

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2836527

Способ дифференциальной диагностики рака яичников, кистозных образований яичника и рака тела матки

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

Авторы: *Порханова Наталья Владимировна (RU), Филиппов Федор Евгеньевич (RU), Кутилин Денис Сергеевич (RU), Максимов Алексей Юрьевич (RU), Вереникина Екатерина Владимировна (RU), Половодова Вероника Васильевна (RU), Женило Оксана Евгеньевна (RU)*

Заявка № 2024123743

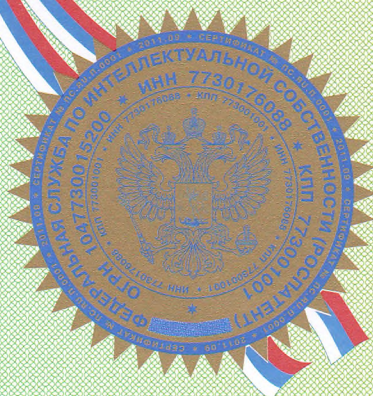
Приоритет изобретения 16 августа 2024 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 17 марта 2025 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 16 августа 2044 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/582 (2025.01); C12Q 1/6806 (2025.01); C12Q 1/686 (2025.01); C12Q 1/6876 (2025.01); C12Q 1/6886 (2025.01); C12Q 2521/107 (2025.01); C12Q 2600/158 (2025.01); C12Q 2600/178 (2025.01)

(21)(22) Заявка: 2024123743, 16.08.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.08.2024Дата регистрации:
17.03.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.08.2024

(45) Опубликовано: 17.03.2025 Бюл. № 8

Адрес для переписки:

344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я Линия, 63,
ФГБУ НМИЦО МЗРФ, Ишонина О.Г.

(72) Автор(ы):

Порханова Наталья Владимировна (RU),
Филиппов Федор Евгеньевич (RU),
Кутилин Денис Сергеевич (RU),
Максимов Алексей Юрьевич (RU),
Вереникина Екатерина Владимировна (RU),
Половодова Вероника Васильевна (RU),
Женило Оксана Евгеньевна (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: WO 2011057304 A2, 12.05.2011. WO
2005078139 A2, 25.08.2005. US 20110003704 A1,
06.01.2011. ЕГУНОВА М.А. и др.
Дифференциальная диагностика
доброкачественных и злокачественных
новообразований яичников (история вопроса).
Журнал акушерства и женских болезней. 2016;
65(6): 68-78. KE R. et al. Functional mechanism
and clinical implications of (см. прод.)(54) Способ дифференциальной диагностики рака яичников, кистозных образований яичника и рака тела
матки

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к онкологии, и может быть использовано для дифференциальной диагностики рака яичников, кистозных образований яичника и рака тела матки. Определяют транскрипты микро-РНК hsa-miR-33b-5p, hsa-miR-423-5p и hsa-miR-7-5p в моче. Вычисляют коэффициенты относительной экспрессии микро-РНК hsa-miR-33b-5p (Khsa-miR-33b-5p) и hsa-miR-423-5p (Khsa-miR-423-5p) как соотношение относительной экспрессии hsa-miR-33b-5p и hsa-miR-423-5p относительно

референсной микро-РНК hsa-miR-7-5p. При значениях Khsa-miR-33b-5p $\leq 1,04 \cdot 10^{-7}$ и Khsa-miR-423-5p $\leq 3,01 \cdot 10^{-7}$ диагностируют рак яичников. При значениях Khsa-miR-33b-5p $\geq 4,71 \cdot 10^{-7}$ и Khsa-miR-423-5p $\geq 5,11 \cdot 10^{-7}$ диагностируют кистозные образования яичника. При значениях Khsa-miR-33b-5p $\geq 12,47 \cdot 10^{-5}$ и Khsa-miR-423-5p $\leq 0,18 \cdot 10^{-9}$ диагностируют рак тела матки. При значениях коэффициента K между вышеуказанными

интервалами считают полученный результат
неопределенным. Способ обеспечивает
неинвазивную диагностику рака яичников,

кистозных образований яичника и рака тела
матки за счет определения транскриптов микро-
РНК в моче. 3 з.п. ф-лы, 1 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

MicroRNA-423 in human cancers. Cancer Med. 2020 Dec; 9(23): 9036-9051. Epub 2020 Nov 11.

