаркомы (некоторые из них ранее назывались карциномами II типа), связаны со значительно худшим прогнозом: 5-летняя выживаемость достигает 14% для некоторых типов (см. Bendifallah S., Ouldamer L., Lavoue V., Canlorbe G., Raimond E., Coutant C., et al. Patterns of recurrence and outcomes in surgically treated women with endometrial
- 25 cancer according to ESMO-ESGO-ESTRO consensus conference risk groups: results from the FRANCOGYN study group. *Gynecol oncol.* 2017;144(1):107–112. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.10.025; Nama N., Cason F.D., Misra S., Hai S., Tucci V., Haq F., et al. Carcinosarcoma of the uterus: a study from the surveillance epidemiology and end result (SEER) database. *Cureus.* 2020;12(9):e10283–e). Патогенез данного заболевания тесно связан с
- 30 дисбалансом эстрогенов и нарушением обмена веществ. В последние годы с ростом частоты метаболических нарушений возросла заболеваемость и смертность больных РЭ во всем мире (см. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7–30. doi: 10.3322/caac.21590. Epub 2020 Jan 8. PMID: 31912902). Ожидается рост числа новых случаев РЭ из-за старения населения и увеличения распространенности
- 35 факторов риска, особенно ожирения (см. Frances L. Byrne, Amy R. Martin, Melidya Kosasih, Beth T. Caruana, Rhonda Farrell. The role of hyperglycemia in the pathogenesis of endometrial cancer. *Rakov (Basel).* 2020; 12(5):1191. doi: 10.3390/cancers12051191.).

- Были определены ряд факторов риска, связанные с повышенным риском развития РЭ, они включают ожирение, пожилой возраст, семейный анамнез рака эндометрия
- 40 или колоректального рака, наследственную предрасположенность (мутации MLH1 или MSH2 при синдроме Линча), раннее менархе, не вынашивание беременности, длительную неконтролируемую стимуляцию эстрогенами и позднюю естественную менопаузу (см. Torre L.A., Islami F., Siegel R.L., Ward E.M., Jemal A. Global cancer in women: burden and trends. *Epidemiol of cancer. Biomark. Prev.* 2017; 26:444–457. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-16-
- 45 0858; Raglan O., Kalliala I., Markozannes G., Cividini S., et al. Risk factors for endometrial cancer: a general review of the literature. *Int. J. Cancer.* 2019;145:1719–1730. doi: 10.1002/ijc.31961; Byrne F.L., Martin A.R., Kosasih M., Caruana B.T., Farrell R. The role of hyperglycemia in the pathogenesis of endometrial cancer. *Cancer.* 2020;12:1191. doi: 10.3390/

cancers12051191). Некоторые из этих факторов влияют на продолжительность и уровень воздействия на матку эстрогена и прогестерона.

Несколько лет назад основными факторами риска развития РЭ признаны ожирение и сахарный диабет (СД). Они имеют общую патофизиологическую основу

- 5 гиперинсулинемии и инсулинорезистентности (см. Sanz-Chavez TL, Vilar-Compte D, de Nicola-Delfin L, Meneses-Garcia A. Overweight, obesity, diabetes and hypertension in endometrial cancer. *Reverend Med. Inst. Mexico. Seguro. Social* 2013;51:326–329). Избыточный вес или ожирение, даже в детском и подростковом возрасте, является одним из сильнейших факторов, повышающих риск развития РЭ (см. Aune D., Navarro Rosenblatt D.A., Chan D.S., Vingeliene S., Abar L., Vieira A.R., Greenwood D.S., Bandera E.V., Norat T. Anthropometric factors and risk Endometrial cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Advanced research. Anna. Oncol.* 2015;26:1635–1648. doi: 10.1093/annonc/mdv142). Сахарный диабет – одно из самых разрушительных хронических заболеваний современности, поражающее людей во всем мире. Данное заболевание связано с повышенным риском
- 15 некоторых видов рака, включая РЭ, где эпидемиологические данные предполагают корреляционную взаимосвязь между распространенностью диабета и увеличением случаев рака эндометрия (см. Constantine G.D., Kessler G., Graham S., Goldstein S.R. Increased incidence of endometrial cancer following the women's health initiative: an assessment of risk factors. *J. Womens Health.* 2019;28:237–243. doi: 10.1089/jwh.2018.6956.). По результатам
- 20 мета-анализа было показано, что у женщин с сахарным диабетом риск развития рака эндометрия повышен на 72%. Гипергликемия, по-видимому, связана с более высокой вероятностью развития рака эндометрия независимо от ожирения (см. Byrne F.L., Martin A.R., Kosasih M., Caruana B.T., Farrell R. The role of hyperglycemia in endometrial cancer pathogenesis. *Cancers.* 2020;12:1191. doi: 10.3390/cancers12051191.). Высокий уровень
- 25 глюкозы в крови может служить источником предшественников клеточной пролиферации. Сообщается, что в клетках РЭ повышена экспрессия различных переносчиков глюкозы. Исследования клеточных линий рака эндометрия показали повышенный гликолиз и липогенез на основе глюкозы (см. Byrne F.L., Poon I.K.H., Modesitt S.C., Tomsig J.L., et al. Metabolic vulnerabilities in endometrial cancer. *Cancer Res.* 2014;74:5832–5845. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0254.).
- 30

