

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2650587

СПОСОБ МОДИФИКАЦИИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЬНОЙ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО РОСТА МЕЛАНОМЫ В₁₆ У МЫШЕЙ

Патентообладатель: *федеральное государственное бюджетное учреждение "Ростовский научно-исследовательский онкологический институт" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Кит Олег Иванович (RU), Франциянц Елена Михайловна (RU), Каплиева Ирина Викторовна (RU), Тренички Лидия Константиновна (RU), Котиева Инга Мовлиевна (RU)*

Заявка № 2017114818

Приоритет изобретения 26 апреля 2017 г.

Дата государственной регистрации в
Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 16 апреля 2018 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 26 апреля 2037 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 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017114818, 26.04.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.04.2017

Дата регистрации:
16.04.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.04.2017

(45) Опубликовано: 16.04.2018 Бюл. № 11

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Кит Олег Иванович (RU),
Франциянц Елена Михайловна (RU),
Каплиева Ирина Викторовна (RU),
Трепитаки Лидия Константиновна (RU),
Котиева Инга Мовлиевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
учреждение "Ростовский
научно-исследовательский онкологический
институт" Министерства здравоохранения
Российской Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2615908 C1, 11.04.2017. RU
2012123633 A, 20.12.2013. IN 264538 B,
09.01.2015. EA 9873 B1, 28.04.2008.

КАССИЛЬ Г.Н. Наука о боли. Академия
Наук СССР. Серия "Проблемы науки и
технического прогресса", 2-е дополненное
издание. Издательство "НАУКА" Москва,
1975. 400. LENTINI A. et al. Anti-invasive
effects of theophylline on experimental B16-
F10 (см. прод.)

(54) СПОСОБ МОДИФИКАЦИИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЮ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО РОСТА МЕЛАНОМЫ В₁₆ У МЫШЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальным исследованиям в онкологии, и может быть использовано при воспроизведении агрессивного атипичного роста меланомы В₁₆ у мышей. Способ включает модификацию хронической болью злокачественного роста меланомы. Для этого предварительно, за 2 недели до перевивки опухоли, создают модель хронической боли путем перевязки седалищных нервов с двух сторон. В последующем проводят подкожную имплантацию суспензии опухолевых клеток мышинной

меланомы В₁₆ в физиологическом растворе в объеме 0,5 мл в разведении 1:10. Оценку результатов эксперимента осуществляют через 1-4 недели после перевивки опухоли. Способ обеспечивает изменение патогенеза меланомы В₁₆ у мышей, что приводит к раннему выходу подкожных опухолей, раннему метастазированию, метастазированию в нетипичные места и к ранней гибели животных. Такая экономичная и доступная модель может быть использована для поиска путей медикаментозного лечения злокачественных

опухолей с обширным метастазированием. 1 табл.

(56) (продолжение):

melanoma lung metastasis, Cancer Journal 1997, 10(5), 274-278.

R U 2 6 5 0 5 8 7 C 1

R U 2 6 5 0 5 8 7 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

G09B 23/28 (2006.01)(21)(22) Application: **2017114818, 26.04.2017**(24) Effective date for property rights:
26.04.2017Registration date:
16.04.2018

Priority:

(22) Date of filing: **26.04.2017**(45) Date of publication: **16.04.2018** Bull. № 11

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Kit Oleg Ivanovich (RU),
Frantsiyants Elena Mikhajlovna (RU),
Kaplieva Irina Viktorovna (RU),
Trepitaki Lidiya Konstantinovna (RU),
Kotieva Inga Movlievna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
uchrezhdenie "Rostovskij
nauchno-issledovatel'skij onkologicheskij institut"
Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj
Federatsii (RU)****(54) METHOD OF THE MELANOMA B₁₆ MALIGNANT GROWTH IN MICE MODIFICATION WITH CHRONIC PAIN**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to experimental studies in oncology, and can be used in the reproduction of melanoma B₁₆ aggressive atypical growth in mice. Method involves the melanoma malignant growth modification with chronic pain. For this purpose, 2 weeks before the tumor is transplanted, creating a chronic pain model by tying the sciatic nerves from two sides. Subsequently, subcutaneous implantation of a suspension of tumor cells of murine melanoma B₁₆ is carried out in a physiological solution

in a volume of 0.5 ml in a dilution of 1:10. Evaluation of the experimental results is carried out in 1–4 weeks after the tumor is transplanted. Method provides a change in the melanoma B₁₆ pathogenesis in mice, leading to an early emergence of subcutaneous tumors, early metastasis, metastasis into atypical sites, and to early death of animals.

EFFECT: such an economical and affordable model can be used to find ways of malignant tumors with extensive metastasis drug treatment.