RU 2 8 3 6 5 2 7 C 1

RU 2 8 3 6 5 2 7 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

G01N 33/58 (2006.01)*C12Q 1/6806* (2018.01)*C12Q 1/686* (2018.01)*C12Q 1/6876* (2018.01)*C12Q 1/6886* (2018.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/582 (2025.01); *C12Q 1/6806* (2025.01); *C12Q 1/686* (2025.01); *C12Q 1/6876* (2025.01); *C12Q 1/6886* (2025.01); *C12Q 2521/107* (2025.01); *C12Q 2600/158* (2025.01); *C12Q 2600/178* (2025.01)

(21)(22) Application: **2024123743**, **16.08.2024**

(24) Effective date for property rights:
16.08.2024

Registration date:
17.03.2025

Priority:

(22) Date of filing: **16.08.2024**(45) Date of publication: **17.03.2025** Bull. № 8

Mail address:

**344037, g. Rostov-na-Donu, ul. 14-ya Liniya, 63,
FGBU NMITSO MZRF, Ishonina O.G.**

(72) Inventor(s):

**Porkhanova Natalia Vladimirovna (RU),
Filippov Fedor Evgenovich (RU),
Kutulin Denis Sergeevich (RU),
Maksimov Aleksei Iurevich (RU),
Verenikina Ekaterina Vladimirovna (RU),
Polovodova Veronika Vasilevna (RU),
Zhenilo Oksana Evgenevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF OVARIAN CANCER, OVARIAN CYSTIC GROWTHS AND UTERINE CANCER**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to oncology, and can be used for differential diagnosis of ovarian cancer, ovarian cystic growths and uterine cancer. In urine determined are micro-RNA transcripts hsa-miR-33b-5p, hsa-miR-423-5p and hsa-miR-7-5p. Calculated are relative expression coefficients of micro-RNA hsa-miR-33b-5p (Khsa-miR-33b-5p) and hsa-miR-423-5p (Khsa-miR-423-5p) as ratio of relative expression hsa-miR-33b-5p and hsa-miR-423-5p relative to reference micro-RNA hsa-miR-7-5p. At values $Khsa-miR-33b-5p \leq 1.04 \cdot 10^{-7}$ and $Khsa-miR-423-5p \leq 3.01 \cdot 10^{-7}$, ovarian cancer is diagnosed. At

values $Khsa-miR-33b-5p \geq 4.71 \cdot 10^{-7}$ and $Khsa-miR-423-5p \geq 5.11 \cdot 10^{-7}$, ovarian cystic growths are diagnosed. At values $Khsa-miR-33b-5p \geq 12.47 \cdot 10^{-5}$ and $Khsa-miR-423-5p \leq 0.18 \cdot 10^{-9}$, uterine cancer is diagnosed. If the coefficient K is between the above intervals, the obtained result is considered to be uncertain.

EFFECT: method provides non-invasive diagnosis of ovarian cancer, ovarian cystic growths and uterine body cancer by determining micro-RNA transcripts in urine.

4 cl, 1 tbl, 3 ex

Изобретение относится к медицине, а именно к молекулярной биологии, онкологии, и может быть использовано для неинвазивной диагностики рака яичников и тела матки.

Рак яичников (РЯ) в настоящее время занимает одну из ведущих позиций по показателям заболеваемости и смертности в мире и Российской Федерации среди гинекологических злокачественных новообразований. РЯ включает множество подтипов опухолей, каждый из которых имеет отличительные биологические и клинические характеристики. Согласно классификации ВОЗ, выделяют серозную карциному, эндометриоидную карциному, муцинозную карциному, светлоклеточную карциному, злокачественную опухоль Бреннера, серозно-муцинозную карциному, недифференцированную карциному и смешанную эпителиальную карциному (см. Цандекова М.Р., Порханова Н.В., Кутилин Д.С. (2020) Молекулярная характеристика серозной аденокарциномы яичника: значение для диагностики и лечения. Современные проблемы науки и образования. № 1; URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29428>).