Хроническая гипергликемия у пациенток с сахарным диабетом обеспечивает благоприятную среду для пролиферативной активности. Многие исследования *in vitro* и эксперименты на животных обнаружили связь между средой с высоким содержанием глюкозы и прогрессированием опухоли (см. Byrne F.L., Martin A.R., Kosasih M., Caruana B.T., Farrell R. The role of hyperglycemia in endometrial cancer pathogenesis. *Cancers.* 2020;12:1191. doi: 10.3390/cancers12051191.). Однако конкретная этиологическая связь между сахарным диабетом 2 типа (СД2) и раком эндометрия не совсем понятна. Протеомный анализ тканей эндометрия у крыс с диабетом показал, что диабет способствует развитию гиперплазии эндометрия.

- 40 N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 2 (GALNT2) была снижена у крыс с сахарным диабетом и гиперплазией эндометрия. Кроме того, GALNT2 был ниже в образцах ткани эндометрия и крови у женщин с гиперплазией эндометрия (см. Zhou X., Xu Y., Yin D., Zhao F., et al. Type 2 diabetes mellitus facilitates endometrial hyperplasia progression by activating the proliferative function of mucin O-glycosylating enzyme GALNT2. *Biomed. Pharmacother.* 2020;131:110764. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110764.). Также протеомный анализ выявил несколько белков, которые дифференциально экспрессируются в тканях рака эндометрия при наличии диабета. Биоинформатический анализ установил нарушение регуляции путей ERK1/2 и F-актина. Путь ERK1 / 2 контролирует клеточную пролиферацию,
- 45

дифференцировку и апоптоз. Это один из наиболее часто нарушаемых путей при злокачественных новообразованиях (см. Muhammad Mujammami, Mohammed Rafiullah, Assim A. Alfadda, Khalid Akkur, et al. Proteomic analysis of endometrial cancer tissue in patients with type 2 diabetes mellitus. *Life* (Basel). 2022;12(4):491. Published online March 28, 2022 doi: 10.3390/life12040491.).

Заболевания, связанные с гипергликемией (сахарный диабет 1 и 2 типов), имеют повышенный риск развития РЭ и зачастую плохой контроль уровня глюкозы в крови может быть важным фактором, способствующим росту этих опухолей у женщин. Три отдельных мета-анализа по этой теме показали, что сахарный диабет в значительной степени связан с двукратным риском развития РЭ (см. Zhang Z.-H., Su P.-Y., Hao J.-H., Sun Y.-H. The role of pre-existing diabetes mellitus in endometrial cancer morbidity and mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Int. J. Gynecol. Cancer*. 2013;23:294–303. doi: 10.1097/IGC.0b013e31827b8430). Кроме того, резистентность к инсулину, приводящая к гиперинсулинемии, также считается существенным фактором риска множественных форм рака. Фактически, клетки эндометрия имеют рецепторы, которые взаимодействуют с инсулином с высокой аффинностью (см. Lai Y., Sun Q. Association of abnormal glucose metabolism and insulin resistance in patients with atypical and typical endometrial cancer. *Oncol. Lett*. 2018;15:2173–2178. doi: 10.3892/ol.2017.7590; Sidorkiewicz I., Jozvik M., Nemira M., Kretovski A. Insulin resistance and endometrial cancer: a new role for microRNAs. *Cancer*. 2020; 12:2559. doi: 10.3390/cancers12092559.). Показано, что гипергликемия, вызванная сахарным диабетом 2 типа, заболеванием, ассоциированным с ожирением и инсулинорезистентностью, является еще одним независимым фактором риска развития РЭ и модификатором роста опухоли (см. Byrne F.L., Martin A.R., Kosasikh M., Caruana B.T., Farrell R. The role of hyperglycemia in the pathogenesis of endometrial cancer. *Cancer*. 2020;12:1191. doi: 10.3390/cancers12051191).