1 cl, 1 tbl

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной онкологии, и может быть использовано для модификации злокачественного процесса мышинной меланомы B₁₆ путем создания более агрессивной модели опухолевого роста и метастазирования меланомы в эксперименте.

5 Хроническая боль является распространенным состоянием, которое оказывает существенное влияние на работоспособность, функциональную активность и качество повседневной жизни и одновременно поводом для огромных расходов на здравоохранение. Она связана с ограничением трудоспособности, снижением качества жизни, финансовой несостоятельностью, семейными проблемами. Столь высокая
10 распространенность острых и хронических болевых синдромов, их тяжелое гуманитарное, социальное и экономическое бремя заставило значительно активизировать за рубежом фундаментальные и клинические исследования, оптимизировать организацию медицинской помощи (созданы специализированные центры и клиники боли), вынести рассмотрение проблемы на правительственный
15 уровень. В результате в медицине сформировалось новое направление - медицина боли. Наряду с этим в нашей стране наблюдается значительное отставание как в активности научных исследований, так и в медицинской помощи больным с различными болевыми синдромами. Несмотря на значительный прогресс в понимании нейрофизиологии и психологии боли, фундаментальные и клинические аспекты проблемы хронической
20 боли остаются во многом нерешенными (см. Яхно Н.Н., Кукушкин М.Л. Хроническая боль: медико-биологические и социально-экономические аспекты. Вестник РАМН. 2012; 9: 54-58).

Так, установлено, что боль вызывает анурию, влияет на работу сердечно-сосудистой системы, ЖКТ, селезенку, железы внутренней секреции и т.д. Длительная хроническая
25 боль перестраивает деятельность всех отделов спинного и головного мозга, ухудшается зрение, притупляется слух и обоняние. Течение биохимических процессов в организме изменяется, одни ферменты усиливают свою активность, другие ослабляют ее. Даже способность лейкоцитов крови захватывать бактерии (фагоцитоз) резко снижается. А это говорит о том, что при боли страдают иммунные свойства организма, т.е.
30 способность его бороться с инфекцией. Согласно исследованиям С.М. Дионесова боль снижает сопротивляемость организма к развитию злокачественных опухолей [Кассиль Т.Н. Наука о боли. (см. Академия Наук СССР. Серия «Проблемы науки и технического прогресса»). 2-е дополненное издание. М.: Наука. 1975. 400 с.).

Боль является одним из самых распространенных симптомов у онкологических
35 больных, с прогрессированием заболевания - ее частота увеличивается. Тип боли и ее интенсивность зависят от местоположения опухоли и стадии болезни. Боль присутствует у 30-50% больных при проведении противоопухолевой терапии и у 65-90% пациентов с прогрессированием онкопроцесса, 33% пациентов страдают от боли после окончания противоракового лечения (см. Foley KM., Van den Beuken-van Everdingen MH и др., 2007,
40 Leppert W и др., 2016). Причины боли у онкологических больных, как правило - многофакторные: прямые и косвенные эффекты рака, побочное действие противоопухолевой терапии, сопутствующие заболевания, а патофизиологические механизмы сочетанные, включая как ноцицептивный (соматический и/или висцеральный), так и нейропатический (неврологический) компоненты (см. Leppert W. и др., 2016).

45 Эксперимент позволяет дать ответы на многие вопросы, в том числе и в отношении хронической боли при онкологической патологии. Так, путем инокуляции клеток саркомы Meth A в непосредственной близости от седалищного нерва у BALB / с мышей был создан болевой синдром нейропатического генеза: опухоль растет и постепенно

сдавливает нерв, тем самым вызывая его повреждение. В данном эксперименте были выявлены термическая гипералгезия и механическая аллодиния в ипсилатеральной задней лапке на начальном этапе. Дальнейший рост опухоли вызвал понижение механической чувствительности, в то время как тепловая гипералгезия и признаки спонтанной боли по-прежнему сохранялись (см. Shimoyama M., Tanaka K., Hasue F., Shimoyama N. A mouse model of neuropathic cancer pain. *Pain*. 2002 Sep; 99(1-2): 167-74). У мышей с опухолями костей конечностей было выявлено несколько вариантов изменения периферической чувствительности ноцицепторов. У нормальной мыши нейромедиаторы высвобождались в спинном мозге только в ответ на сильное болевое раздражение. У мыши с костным раком в ответ на обычную безболезненную пальпацию зоны, пораженной опухолью, происходило высвобождение вещества Р в центростремительных волокнах, с последующей активизацией рецепторов нейрокининовой системы особой субпопуляции нейронов спинного мозга, что сопровождалось повышением болевых ощущений (Hunt & Mantyh, 2001; Mantyh et al, 1995a, 1995b).

