

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2790950

Способ доступа к телу желудка иммунодефицитных мышей при ортотопической трансплантации фрагмента опухоли желудка человека

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

Авторы: *Кит Сергей Олегович (RU), Максимов Алексей Юрьевич (RU),
Курбанова Луиза Зулкаидовна (RU), Карасёв Тимофей Сергеевич (RU),
Колесников Евгений Николаевич (RU), Гончарова Анна Сергеевна (RU),
Миндарь Мария Вадимовна (RU), Заикина Екатерина Владиславовна (RU),
Галина Анастасия Владимировна (RU), Гурова София Валерьевна (RU),
Ходакова Дарья Владиславовна (RU), Комарова Екатерина Фёдоровна (RU)*

Заявка № 2022110653

Приоритет изобретения 20 апреля 2022 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 28 февраля 2023 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 20 апреля 2042 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61B 17/00 (2022.08); G09B 23/28 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022110653, 20.04.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.04.2022

Дата регистрации:
28.02.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 20.04.2022

(45) Опубликовано: 28.02.2023 Бюл. № 7

Адрес для переписки:

344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я Линия, 63,
ФГБУН "НМИЦ онкологии", Ишониной О.Г.

(72) Автор(ы):

Кит Сергей Олегович (RU),
Максимов Алексей Юрьевич (RU),
Курбанова Луиза Зулкаидовна (RU),
Карасёв Тимофей Сергеевич (RU),
Колесников Евгений Николаевич (RU),
Гончарова Анна Сергеевна (RU),
Миндарь Мария Вадимовна (RU),
Заикина Екатерина Владиславовна (RU),
Галина Анастасия Владимировна (RU),
Гурова София Валерьевна (RU),
Ходакова Дарья Владиславовна (RU),
Комарова Екатерина Фёдоровна (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: SICKLICK J.K. et al. Generation of
orthotopic patient-derived xenografts from
gastrointestinal stromal tumor. J Transl Med, 2014
12, 41. RU 2709835 C1, 23.12.2019. CN 107137424
A, 08.09.2017. CA 2531916 A1, 17.02.2005.

КИБЛИЦКАЯ А.А. и др. Пути
моделирования опухолевого роста у мышей в
экспериментальных исследованиях рака
желудка человека, (см. прод.)

(54) Способ доступа к телу желудка иммунодефицитных мышей при ортотопической трансплантации
фрагмента опухоли желудка человека

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно
к экспериментальной онкологии. Рассекают кожу
и ткани брюшной стенки на протяжении 20 мм
вдоль оси туловища, начиная от окончания
мечевидного отростка и отступая от средней
линии 5 мм в сторону левого подреберья. При
этом конец разреза находится на расстоянии 25

мм от уретры. Выделяют желудок и делают
надрез в серозно-мышечном слое желудка длиной
3 мм. Пришивают фрагмент опухоли к желудку
в месте надреза при помощи лигатуры, после чего
осуществляют последовательное ушивание тканей
брюшной стенки и кожи непрерывным швом.
Способ позволяет осуществить оптимальный

доступ к телу желудка иммунодефицитной мыши для получения ортотопической пациентоподобной модели рака желудка, которая сохраняет характеристики, свойственные

первичному новообразованию у человека, а также не доставляет мыши дискомфорт после перенесенной операции. 5 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

Южно-Российский онкологический журнал, 2021; 2(4): 26-37. BERTRAM ILLERT et al. Detection of disseminated tumor cells in nude mice with human gastric cancer. 2003, 20(6), 549-554.