Lai Y. et al. (2018) показали, что СД2 в высокой степени ассоциирован с почти двукратным риском развития РЭ по сравнению с лицами без диабета или населением в целом, и положительная связь между диабетом и риском развития РЭ постоянно наблюдалась независимо от географического региона, плана исследования, года публикации и типа диабета (см. Lai Y, Sun Q. Association of abnormal glucose metabolism and insulin resistance in patients with atypical and typical endometrial cancer. *Oncol. Lett*. 2018; 15:2173–2178. doi: 10.3892/ol.2017.7590). В исследовании Zabulienė L. et al. (2021) описан значительно повышенный риск развития РЭ у женщин с диабетом по сравнению с общей популяцией. Наибольший риск РЭ был обнаружен среди более молодых пациентов с диагнозом СД2, и риск постепенно снижался с увеличением возраста, но продолжал оставаться значительно повышенным среди всех возрастных групп. Риск развития РЭ возрастал с увеличением продолжительности диабета, причем самый высокий риск РЭ наблюдался более чем через 10 лет после постановки диагноза СД2 (см. Lina Zabulienė, Auguste Kacenienė, Laura Steponavičienė, Donata Linkevičiūtė-Ulinskienė, et al. Risk of endometrial cancer in women with diabetes: a population-based retrospective cohort study. *J. Clin Med*. 2021;10(16):3453. doi: 10.3390/jcm10163453).

По сравнению с пациентками без диабета, у больных сахарным диабетом риск развития РЭ повышен в два раза. Кроме того, смертность пациенток с РЭ с сахарным диабетом (пациентов с РЭ +/диа+) увеличивается на 41%. В совокупности сахарный диабет важен в патогенезе и прогнозе РЭ. Однако в современной клинической практике не существует стандартного лечения для пациенток с РЭ + / dia +. Гипергликемия является основным клиническим признаком сахарного диабета, который также считается ключевым звеном между диабетом и раком (см. Wu D., Hu D., Chen H., Shi G., et al.

Glucose-regulated phosphorylation of TET2 by AMPK reveals a pathway linking diabetes to cancer. *Nature*. 2018;559(7715):637-641. doi: 10.1038/s41586-018-0350-5.). Следовательно, контроль уровня глюкозы в крови или воздействие на молекулярный сигнальный путь, касающийся метаболизма глюкозы, может быть новой перспективой для клинического

лечения пациентов РЭ + / dia +.

В систематическом обзоре и мета-анализе McVicker L. et al. (2022) обнаружили, что у больных раком эндометрия с уже существующим сахарным диабетом риск смерти от рака был повышен на 15% по сравнению с пациентками без диабета, но это не соответствовало результатам анализа всех подгрупп. У пациенток с сахарным диабетом был достоверно на 42% и 23% выше риск смертности от всех причин и прогрессирования или рецидива заболевания соответственно по сравнению с пациентками без диабета, что в целом было одинаковым при анализе подгрупп (см. Lauren McVicker, Contributing Writer Christopher R. Cardwell, Lauren Edge, et al. Survival outcomes in patients with endometrial cancer depending on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2022;22:427. doi: 10.1186/s12885-022-09510-7).

Механизмы, связанные с гипергликемией и гиперинсулинемией, могут лежать в основе наблюдаемого повышенного риска смерти от рака эндометрия у больных раком эндометрия с сахарным диабетом. Доклинические данные показали, что опухолевые клетки эндометрия изменяют метаболизм глюкозы по сравнению с нормальными клетками эндометрия, и это может способствовать пролиферации, адгезии и инвазии. До 93% так называемых опухолей эндометрия I типа (эндометриоидный тип) не имеют гомолога фосфатазы и тензина (PTEN) или имеют мутации в путях PI3K/Akt / mTOR, которые он регулирует (см. Byrne F.L., Martin A.R., Kosasikh M., Caruana B.T., Farrell R. The role of hyperglycemia in the pathogenesis of endometrial cancer. *Cancer*. 2020;12(5):1191. doi: 10.3390/cancers12051191). Эти пути поддерживают поглощение глюкозы (переносчики глюкозы) и метаболизм с целью подпитки роста клеток (см. Levin D.A., CGAR Network. Comprehensive genomic characteristics of endometrial cancer. *Nature*. 2013;497(7447):67–73. doi: 10.1038/nature12113). У больных раком эндометрия с наличием сахарного диабета высокий уровень глюкозы в крови может напрямую способствовать пролиферации опухолевых клеток, обеспечивая необходимый углерод из глюкозы для этих путей.