Аналогичным образом, обычно безболезненная пальпация у мышей с опухолевым поражением конечностей вызывало также появление c-fos протеина в нейронах спинного мозга. У нормальных животных, не имеющих рака, только сильные болевые стимуляторы способны были вызывать появление c-fos протеина в спинном мозге. Таким образом, ноцицепторы под воздействием особых опухолевых аллогенов вовлекаются в процесс генерирования и поддержания костной раковой боли.

Однако ответа на вопрос: участвует ли хроническая боль, в свою очередь, в прогрессировании экспериментальных опухолей и если - да, то каким образом, мы не нашли. Идеальной опухолевой моделью для решения этой задачи является меланомы В₁₆, спонтанно возникшая у основания уха мыши линии С57BL/6. Опухоль перевивается в 100% случаев, достаточно быстро растет и при стандартной подкожной перевивке (на 12-16 сутки роста, 0,5 мл взвеси опухолевой ткани в растворе Хенкса или среде 199 (1:10)) метастазирует преимущественно гематогенно в легкие (60-90%), реже - в печень и селезенку (см. Софьина З.П. и др. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. - М.: Медицина, 1980. - 296 с.; Dingemane K.P. et al. B-16 Melanoma Metastasis in Mouse Liver and Lung I *Urn. Metast.* - 1985. - №5. - P. 50-60).

Техническим результатом настоящего изобретения является разработка способа модификации злокачественного роста меланомы В₁₆ хронической болью у мышей.

Технический результат достигается тем, что предварительно, за 2 недели до перевивки опухоли, создают модель хронической боли путем перевязки седалищных нервов с двух сторон, с последующей подкожной имплантацией суспензии опухолевых клеток мышью меланомы В₁₆ в физиологическом растворе в объеме 0,5 мл и в разведении 1:10 и оценкой результатов эксперимента через 1-4 недели после перевивки опухоли.

Изобретение «Способ модификации хронической болью злокачественного роста меланомы В₁₆ у мышей» является новым, так как оно неизвестно в области экспериментальных исследований в онкологии о модификации роста меланомы В₁₆ у мышей.

Новизна изобретения заключается в предваряющем подкожную перевивку меланомы В₁₆ воссоздании модели хронической боли у мышей, что способствует более ранней гибели животных и развитию патогенеза меланомы В₁₆ по иному «сценарию», чем при стандартном способе перевивки.

Изобретение «Способ модификации хронической болью злокачественного роста

меланомы В₁₆ у мышей» является промышленно применимым, так как может быть использовано в научно-исследовательских учреждениях онкологического профиля для воспроизведения экспериментальной модели злокачественного процесса (меланомы В₁₆) у мышей, протекающего на фоне хронического болевого синдрома, с целью изучения особенностей патогенеза этого процесса и дальнейшей разработки методов его экспериментальной коррекции.

Способ модификации хронической болью злокачественного роста меланомы В₁₆ у мышей выполняется следующим образом.

Все манипуляции с животными производятся в боксе. Инструменты, посуду, руки дезинфицируют общепринятым способом. Каждому животному вводят ксилазолетилловый наркоз: за 10 минут до основного наркоза с целью премедикации животному внутримышечно вводят ксилазин (препарат Ксила) в дозе 0,05 мл/кг массы тела (по инструкции), затем - Золетил-50 в дозе 10 мг/100 г массы тела.

После наступления медикаментозного сна ассистент фиксирует мышь в положении на животе, удаляет шерсть сзади в районе проекции седалищных нервов и смазывает кожу 70% спиртом. Экспериментатор в стерильных условиях выделяет седалищный нерв, накладывает на него лигатуру, ушивает рану послойно и обрабатывает шов 5% спиртовым раствором йода. Через 2 недели после заживления операционной раны подкожно вводят 0,5 мл взвеси опухолевых клеток мышиной меланомы В₁₆ в физиологическом растворе в разведении 1:10. Для этого, соблюдая все условия асептики, описанные выше, ассистент фиксирует мышь спиной кверху, предварительно сбрив шерсть и обработав кожу 5% спиртовым раствором йода чуть ниже правой лопатки. Экспериментатор рукой в стерильной перчатке захватывает кожную складку, в центре которой прокалывает кожу и вводит опухолевую взвесь. Затем извлекает иглу, место введения плотно прижимает ватным тампоном, смоченным в 70% спирте с небольшим добавлением йода, на 1 минуту, чтобы исключить вытекание вводимой взвеси. Контролем служили животные с перевивкой меланомы В₁₆ в той же дозе и объеме, что и в основной группе, но без воспроизведения модели хронической боли.