RU 2790950 C1

RU 2790950 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61B 17/00 (2022.08); *G09B 23/28* (2022.08)(21)(22) Application: **2022110653, 20.04.2022**(24) Effective date for property rights:
20.04.2022Registration date:
28.02.2023

Priority:

(22) Date of filing: **20.04.2022**(45) Date of publication: **28.02.2023** Bull. № 7

Mail address:

**344037, g. Rostov-na-Donu, ul. 14-ya Liniya, 63,
FGBUN "NMITS onkologii", Ishoninoj O.G.**

(72) Inventor(s):

**Kit Sergei Olegovich (RU),
Maksimov Aleksei Iurevich (RU),
Kurbanova Luiza Zulkaidovna (RU),
Karasev Timofei Sergeevich (RU),
Kolesnikov Evgenii Nikolaevich (RU),
Goncharova Anna Sergeevna (RU),
Mindar Mariia Vadimovna (RU),
Zaikina Ekaterina Vladislavovna (RU),
Galina Anastasiia Vladimirovna (RU),
Gurova Sofiia Valerevna (RU),
Khodakova Daria Vladislavovna (RU),
Komarova Ekaterina Fedorovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

**(54) METHOD FOR ACCESSING THE BODY OF THE STOMACH OF IMMUNODEFICIENCY MICE WITH
ORTHOTOPIC TRANSPLANTATION OF A FRAGMENT OF A HUMAN STOMACH TUMOR**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely to experimental oncology. The skin and tissues of the abdominal wall are dissected for 20 mm along the axis of the body, starting from the end of the xiphoid process and retreating from the midline 5 mm towards the left hypochondrium. The end of the incision is at a distance of 25 mm from the urethra. The stomach is isolated and an incision is made in the sero-muscular layer of the stomach 3 mm long. A fragment of the tumor is sutured to the stomach at the incision site with

a ligature, after which the tissues of the abdominal wall and skin are sequentially sutured with a continuous suture.

EFFECT: method allows optimal access to the body of the stomach of an immunodeficient mouse to obtain an orthotopic patient-like model of gastric cancer, which retains the characteristics characteristic of a primary neoplasm in humans, and also does not cause discomfort to the mouse after surgery.

1 cl, 5 dwg, 1 ex

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной онкологии, и касается способа обеспечения доступа к телу желудка иммунодефицитных мышей во время осуществления ортотопической трансплантации фрагмента опухоли желудка человека.

5 Рак желудка является четвертой причиной смертности от рака во всем мире (см. Sung H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA: a cancer journal for clinicians. – 2021. – V. 71. – №. 3. – P. 209-249). Отчасти это связано с бессимптомным характером заболевания, что часто приводит к поздней диагностике, когда возможности лечения ограничены (см. Li J. et al. Repression of PES1 expression inhibits growth of gastric cancer // Tumor Biology. – 2016. – 10 V. 37. – №. 3. – P. 3043-3049). Однако даже при успешном лечении больные раком желудка имеют высокий риск рецидива опухоли и приобретения лекарственной устойчивости.

Известно, что рецидивы данного заболевания возникают у 50% пациентов (см. Choi Y. Y., Cheong J. H. Beyond precision surgery: molecularly motivated precision care for gastric cancer // European Journal of Surgical Oncology. – 2017. – V. 43. – №. 5. – P. 856-864). Кроме того, за последние 20 лет доля больных раком желудка с возникновением метастаз выросла с 24 до 44%, что указывает на острую потребность в оптимизированном подходе как к лечению, так и к диагностике (см. Bernards N. et al. No improvement in median survival for patients with metastatic gastric cancer despite increased use of chemotherapy // Annals of oncology. – 2013. – V. 24. – №. 12. – P. 3056-3060). Таким образом, раннее выявление и мониторинг ответа опухоли на лечение имеют центральное значение в улучшении выживаемости пациентов.

Крайне важно лучше понимать молекулярные механизмы, лежащие в основе патогенеза рака желудка, чтобы облегчить разработку новых методов лечения, которые могут позволить улучшить выживаемость пациентов. Геномное секвенирование мыши и человека позволило определить их высокое сходство (см. Yannan Jiang, Yingyan Yu. Transgenic and gene knockout mice in gastric cancer research // Oncotarget. – 2017. – V. 8. – № 2. – P. 3696–3710). Кроме того, поскольку мыши показали превосходство над другими 30 видами лабораторных животных в отношении различных факторов, они привлекли внимание в качестве полезных моделей для раскрытия механизмов развития рака (см. Doyle A, McGarry MP, Lee NA, Lee JJ. The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease // Transgenic research. – 2012. – V. 21. – P. 327–349). Ряд полученных моделей рака желудка на лабораторных животных позволил получить 35 существенное представление о вкладе генетических факторов и факторов окружающей среды в возникновение и прогрессирование заболевания. На данный момент важно разработать аутентичную животную модель для имитации процесса канцерогенеза желудка человека.