Путем создания клеточных линий IshikawaHG и IshikawaNG, ученые во главе с Xiao Yang (2022) обнаружили, что длительное культивирование с высоким содержанием глюкозы усиливает трансформацию метаболизма от окислительного фосфорилирования к гликолизу РЭ. Впоследствии, с помощью масс-спектрометрического протеомного скрининга, авторы обнаружили, что экспрессия PDK1, ключевого фермента гликолиза у IshikawaHG, была в 3,33 раза выше, чем у IshikawaNG. Дополнительно использовали shRNA для нокдауна PDK1 и обнаружили, что она значительно ингибирует пролиферацию, инвазию, гликолиз и сигнальный путь АКТ / GSK3 β / β -атенина IshikawaHG, что подтвердило роль PDK1 в злокачественном биологическом поведении клеток РЭ, индуцированном высоким содержанием глюкозы (см. Xiao Yang, Yuan Cheng, Jinyi Zhou, Lingpu Zhang, et al. Targeting cancer metabolic plasticity with JX06 nanoparticles via PDK1 inhibition in combination with metformin in endometrial cancer patients with diabetes mellitus *Adv Sci (Weinh)*. 2022;9(8): 2104472. doi: 10.1002/adv.202104472).

Итак, заболеваемость РЭ, развивающегося на фоне сахарного диабета, а также смертность от него растут, поэтому важно понять этиологию и патогенез этого заболевания, чтобы повысить эффективность лечения. Экспериментальные модели, могут улучшить понимание механизмов развития заболеваний высокого риска, к которым относят РЭ, развивающейся на фоне сахарного диабета, и оценить новые

методы лечения в доклинических исследованиях. Важным направлением онкологии, позволяющим изучать многие патогенетические аспекты злокачественного роста, которые, в силу известных причин, невозможно исследовать в клинике, является экспериментальная онкология.

5 Задачами экспериментальной онкологии являются изучение развития опухолевого процесса и модифицирующих его факторов, какими являются коморбидные заболевания, в частности, сахарный диабет, что способствует улучшению диагностики, лечения и профилактики опухолей человека. Использование различных экспериментальных
10 опухолей позволяет разрабатывать методы лечения новообразований и испытывать новые противоопухолевые средства. В последние годы экспериментальные модели сыграли жизненно важную роль в продвижении понимания патогенетических основ канцерогенеза, однако еще не достаточно моделей, повторяющих заболевания человека.

Перевиваемые опухоли имеют ряд значительных преимуществ перед спонтанными и индуцированными. Во-первых, они делают возможной постановку массовых
15 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. 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
20 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.).

25 Карцинома Герена по своим биологическим свойствам и морфологии в значительной мере сохранила свой эпителиальный характер (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
30 ткани человека и биорегуляторов стволовых и прогениторных клеток. Журн. АМН України. 2010; 16 (3): 492–506).

Для изучения рака эндометрия доступны пять основных классов экспериментальных моделей: модели спонтанного онкогенеза эндометрия у инбредных животных (крысы Donguи, крысы DA / Nan, крысы BDII / Nan), инокуляционные опухоли из фрагментов
35 опухолей (эндоопухоль крысы, опухоль EnCa 101 человека) или из инокулированных линий опухолевых клеток (крыса Клетки RUCA-I, клетки Ишикавы и ECC-1 человека), эстрогенное воздействие или воздействие химического канцерогена на мышей CD-1 и ICR, трансгенные подходы, такие как мыши, гетерозиготные по гену-супрессору опухоли PTEN (pten (+/-) -мыши) и линии опухолевых клеток эндометрия,
40 культивируемые в условиях, способствующих морфологии и функциям, подобным in vivo, например, культура клеток на восстановленной базальной мембране.

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:
45 experimental models useful for studying the molecular aspects of endometrial cancer and carcinogenesis. Cancer associated with the endometrium. 2003; 10(1):23-42. doi: 10.1677/erc.0.0100023.). Однако нет моделей рака эндометрия, развивающегося на фоне сахарного диабета.

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.).

Техническим результатом настоящего изобретения является создание модели карциномы Герена в матке самок белых беспородных крыс, развивающуюся на фоне сахарного диабета.