У большинства пациенток РЯ имеет спорадический характер. В качестве факторов риска развития данной патологии рассматриваются отсутствие беременности, курение, избыточный вес, частое использование препаратов от бесплодия (см. Rooth C. (2013) Ovarian cancer: risk factors, treatment and management. Br J Nurs. 22 (17), S23-30). РЯ обычно выявляется поздно, а общая 5-летняя выживаемость составляет всего 30-40%. Раннее обнаружение РЯ является наиболее важным фактором повышения выживаемости пациенток. На сегодняшний день определение СА125 и HE4 в крови и трансвагинальное ультразвуковое исследование являются основными методами диагностики РЯ. Однако их чувствительность и специфичность недостаточны для выявления заболевания на ранней стадии (см. Swiatly A., Plewa S, Matysiak J., Kokot Z.J. (2018) Mass spectrometry-based proteomics techniques and their application in ovarian cancer research. J Ovarian Res. 11 (1)).

Рак тела матки – наиболее распространенная инвазивная злокачественная опухоль матки у женщин, во всем мире ежегодно ее диагностируют более чем у 300 тыс. женщин. Поиск высокоспецифичных молекулярных онкомаркеров для данного заболевания остается приоритетной задачей, что подтверждается результатами ряда исследований, посвященных этому направлению (см. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С. и др. Изменение экспрессии эстроген-регуляторных генов при малигнизации тканей тела матки. Кубанский научный медицинский вестник 2016; 157(2): 84–90; Кутилин Д.С., Никитин И.С., Кит О.И. Особенности экспрессии генов некоторых транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки. Успехи молекулярной онкологии. 2019; 6(1): 57-62).

Поэтому необходимы новые методические подходы, в том числе современные подходы молекулярной биологии, для раннего обнаружения и улучшения диагностики данных заболеваний (рака тела матки и яичников).

МикроРНК - это короткие некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов катализируя разрушение мРНК, либо ингибируя трансляцию мРНК в белок. Зрелая микроРНК представляет собой одноцепочечную РНК размером порядка 22 нуклеотидов, получающуюся из первичного транскрипта. МикроРНК являются транскрипционными регуляторами и модулируют экспрессию генов путем взаимодействия с комплементарными нуклеотидными последовательностями мРНК-мишеней (см. Димитриади Т.А., Бурцев Д.В., Дженкова Е.А., Кутилин Д.С. (2020) МикроРНК как маркеры прогрессирования предраковых заболеваний в рак шейки матки. Современные проблемы науки и образования. 1. URL: <http://science-education.ru/>

ru/article/view?id=29529). МикроРНК вносят значительный вклад в инициацию и развитие различных молекулярных событий, включая инициацию онкогенеза, прогрессирование и метастазирование опухолей, что делает микроРНК потенциальными биомаркерами для оценки прогрессирования и прогноза рака (см. 119. Abdelsattar Z.M., Wong S.L., Regenbogen S.E., Jomaa D.M., Hardiman K.M., Hendren S. (2016) Colorectal cancer outcomes and treatment patterns in patients too young for average-risk screening. Cancer. 122, 929-934).

Анализ баз данных TCGA, использованием методов машинного обучения и многоэтапный лабораторный скрининг позволил выделить микроРНК (*hsa-miR-33b-5p* и *hsa-miR-423-5p*), уровень транскриптов которых можно использовать для неинвазивной диагностики рака яичников и тела матки.

Из патентных источников известны следующее изобретения:

1. Способ анализа нарушений, связанных с раком яичников (см. патент на изобретение RU № 2511408 от 10.04.2014, Бюл. № 10). Способ включает определение геномного статуса метилирования CpG-динуклеотидов в каждой последовательности из группы последовательностей SEQ ID NO: 1-10 с использованием набора зондов, специфичных для указанных последовательностей и способных гибридизоваться с последовательностью по всей длине. Указанные последовательности используются в составе чипа для детекции, диагностики или мониторинга пролиферативных нарушений, связанных с пролиферацией клеток яичника, а также для детекции предрасположенности к пролиферативным нарушениям или лечения пролиферативных нарушений яичника. Изобретение позволяет проводить идентификацию пролиферативных нарушений в клетках яичника и выявлять генетическую предрасположенность к указанным нарушениям.