Известен способ имплантации опухоли желудка человека под кожу иммунодефицитным мышам после осуществления разреза при помощи операционного ножа на расстоянии 10 мм от хвоста (см. Yan Ping, Xu Gang, Kang Lingling Zhao Hui, Li Yan and Tang Zhijiao, CN Patent No. 102380105A (21 March 2012)). Однако гетеротопическая трансплантация не обеспечивает создание реального микроокружения (см. Killion J. J., Radinsky R., Fidler I. J. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice // Cancer and Metastasis Reviews. – 1998. – V. 17. – №. 3. – P. 279-284.). 40

Известен способ имплантации опухоли при помощи инъекции суспензии опухолевых клеток рака желудка иммунодефицитным мышам в серозную часть желудка при помощи стеклянной микропипетки (см. Takaishi S. et al. Identification of gastric cancer stem cells

using the cell surface marker CD44 //Stem cells. – 2009. – V. 27. – №. 5. – P. 1006-1020.).

Однако суспензионный опухолевый материал не моделирует гетерогенность опухоли, в результате чего данная модель не отражает реальную картину клинического развития рака желудка человека (см. Lu J. et al. Establishment of gastric cancer patient-derived xenograft models and primary cell lines // Journal of Visualized Experiments. – 2019. – №. 149. – P. e59871).

Существует метод имплантации гомогенной измельченной опухоли в желудок лабораторной мыши (см. Kang W. et al. Development of a novel Orthotopic gastric Cancer mouse model //Biological procedures online. – 2021. – V. 23. – №. 1. – P. 1-12.). Данный способ отличается высокой результативностью, однако характеризуется чрезмерной сложностью хирургических манипуляций при имплантации опухоли иммунодефицитным мышам.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является разработка способа доступа к телу желудка иммунодефицитным мышам при ортотопической трансплантации фрагмента опухоли желудка человека, который позволит выполнить манипуляцию с наименьшими трудозатратами и наибольшей эффективностью.

Технический результат изобретения достигается тем, что рассекают кожу и ткани брюшной стенки на протяжении 20 мм вдоль оси туловища, начиная от окончания мечевидного отростка, отступая от средней линии 5 мм в сторону левого подреберья, конец разреза находится на расстоянии 25 мм от уретры, выделяют желудок, делают надрез в серозно-мышечном слое желудка длиной 3 мм, пришивают фрагмент опухоли к желудку в месте надреза при помощи лигатуры, после чего осуществляют последовательное ушивание тканей брюшной стенки и кожи непрерывным швом.

Способ осуществляют следующим образом.

Фрагмент опухоли, выделенный во время операции у пациента, помещают в питательную среду DMEM с содержанием 10 % гентамицина до момента операции. Начало имплантации опухоли производят не позднее 10-15 минут от момента получения фрагмента опухоли донора. Выделенный фрагмент осторожно очищают от некротизированных тканей при помощи хирургического лезвия и пинцета, после чего отрезают необходимый для имплантации материал объемом 3 мм³.

Реципиентом опухолевого материала служат иммунодефицитные мыши Balb/c Nude. Животное наркотизируют при помощи седативного препарата «Ксилазин» в концентрации 20 мг/мл и препарата для общей анестезии «Золетил 100» в концентрации 22,57 мг/мл внутримышечно.

После наркотизации производят послойное рассечение кожи и ткани брюшной стенки животного на протяжении 20 мм. Начало разреза находится в месте окончания мечевидного отростка, отступая 5 мм от срединной линии в сторону левого подреберья, конец разреза расположен на расстоянии 25 мм от уретры. Осуществляя расширение операционной раны при помощи анатомических пинцетов, визуализируют желудок, после чего выполняют его тупое отделение от тканей рядом расположенных органов. Далее делают надрез в серозно-мышечном слое желудка длиной 3 мм. Затем полученный фрагмент опухоли донора пришивают при помощи лигатуры к стенке желудка в месте создания разреза. Далее послойно зашивают брюшную полость и кожу животного.