Поставленная цель достигается тем, что самкам белых беспородных крыс внутрибрюшинно вводят аллоксан в дозе 15мг/100 г массы тела, через 24 часа животным 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 в количестве $2,5-3,5 \times 10^6$ клеток.

Изобретение «Способ создания модели рака эндометрия на фоне сахарного диабета» является новым, так как оно неизвестно в области экспериментальных исследований в онкологии о развитии низкодифференцированного крысинного рака в матке самок крыс в сочетании с коморбидной патологией – сахарным диабетом.

Новизна изобретения заключается в том, что фрагмент карциномы Герена растет и развивается в правом роге матки самок крыс на фоне сахарного диабета.

Изобретение «Способ создания модели рака эндометрия на фоне сахарного диабета» является промышленно применимым, так как может быть использовано в научно-исследовательских учреждениях онкологического профиля для воспроизведения экспериментальной модели роста злокачественной опухоли, как модели рака эндометрия в сочетании с коморбидной патологией – сахарным диабетом, изучения ее роста, особенностей метастазирования.

«Способ создания модели рака эндометрия на фоне сахарного диабета» выполняется следующим образом.

Работа с животными проводилась в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах» (Директива 86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, а также в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава России от 19 июня 2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики». Все животные содержались в одинаковых условиях в стандартных пластиковых клетках по 5 особей при естественном освещении, температуре воздуха 22-26°C и свободным доступом к пище и воде. Животные ежедневно получали стандартный кормовой рацион и воду, проводили постоянное наблюдение с регулярным осмотром и взвешиванием. Манипуляции с животными производили в боксе с соблюдением общепринятых правил асептики и антисептики. Протокол этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России №1/211 от 27.01.2023; № 1/219 от 06.02.2024.

Воспроизведение сахарного диабета.

Самкам белым нелинейных крыс, весом 180-220г однократно внутрибрюшинно вводят аллоксан в дозе 150 мг/кг веса.

Подготовка карциномы Герена к перевивке. Инструменты, посуду, руки дезинфицировали обычным способом (см. Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Шихлярова А.И., Трепитаки Л.К., Сурикова Е.И., Бандовкина В.А., Нескубина И.В., Шумарин К.А., Котиева И.М. Способ моделирования первично-множественного роста

злокачественных опухолей с подавлением одной опухоли другой в условиях первичного иммунодефицита. Патент на изобретение RU 2750127 C1, 22.06.2021. Заявка № 2021102377 от 02.02.2021 г.).

После декапитации крысы-самки с растущей под кожей карциномой Герена, обрабатывают кожу животного над опухолью 70% спиртом. Отступив от опухоли 1 – 2 см отсепааровывают кожу и отгибают её таким образом, чтобы шерсть не попала внутрь. Выделяют подкожный опухолевый узел карциномы Герена, 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 приживления; кусочки ополаскивают стерильным физиологическим раствором. Опухолевую ткань измельчают механическим гомогенизатором и разводят стерильным физиологическим раствором. Для перевивки используют $(2,5 - 3,5) \times 10^6$ опухолевых клеток в 0,5 мл физиологического раствора.

Трансплантация карциномы Герена в матку самок крыс.

Через 24 часа после инъекции самкам аллоксана проводят операцию. Все оперативные вмешательства сопровождались с использованием ксилазин-золетилового наркоза. Ксилазин-золетилловый наркоз применяется для сопровождения крупных оперативных вмешательств, средней продолжительностью от 30 минут до 2-х часов. Ксиланит (ЗАО «НИТА-ФАРМ, Россия, г. Саратов) вводят внутримышечно 0,1 мл/100г веса животного. Далее через 10-15 минут вводят золетил («Virbac» Франция) в дозе 5мг/100г веса животного. Через 1-2 минуты пропадает рефлекс переворачивания, максимальный эффект достигается через 5-7 минут после инъекции. Наркоз верифицируют по исчезновению реакции на болевые раздражители (укол лапы) и угнетению роговичного рефлекса (см. Кадомцев Д.В., Пасечникова Е.А., Голубев В.Г. Золетил-ксилазиновый наркоз в экспериментах у крыс. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015;5-1:56-57; URL: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=6760> (дата обращения: 11.03.2024).