Через 15 дней мыши основной группы (14 штук) началидохнуть. Средняя продолжительность их жизни составила $19,17 \pm 1,35$ дней, максимальная - 24 дня. В контрольной группе (11 мышей) - первая смерть наступила на 24 сутки, средняя продолжительность их жизни составила $30,25 \pm 1,67$ дня, максимальная - 36 дней.

Таблица 1.

Влияние хронической боли на злокачественный рост меланомы

B16 у самок мышей.

		Меланома B16				Меланома B16+боль		
		1 нед	2 нед	3 нед	4 нед	1 нед	2 нед	3 нед
	Количество мышей	11	11	11	8	14	11	5
	средний размер, см ³	нет	0,85 ±0,12	2,75 ±0,73	4,69 ±0,86	0,70 ±0,25	1,65 ±0,27	2,50 ±0,49
	минимальный размер, см ³	-	0,12	0,44	1,29	0,24	1,01	1,35
	максимальный размер, см ³	-	1,48	8,77	9,30	1,35	2,22	3,75
	количество мышей с некрозом опухоли	-	нет	1	1	нет	3 (3 - 5мм)	3 (2-9 мм)
	количество мышей с 2 опухолевыми узлами	-	-	-	-	4	4	1
	наличие визуальных метастазов	нет	нет	нет	есть	есть	есть	есть
	зоны метастазирования	-	-	-	селезенка (1 из 8)	сердце (1 из 3)	сердце (2 из 3), легкие (2 из 3)	сердце (3 из 5), легкие (2 из 5), печень (1 из 5), матка (1 из 5)
	количество мышей в предтерминальном состоянии	-	-	2	1	1	4	3

Как видно из представленной таблицы подкожные опухоли появлялись у мышей основной группы уже через 1 неделю после перевивки, у группы сравнения - через 2 недели. Средний объем подкожных опухолей у мышей со временем увеличивался. Однако у группы сравнения подкожная опухоль росла более активно. Так ее средний размер со 2 по 3 неделю увеличился в 3,2 раза, а с 3 по 4 - в 1,7 раза, в то время как у мышей основной группы средний размер опухоли с 1 по 2 неделю увеличился в 2,3 раза, а со 2 по 3 неделю - в 1,5 раза. В результате, у мышей основной группы, средний размер опухоли на 2 неделе эксперимента был в 1,9 раза больше, чем у группы сравнения в это же время, а на 3 неделе - достоверно не отличался от нее. Минимальный размер впервые зафиксированных подкожных опухолей у мышей основной группы (на 1 неделе) был в 2 раза больше, чем у группы сравнения (на 2 неделе), в то время как максимальный размер опухоли на 3 неделе эксперимента у мышей из группы сравнения (без боли) был в 2,5 раза больше, чем у мышей с болью. При этом у большинства мышей с болью 3

неделя - предтерминальный период, а у мышей из группы сравнения - нет.

Несмотря на то, что у мышей с болью объем опухоли нарастал менее активно, у значительного количества мышей на разных этапах исследования, начиная уже с 1 недели, отмечался ее 2-х фазный рост. Кроме того, поверхностный некроз опухоли появлялся на неделю раньше и у большего количества животных, чем в группе сравнения.

У мышей из основной группы меланомы B₁₆ велась себя более агрессивно, поскольку метастазировала чаще, иногда в несколько органов и имела нетипичные для себя зоны метастазирования. Метастазы у мышей с болью регистрировались уже через неделю после перевивки, а у мышей без боли - через 4 недели. У мышей с болью опухоль метастазировала кроме типичных мест: в печень, селезенку и легкие, еще и в нетипичные: сердце, матку.

У мышей из основной группы мыши в предтерминальном состоянии регистрировались уже на 1 неделе после перевивки, с развитием процесса их относительное количество увеличивалось. У группы сравнения - с 3 недели.

Технико-экономическая эффективность «Способ модификации хронической болью злокачественного роста меланомы B₁₆ у мышей» заключается в том, что боль изменяет патогенез меланомы B₁₆ у мышей, приводящей к раннему выходу подкожных опухолей, раннему метастазированию, метастазированию в нетипичные места и приводящей к ранней гибели животных. Разработанный способ может служить моделью для поиска путей медикаментозного лечения злокачественных опухолей с обширным метастазированием. Способ экономичен, доступен.

(57) Формула изобретения

Способ модификации хронической болью злокачественного роста меланомы B₁₆ у мышей, включающий предварительное, за 2 недели до перевивки опухоли, создание модели хронической боли путем перевязки седалищных нервов с двух сторон, с последующей подкожной имплантацией суспензии опухолевых клеток мышинной меланомы B₁₆ в физиологическом растворе в объеме 0,5 мл и в разведении 1:10 и оценкой результатов эксперимента через 1-4 недели после перевивки опухоли.