Способ иллюстрируется следующими фигурами:

На Фиг 1 изображено рассечение кожи, мышц и ткани брюшной стенки иммунодефицитной мыши линии Balb/c Nude.

На Фиг 2 изображена имплантация фрагмента опухоли человека в тело желудка иммунодефицитной мыши линии Balb/c Nude.

На Фиг 3 изображено ушивание ткани брюшной стенки иммунодефицитной мыши

линии Balb/c Nude.

На Фиг 4 изображен конечный вид после трансплантации фрагмента опухоли желудка человека в тело желудка иммунодефицитной мыши линии Balb/c Nude.

На Фиг 5 изображен результат ортотопической трансплантации опухоли желудка человека иммунодефицитной мыши линии Balb/c Nude.

Данным способом произведена трансплантация фрагмента опухоли желудка человека в стенку тела желудка 30 иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude.

Приводим пример применения способа.

Приведенным способом была прооперирована самка иммунодефицитной мыши Balb/c Nude возрастом 7 недель массой 24 г. Для трансплантации использовался фрагмент опухоли желудка человека, помещенный в питательную среду DMEM, содержащую 10% гентамицина, сразу после ее выделения из организма пациента. От момента выделения материала из организма-донора до имплантации опухоли реципиенту прошло 14 минут. Для премедикации мыши использовали препарат «Ксилазин» в концентрации 20 мг/мл. Далее наркотизировали животное-реципиента при помощи препарата для общей анестезии «Золетил 100» в концентрации 22,57 мг/мл внутримышечно (см. патент на изобретение RU № 2712916 C1, опубл. 03.02.2020 г., Бюл. № 4). Далее послойно рассекали кожу, мышцы и ткани на брюшной части мыши на протяжении 20 мм от окончания мечевидного отростка, отступая 5 мм от срединной линии в сторону левого подреберья. Конец разреза располагался на расстоянии 25 мм от уретры. Осуществляя расширение операционной раны при помощи анатомических пинцетов, визуализировали желудок и отделяли его от тканей рядом расположенных органов. Далее производили рассечение серозно-мышечного слоя тела желудка по большой кривизне длиной 3 мм для последующей имплантации. Затем выделенный фрагмент опухоли донора пришивали, используя хирургический шовный материал, к стенке желудка в месте создания разреза. Оперативное вмешательство завершили послойным ушиванием брюшной полости и кожи животного.

Трансплантацию опухоли мышью-реципиент перенесла без осложнений и благополучно вышла из наркоза. В результате операции была получена модель ортотопического ксенографта опухоли желудка.

Технико-экономическая эффективность данного способа заключается в обеспечении доступа к телу желудка животного, и после ушивания операционной раны позволяет получить ортотопическую пациентоподобную модель рака желудка, которая сохраняет характеристики, свойственные первичному новообразованию у человека, а также не доставляет мыши дискомфорт после перенесенной операции. Данный способ позволяет с минимальным количеством вмешательств получить опухолевую модель для использования в доклинических исследованиях.

(57) Формула изобретения

Способ доступа к телу желудка иммунодефицитных мышей при ортотопической трансплантации фрагмента опухоли желудка человека, включающий наркотизацию мышей, послойное рассечение кожи, мышц и тканей брюшной стенки, выделение желудка и последующую имплантацию опухоли, отличающийся тем, что рассекают кожу и ткани брюшной стенки на протяжении 20 мм вдоль оси туловища, начиная от окончания мечевидного отростка, отступая от средней линии 5 мм в сторону левого подреберья, конец разреза находится на расстоянии 25 мм от уретры, выделяют желудок, делают надрез в серозно-мышечном слое желудка длиной 3 мм, пришивают фрагмент опухоли к желудку в месте надреза при помощи лигатуры, после чего осуществляют

последовательное ушивание тканей брюшной стенки и кожи непрерывным швом.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

1



Фиг.1



Фиг.2

2



Фиг.3



Фиг.4



Фиг.5