Белым беспородным крысам-самкам в условиях наркоза в асептических условиях (удаление шерсти и двукратная обработка дезинфицирующим раствором операционного поля) скальпелем проводилась срединная лапаротомия. Длина разреза 2 см. Мочевой пузырь, как правило, наполненный, выводился в рану и отклоняется кпереди. Осторожно потягивая за дольки сальника, в рану выводились маточные рога. Правый маточный рог фиксировался мягким пинцетом (см. Бородин Ю.И., Малыгин М.В., Асташов В.В., Маринкин И.О., Ларионов П.М., Мичурин И.Е., Третьякова Л.В. Способ моделирования опухоли тела матки для исследования ее регионарного лимфатического русла. Патент на изобретение RU 2220459 C1, 27.12.2003. Заявка № 2002116930/14 от 24.06.2002).

В просвет правого маточного рога с помощью внутривенного катетера с инъекционным портом 22G (0,9 x 25 mm) вводили 0,5 мл опухолевой взвеси, содержащей $2,5-3,5 \times 10^6$ клеток. Подсчет опухолевых клеток производился на клеточном анализаторе ADAMILLS (Nano Entek, Korea). Рог матки перевязывали кетгутом для предотвращения излития взвеси в брюшную полость. Затем рана трижды обрабатывалась антисептическим раствором (фурациллин 1:5000). Матка с ее рогами, мочевой пузырь, доли сальника возвращались в брюшную полость. Кетгутом 4/0 на атравматической игле тремя одиночными узловыми швами ушивался дефект брюшины. Таким же способом ушивалась кожа, операционная рана обрабатывалась 2% раствором H_2O_2 .

Повязка на рану не накладывалась в связи со сложностью ее фиксации и низким риском нагноения раны.

Далее в течение 2 недель у животных измеряли содержание глюкозы в крови. Высокое сывороточное содержание глюкозы, в пределах 15-30 ммоль/л у 100% животных свидетельствует о развитии СД. Через 3 дня после перевивки в месте введения взвеси

клеток карциномы Герена начинает пальпироваться опухолевый узел.

Наблюдение за развитием опухолевого процесса проводилось в течение 14 суток.

После умерщвления животных (ингаляция CO₂), по стандартной методике были изготовлены срединные продольные гистологические срезы с опухолевого узла,

толщиной 5-7 мкм, окрашенные гематоксилин-эозином и по Ван-Гизон. Результаты. Способ создания модели рака эндометрия на фоне сахарного диабета был воспроизведен на самках крыс. На момент перевивки карциномы Герена в рог матки, т.е. в первые сутки у самок (n=15) средний показатель глюкозы в крови составил 4,567±0,437 ммоль/л во второй день – 25,4±1,2 ммоль/л и оставался в этих пределах на протяжении всего срока исследования, таким образом, у крыс карцинома матки развивалась на фоне сахарного диабета.

Через 14 суток у животных диагностировано увеличение живота в объеме. Животные были подвергнуты эвтаназии. При вскрытии: в брюшной полости крыс с сахарным диабетом определялось множественное слизееобразующее опухолевое поражение, включая матку, брыжейку и внутренние органы (см. Фиг. 1 а, б).

Микроскопическое исследование гистологических препаратов опухоли.

Цитогистологическое исследование препаратов с ростом карциномы Герена в матке на фоне введения аллоксана, индуцирующего развитие сахарного диабета, выявило специфические патогенетические особенности злокачественного процесса. После перевивки клеточной взвеси карциномы Герена в правый рог матки на фоне введения аллоксана наблюдался агрессивный рост опухоли с формированием множества тесно прилегающих узлов, исходящих из матки, представляющей нетипичный локус для подкожно растущей опухоли. Фиг. 2 а-е представлена бурная злокачественная прогрессия, которая охватывала не только всю полость матки, но и распространялась на параовариальную клетчатку, органы брюшной полости, лимфоузлы. При этом было отмечено значительное накопление слизистого продукта в брюшной полости, исходящего из внутриматочной конгломерации опухолевых узлов. Об этом свидетельствовало окаймление опухолевых узлов широким слоем слизистых элементов в виде аморфной массы, контурированной слоями опухолевых клеток в параовариальной клетчатке. По периферии самих опухолевых узлов была структурно не характерная для карциномы Герена краевая зона, сформированная бледными вакуолизированными слизистыми клетками с ядрами, прижатыми к основанию мембран (см. Фиг. 2 а, б).

