



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **85641** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**A61B 10/00**  
**A61B 8/08** (2006.01)  
**G01N 33/48** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2013 07005</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Сківка Лариса Михайлівна (UA),</b> <b>Федорчук Олександр Григорович (UA),</b> <b>Гриценко Людмила Михайлівна (UA),</b> <b>Позур Володимир Костянтинович (UA),</b> <b>Тіхоміров Сергій Олександрович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>04.06.2013</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.11.2013</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.11.2013, Бюл.№ 22</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ</b> <b>УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА</b> <b>ШЕВЧЕНКА,</b> вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01061 (UA)

**(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ МЕТАСТАЗУВАННЯ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН У ПЕЧІНКУ**

**(57) Реферат:**

Спосіб моделювання метастазування злоякісних пухлин у печінку передбачає отримання суспензії пухлинних клітин в розчині Хенкса або середовищі 199 та її інокуляцію лабораторним тваринам. При цьому суспензію пухлинних клітин, попередньо стандартизовану до концентрації в діапазоні  $2-8 \times 10^6$  клітин/мл, вводять внутрішньоселезінково.

**U**  
**UA 85641**



Корисна модель належить до галузі медицини та експериментальної онкології, а зокрема до способів моделювання метастазування злоякісних пухлин у печінку і може бути використана для розробки способів медикаментозної дії на метастази і метастазування та дослідження нових лікарських засобів для лікування і профілактики злоякісних пухлин та їх метастазування.

Відомий спосіб моделювання метастазування злоякісних пухлин у печінку, який передбачає отримання суспензії пухлинних клітин в розчині Хенкса або середовищі 199 та її інокуляцію лабораторним тваринам. [А.М. Козлов, З.П. Софьина. Частота, строки и тип метастазирования различных перевиваемых опухолей мышей. Бюлетьн экспериментальной биологии и медицины - 1978, № 12, с. 715-718]. Згідно зі способом, пухлинну тканину аденокарциноми товстої кишки АКАТОЛ подрібнювали ножицями до гомогенної консистенції, розбавляли середовищем № 199 у співвідношенні 1:10 і 0,5 мл одержаної суспензії інокулювали підшкірно в область пахової западини мишам-самцям лінії BALB/c. Аутопсійний матеріал досліджувався тільки макроскопічним методом. Метастази в органах визначались візуально. Для визначення термінів метастазування був використаний метод, пов'язаний з видаленням первинного пухлинного вузла в різні терміни після перещеплення.

Недоліком вказаного способу є низький відсоток лабораторних тварин з метастазами у печінці, внаслідок метастазування аденокарциноми товстої кишки АКАТОЛ за змішаним типом. Зі 100 % тварин виразні метастази в печінці виявлялись лише у 60 % тварин. Ще одним недоліком способу є його довготривалість, зумовлена необхідністю проведення серійного пасажування *in vivo* для набуття цією пухлиною здатності утворювати метастази в печінці. Без цього аденокарцинома товстої кишки АКАТОЛ метастазує за лімфогенним типом у регіонарні і віддалені лімфовузли.

Більш близьким до запропонованої корисної моделі є технічне рішення, вибране як найближчий аналог, спосіб моделювання метастазування злоякісних пухлин у печінку, який передбачає отримання суспензії пухлинних клітин в розчині Хенкса або середовищі 199 та її інокуляцію лабораторним тваринам [Е.В. Фадеева. Экспериментальная модель меланомы Нйби методы иммунотерапии. ГОУ ВПО "Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера Росздрава" Пермь, Россия]. Згідно зі способом меланома В16 перещеплюється на самицях і самцях лінії мишей  $C_{57}Bl_6$  шляхом підшкірного або внутрішньочеревного введення 0,5 мл суспензії пухлинної тканини в розчині Хенкса або середовищі 199 (1:10).

Недоліком вказаного способу є низький відсоток лабораторних тварин з метастазами у печінці, внаслідок підшкірного або внутрішньочеревного введення нестандартизованої суспензії пухлинних клітин лабораторним тваринам. Зі 100 % тварин виразні метастази виявлялись переважно в легенях у 90 % тварин і в печінці - у 40 % тварин.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб моделювання метастазування злоякісних пухлин у печінку, який за рахунок стандартизації суспензії пухлинних клітин та нового способу інокуляції суспензії лабораторним тваринам забезпечив би спрямоване метастазування злоякісних пухлин у печінку у 100 % лабораторних тварин у короткий термін.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі моделювання метастазування злоякісних пухлин у печінку, який включає отримання суспензії пухлинних клітин в розчині Хенкса або середовищі 199 та її інокуляцію лабораторним тваринам, згідно з корисною моделлю, суспензію пухлинних клітин одержують з меланоми В16, клітинам якої властивий гематогенний шлях метастазування, стандартизують до концентрації в діапазоні  $2-8 \times 10^6$  клітин/мл для підрахунку кількості пухлинних клітин на тварину, що забезпечує індивідуальну варіабельність показників пухлинного росту і відтворюваність результатів досліджень, а інокуляцію пухлинних клітин здійснюють внутрішньоселезінковим введенням, яке завдяки існуванню судинного сполучення між печінкою і селезінкою (воротна вена) забезпечує спрямоване метастатичне поширення пухлини у короткий термін.

