ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ
(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **BY** (11) **24745**
(13) **C1**
(45) **2025.12.05**
(51) МПК
G 09B 23/28 (2006.01)

(54) СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ

(21) Номер заявки: a 20240171
(22) 2024.07.26
(71) Заявитель: Учреждение образования "Гродненский государственный медицинский университет" (BY)
(72) Авторы: Кузнецов Олег Евгеньевич; Цыркунов Владимир Максимович (BY)
(73) Патентообладатель: Учреждение образования "Гродненский государственный медицинский университет" (BY)
(56) CN 114051974 A, 2022.
CN 114027256 A, 2022.
RU 2538243 C1, 2015.
BY 22392 C1, 2019.
RU 2799132 C1, 2023.
CN 110568174 A, 2019.

(57)
Способ моделирования гепатоцеллюлярной карциномы, при котором самцу крысы вводят однократно внутрибрюшинно 100 мкл суспензии, содержащей $2 \cdot 10^5$ клеток аденокарциномы печени мышей Hepa 1-6, и 1 раз в неделю в течение 4 недель 0,5 мл суспензии вирусной ДНК гепатита В с концентрацией 32,02 ± 28,44 мкг/мл.

Изобретение относится к области биологии и экспериментальной онкологии, и касается моделирования опухолевых процессов в опытах на животных (крысах), и может быть использовано при проведении экспериментальных исследований для изучения патомеханизмов развития опухолевых процессов в печени.

Возбудители инфекционных болезней играют важную роль в этиологии многих заболеваний, в том числе и злокачественных опухолей. Из миллионов новых случаев рака, ежегодно регистрируемых в мире, около 15 % из них связаны с различными видами инфекций. При этом основная роль в инфекционном канцерогенезе принадлежит различным вирусам (64,2 %) [1].

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) - наиболее распространенная первичная злокачественная опухоль печени. ГЦК образуется из гепатоцитов, может расти в виде одиночного или множественных узлов, а также быть инфильтративной и метастазировать в другие органы, например в легкие. Количество новых диагностируемых случаев ГЦК непрерывно растет как среди мужчин, так и среди женщин. ГЦК занимает 3 место в списке основных причин смерти от онкозаболеваний. Смертность от ГЦК в мире достигает 600 000 человек в год [2]. Таким образом, ГЦК является одной из самых агрессивных опухолей.

В настоящее время отсутствуют эффективные способы моделирования гепатоцеллюлярной карциномы печени у животных для возможного проведения доклинических исследований химиотерапевтических препаратов, в том числе с возможностью экспериментального моделирования вирусного процесса.

BY 24745 C1 2025.12.05

Известен способ развития опухолей (спонтанных), возникающих у чистопородных высокораковых линий животных (мышей) без участия экспериментатора, для оценки противоопухолевого действия химиотерапии [3].

Однако в такой саморазвивающейся модели невозможно установить сроки возникновения и формирования опухолей у животных, а также стандартизировать опухоль по локализации и размерам, что делает такой вид экспериментальных опухолевых моделей непригодным для использования в качестве модели для проведения и оценки эффективности химиотерапии

Известен способ создания опухолей (индуцированных), появляющихся под действием канцерогенов, вводимых в организм подопытного животного [4].

Значительными недостатками метода являются неравномерность развития опухолей, частые случаи их рассасывания - более 50-60 %, длительность опыта - от 4 до 16 месяцев.

Известны способы создания внутриорганной опухоли печени у крыс путем пункционного введения 0,1 мл 20 % взвеси клеток перевитой подкожно гепатокарциномы (Г-27) [5].

Однако недостатком такого способа является необходимость проведения оперативного вмешательства в момент введения опухолевой взвеси клеток либо в печень крыс одной стороны, с другой - образовавшийся опухолевый процесс в печени нельзя считать метастазом, поскольку отсутствует первичный очаг, дающий метастатические отсевы.

Известен способ моделирования метастазов в печень путем введения клеток опухоли Льюиса мышам линии C57B1/6 или гибридам первого поколения в селезенку [6].

Однако описанный способ сложен для выполнения и позволяет получить только метастазы.

Из просмотра доступной литературы нам не удалось найти источник, который мог бы служить прототипом заявляемого изобретения.

Задача изобретения - разработка способа моделирования гепатоцеллюлярной карциномы у крыс, в том числе вирусного генеза.

Поставленная задача решается путем однократного введения самцу крысы внутрибрюшинно 100 мкл суспензии, содержащей $2 \cdot 10^5$ клеток аденокарциномы печени мышей Hepa 1-6, и 1 раз в неделю в течение 4 недель 0,5 мл суспензии вирусной ДНК гепатита В с концентрацией 32,02 ± 28,44 мкг/мл.

Способ осуществляют следующим образом.

Клетки, полученные из аденокарциномы печени мышей Hepa 1-6 культивируют в среде ДМЕМ (DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium), содержащей 7-10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 2 мМ L-Глютамина и антибиотики (пенициллин/стрептомицин) при 37-38 °С, 5 % CO_2 и 93-96 % влажности [7, 8], тестируют на наличие различных видов внутриклеточных микроорганизмов (хламидии, уреаплазмы, микоплазмы) и вирусов. Для выявления бактериальной и вирусной внутриклеточной контаминации используют стандартизированные методы молекулярной биологии (полимеразная цепная реакция) в соответствии с инструкциями производителя. Отбирают только те клетки, которые не подвержены бактериальной и вирусной контаминации.