В средней зоне опухолевого узла можно было видеть скопления плотно расположенных клеток карциномы Герена, напоминающих железистые структуры (см. Фиг. 3). Эти клетки имели разный размер с доминирующей неправильной округлой или овоидной формой ядра с крупными глыбками хроматина и многочисленными фигурами патологического митоза, отмеченного в 7 – 8 из 10 полей зрения. Обращало внимание набухание цитоплазмы из-за избытка вакуолей с более светлым, чем цитоплазма содержимым. Процессу формирования секреторной активности карциномы Герена в матке при введении аллоксана способствовала развитая сеть кровеносных сосудов и кровоизлияния, внутри которых просматривались фрагменты ядер опухолевых клеток и вакуолизированные участки цитоплазмы. Множество секретирующих слизистых клеток имели характерные выводящие полости с базально расположенными ядрами.

Все вышеуказанные обстоятельства указывали на изменение гистоструктуры карциномы Герена, связанного с формированием клеток с муцинозным содержимым, что отвечало более низкодифференцированному типу опухоли (см. Wong R.W., Ralte A., Grondin K., Talia K.L., McCluggage W.G. Mucinous lesions of the gastric (gastrointestinal) type of endometrium: report of a series illustrating the spectrum of benign and malignant lesions. Am J Surg Pathol. 2020;44(3):406-419. doi: 10.1097/PAS.0000000000001381.).

Кроме аллоксан-индуцированных структурных преобразований опухоли, перевитой в виде взвеси клеток в правый рог матки, были выявлены патологические изменения в овидукте. Как видно из Фиг. 4, овидукт (яйцевод, фаллопиева труба), плотно спаянный с опухолевым узлом, отличался расширением внутреннего пространства и избыточной секрецией в эпителии складок собственной пластинки слизистой оболочки. Об этом свидетельствовало образование в эпителии крупных округлых капсул с секретом и обильным его выделением в расширенное межскладочное пространство.

Таким образом, морфологический контроль ортотопического роста карциномы Герена в матке в условиях применения индуктора сахарного диабета – аллоксана, показал, что подобная биохимическая среда значительно усугубляет злокачественный процесс, агрессия которого заключается не только в переходе самой опухоли к муцинозной низкодифференцированной форме, но и стиранию структуры матки и придатков с глубоким повреждением овидукта.

Технико-экономическая эффективность «Способ создания модели рака эндометрия на фоне сахарного диабета» заключается в том, что воспроизведение модели рака эндометрия, развивающегося на фоне сахарного диабета, изменяет ее злокачественный потенциал. Это дает возможность изучать патогенез злокачественного процесса и влияния на него коморбидной патологии, а также проводить поиск мишеней для таргетной терапии. Способ экономичен, доступен для исполнения.

(57) Формула изобретения

Способ моделирования карциномы Герена в матке на фоне сахарного диабета, заключающийся в том, что самкам белых беспородных крыс внутрибрюшинно вводят аллоксан в дозе 15 мг/100 г массы тела, через 24 часа животным 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 в количестве $(2,5-3,5) \times 10^6$ клеток, после введения взвеси правый маточный рог перевязывают.