Приклад 1:

Суспензію пухлинних клітин для інокуляції лабораторним тваринам одержують шляхом культивування клітин меланоми В16 *in vitro* (Культура животных клеток. Методы / [пер.с англ. / под ред. Р. Фрешни]. - М.: Мир, 1989. - 333 с.) в Dulbecco modified Eagle medium (DMEM, Sigma) додають 10 % сироватки ембріонів телят (ETC, Sigma), пеніциліну (110 U/mL) та стрептоміцину (100 µl/mL) при 37 °C в атмосфері з 5 %  $CO_2$ . На наступному етапі моделювання суспензію пухлинних клітин стандартизують до концентрації  $5 \times 10^6$  клітин/мл, і вводять 100 мкл з концентрацією  $5 \times 10^6$  клітин/мл (загальна кількість пухлинних клітин на тварину -  $5 \times 10^5$ ) під капсулу нижньої третини селезінки на глибину 0,5 мм мишам лінії  $C_{57}Bl_6$ . Появу метастазів у печінці реєструють на 10-14 добу після перещеплення. На 14 добу метастази у печінці виявляють у 100 % тварин. Показники пухлинного росту і виживаності тварин після внутрішньоселезінкового перещеплення меланоми В16 наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Термін після перещеплення, доба	1	10	14	21
Кількість живих тварин	20	20	20	6
Кількість тварин з метастазами, %	0	75	100	100
Кількість метастазів у печінці	0	23,4±3,4	87,1±5,0	119,5±8,3
Кількість метастазів у легенях	0	0	0	0
Кількість метастазів у інших органах	0	0	0	0

## Приклад 2:

5 Суспензію пухлинних клітин для інокуляції лабораторним тваринам одержують з пухлинної тканини сингенних тварин. Для цього фрагменти пухлинної тканини мишей C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> без ділянок некрозу видаляють хірургічним шляхом, промивають стерильним фізіологічним розчином, подрібнюють ножицями і гомогенізують до утворення клітинної суспензії. Отриманий гомогенат пухлинної тканини промивають центрифугуванням для видалення клітинного дебрису, готують суспензію пухлинних клітин у розчині Хенкса або середовищі 199 і стандартизують до

10 концентрації  $5 \times 10^6$  клітин/мл.

На наступному етапі моделювання 100 мкл суспензії пухлинних клітин з концентрацією  $5 \times 10^6$  клітин/мл (загальна кількість пухлинних клітин на тварину -  $5 \times 10^5$ ) вводять під капсулу нижньої третини селезінки на глибину 0,5 мм мишам лінії C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>. Появу метастазів у печінці реєструють на 10-14 добу після перещеплення. На 14 добу метастази у печінці виявляють у 100 % тварин. Показники пухлинного росту і виживаності тварин після внутрішньоселезінкового перещеплення меланоми B16 наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Термін після перещеплення, доба	1	10	14	21
Кількість живих тварин	20	20	20	6
Кількість тварин з метастазами, %	0	75	100	100
Кількість метастазів у печінці	0	24,1±7,2	87,9±11,9	120,1±12,0
Кількість метастазів у легенях	0	0	0	0
Кількість метастазів у інших органах	0	0	0	0

20 Печінка являє собою найбільш поширену локалізацію гематогенних метастазів злоякісних новоутворень, не залежно від того чи дренуються вони судинами системи воротної вени або інших судин великого кола кровообігу. Метастази в печінці виявляють приблизно у однієї третини усіх хворих на рак. При цьому у хворих на рак молочної залози, рак легені, товстої кишки або шлунка метастази у печінці виявляються у 50 % пацієнтів. Після перелічених видів раку наступними за частотою метастазування у печінку є рак підшлункової залози і стравоходу,

25 а також меланома.

Отже, порівняно з відомими способами, спосіб моделювання метастазування злоякісних пухлин у печінку, що заявляється, дозволяє отримати модельну систему пухлинного росту з первинним пухлинним вузлом у селезінці і метастазами у печінці у 100 % лабораторних тварин, що у 2 рази більше ніж в найближчому аналогу, і скоротити тривалість дослідження ефективності протипухлинних засобів загального призначення та таргетних протипухлинних засобів, спрямованих на лікування і профілактику метастазування злоякісних новоутворень у печінку у два рази.

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

35

Спосіб моделювання метастазування злоякісних пухлин у печінку, який передбачає отримання суспензії пухлинних клітин в розчині Хенкса або середовищі 199 та її інокуляцію лабораторним тваринам, який **відрізняється** тим, що суспензію пухлинних клітин, попередньо стандартизовану до концентрації в діапазоні  $2-8 \times 10^6$  клітин/мл, вводять внутрішньоселезінково.

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601