На следующем этапе в суспензии клеток аденокарциномы печени мышей Hepa 1-6 методом иммуноферментного анализа оценивают концентрацию маркерного белка гепатокарциномы - альфафетопротеина (АФП). Для этого через 48 ч после пересева клетки Hepa 1-6 отмывают фосфатным буфером и переносят в стерильную пробирку, где клетки лизируют 10 мин буфером в хладотермостате при 2-8 °С, содержащим ингибитор протеолиза, после центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 мин и собирают супернатант. Полученные лизаты хранятся при температуре -70 °С в течение 2 месяцев. Затем клетки из лизатов отмывают 2 раза фосфатным буфером с трипсином/ЭДТА и вводят самцу крысы (линия Wistar) внутрибрюшинно 100 мкл с концентрацией $2 \cdot 10^5$ однократно. Дополнительно вводят внутрибрюшинно 1 раз в неделю в течение 4 недель 0,5 мл вирусной ДНК гепатита В с концентрацией 32,02 ± 28,44 мкг/мл в виде суспензии клеток, приготовлен-

ной на физиологическом растворе или среде Игла или среде 199 клетки, полученные после гомогенизирования 0,5-1,0 г в 5-10 мл среды.

Гепатоцеллюлярная карцинома развивается на 44 сутки после первой инъекции.

Приводим доказательства возможности осуществления способа.

В исследовании использовались крысы линии Wistar. В ходе создания модели опухоли был поставлен ряд экспериментов.

Пример 1.

Определение оптимального количества клеток Hepa 1-6, вводимых животным. Для инъекции животным были выбраны три различные концентрации клеток: $2\cdot10^3$, $2\cdot10^4$, $2\cdot10^5$. В эксперименте использованы 12 самцов (линии Wistar). Животные были разделены на группы. Животным каждой группы вводили внутрибрюшинно суспензию, содержащую $2\cdot10^3$-$2\cdot10^6$ клеток Hepa 1-6 и в течении 4 недель 1 раз в неделю 0,5 мл суспензии вирусной ДНК гепатита В с концентрацией 32,02 ± 28,44 мкг/мл. На 30-60 день после инъекции животных осматривали. Показано, что к 44 суткам в группе с введением суспензии, содержащей $2\cdot10^5$ клеток, ГЦК развилась у трех из четырех особей, в группе $2\cdot10^4$ клеток - у одной особи, в группе $2\cdot10^3$ клеток - ни у одной из четырех крыс. Таким образом, наиболее эффективным является введение 100 мкл суспензии, содержащей $2\cdot10^5$ клеток аденокарциномы печени мышей Hepa 1-6, и суспензии ДНК вируса в концентрации 32,02 ± 28,44 мкг/мл.

Пример 2.

Для определения того, самцы или самки более склонны к развитию опухолей после введения клеток Hepa 1-6 и ДНК вируса, были изучены группы животных: две группы по пять самок и две группы по пять самцов. Животным вводили внутрибрюшинно суспензию, содержащую $2\cdot10^3$-$2\cdot10^6$ клеток Hepa 1-6 однократно и суспензию вирусной ДНК гепатита В с концентрацией 32,02 ± 28,44 мкг/мл 1 раз в неделю на протяжении 4 недель. На 44 день после первой инъекции у шести самцов были выявлены опухоли; у самок была обнаружена опухоль в двух случаях. Размеры опухоли: 200-300 мм^3.

Таким образом, рост ГЦК на 44 сутки эффективно вызывается однократным внутрибрюшинным введением самцам крыс клеточного гомогената клеток Hepa 1-6 в количестве 100 мкл с концентрацией $2\cdot10^5$ клеток совместно с 0,5 мл вирусной ДНК гепатита В с концентрацией 32,02 ± 28,44 мкг/мл 1 раз в неделю на протяжение и 4 недель.

Диагностическая чувствительность и диагностическая эффективность заявляемого способа создания экспериментальной модели гепатоцеллюлярной (гепатоклеточной) карциномы к 44 суткам составила 80 %.

Заявляемый способ моделирования гепатоцеллюлярной (гепатоклеточной) карциномы у крысы дает возможность воспроизвести модель ГЦК в организме животного (размер опухоли: 200-300 мм^3) вирусного генеза, что позволяет использовать ее для изучения патомеханизмов развития опухолевых процессов в печени, а также для доклинических исследований химиотерапевтических препаратов.

Источники информации:

1. World Health Organization; International Agency for Research of Cancer. Liver. Source: Globocan 2020 [Electronic resource]. - Mode of access:https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf. - Date of access: 14.10.2023.

2. Hyuna Sung, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / Hyuna Sung, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, Freddie Bray // American Cancer Society. CA Cancer J Clin, 2021, 71, p. 209-249.

3. Першин Г.Н. Методы экспериментальной химиотерапии / Г.Н. Першин // Практическое руководство, изд. 2, М, 1971, с. 349.

4. Архипов Г.Н. Моделирование железистого рака на крысах // Бюллютень экспериментальной биологии и медицины, 1968, T.LXV, № 2, с. 94-97.

5. Каталитическая терапия экспериментальных опухолей печени. / Могирев С.В., 2005, Москва, автореф. дис. к. м. н., с. 18.

6. RU 2012927 C1.

7. Парцхаладзе Н.Н. Исследование развития перевиваемой крысиной саркомы 45 в организме реципиента при ее различных локализациях // Сообщения Академии наук Грузинской ССР, 1979, т.95, № 2, с. 417-419.

8. Гурова С.В. и др. Модели рака печени in vivo // Современные проблемы науки и образования, 2023, № 4.

Национальный центр интеллектуальной собственности.
220034, г. Минск, ул. Козлова, 20.