1



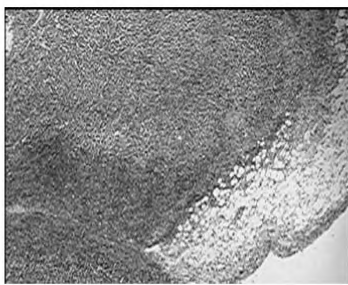
а



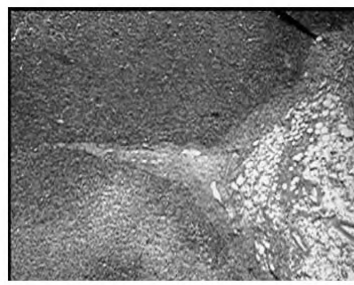
б

Фиг. 1

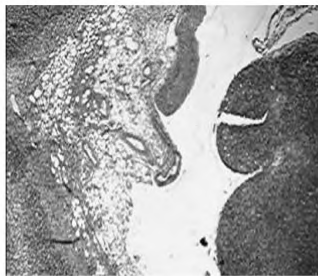
2



а



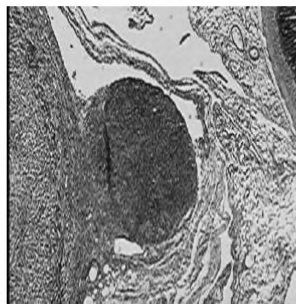
б



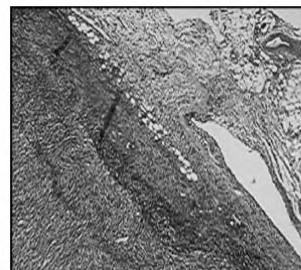
в



г

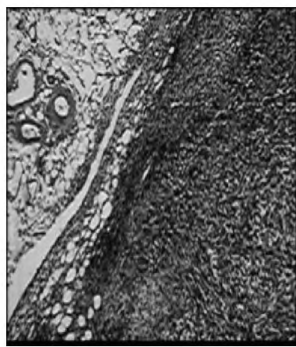


д

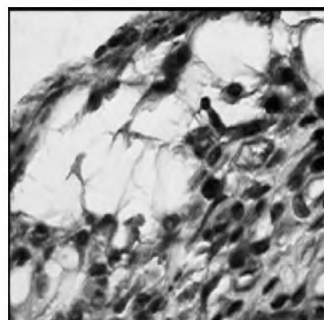


е

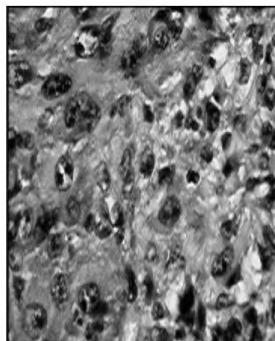
Фиг. 2



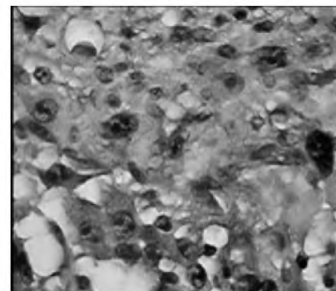
а



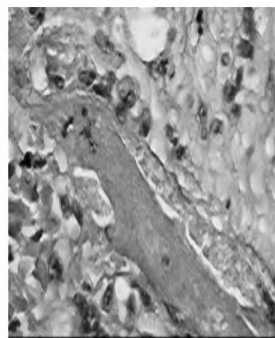
б



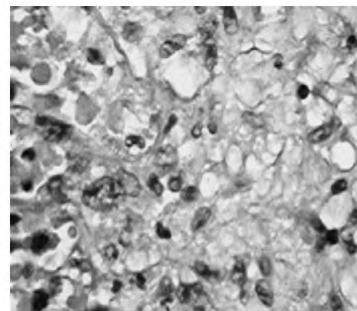
в



г

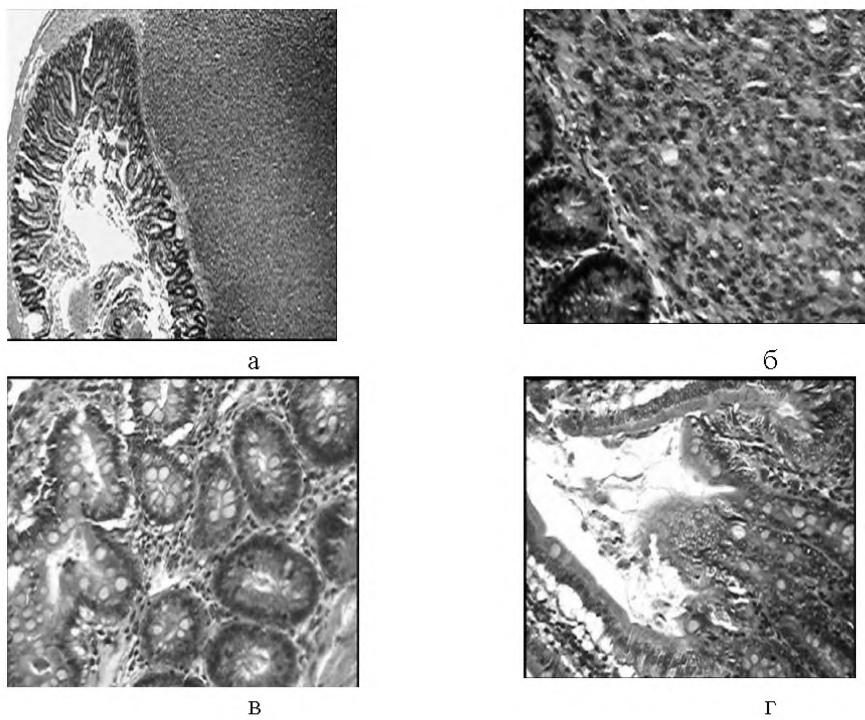


д



е

Фиг. 3



Фиг. 4