2. Способ комплексной морфологической диагностики рака яичников (см. патент на изобретение RU № 2640189 от 16.03.2017, Бюл. № 8). Способ комплексной морфологической диагностики рака яичников на основе получения клеточного осадка из экссудата брюшной полости или из смыва брюшной полости, полученного путем лапароцентеза, под контролем ультразвука или пункции заднего свода влагалища, добавления к экссудату или смыву брюшной полости раствора антикоагулянта цитрата натрия 5%, его центрифугирования в течение 10 минут при скорости 2000 об/мин, слива надосадочной жидкости, переносе клеточного осадка на предметное стекло, заключающийся в выполнении традиционного цитологического исследования, отличающийся тем, что проводят комплексное исследование морфологических препаратов, полученных из клеточного осадка, при этом цитологические препараты получают из клеточной суспензии, которую получают путем добавления к клеточному осадку питательной среды 199, цитофугирования в течение 8 минут при скорости 1000 об/мин, при котором происходит удаление фоновых элементов и разделение клеток на фракции, и получение монослойных цитологических препаратов, которые используют для цитологического и иммуноцитохимического исследований, а для получения гистологических препаратов накапливают клеточный осадок в количестве не менее 0,3 см³ в центрифужной пробирке, к клеточному осадку добавляют раствор ренампластина и к образовавшемуся сгустку добавляют 10% нейтральный забуференный раствор формалина, после чего клеточный сгусток переносят в гистологический мешочек, который помещают в кассету для гистологической проводки и последовательно обрабатывают в растворах дегидратантов, в промежуточных смесях, затем переносят в парафин, в результате чего получают клеточный блок и производят его нарезку микротомом; полученные срезы переносят на предметное стекло, производят окраску препаратов с последующей дегидратацией и депарафинизацией, после чего

гистологические препараты покрывают клеем и покровным.

3. Способ ранней диагностики перитонеального рецидива рака яичников после оптимальных циторедуктивных операций (см. патент на изобретение № 2583114 от 10.05.2016, Бюл. № 13). Осуществляют комплексный динамический ультразвуковой мониторинг с использованием трансабдоминального и трансвагинального доступов. Оценивают топометрические и качественные гемодинамические параметры эхо-структур. Проводят исследование на наличие диссеминатов париетальной брюшины с помощью высокочастотного линейного датчика.

4. Способ диагностики рака тела матки, симптом «мыльница» по Ю.С. Сидоренко (см. заявка на изобретение № 96107584 от 10.07.1998). Способ диагностики рака тела матки, симптом «Мыльница» по Ю.С. Сидоренко, включающий бимануальное исследование, отличающийся тем, что проводят бимануальное исследование влагалища и если пальцы гинеколога ощущают скольжение по поверхности влагалищных стенок, аналогичное скольжению по внутренней поверхности мыльницы, диагностируют рак тела матки, а при отсутствии этого симптома - доброкачественные новообразования и опухоли яичников.

5. Способ диагностики рака молочной железы и рака яичников по уровню мРНК ММР-9 в плазме крови (см. патент на изобретение № 2745424 от 25.03.2021, Бюл. № 9). Способ основан на измерении в плазме крови уровня мРНК ММР-9 относительно представленности референсной РНК. Полученные показатели используют для вычисления отношения уровней экспрессии для каждого конкретного образца. Значение полученного показателя интерпретируется как маркер раннего опухолеобразования в молочной железе и яичниках. Изобретение может быть использовано для выявления ранних стадий рака молочной железы и рака яичников. Использование заявленного способа обеспечивает высокочувствительную и объективную количественную характеристику уровня экспрессии мРНК ММР-9, что позволяет провести раннюю малоинвазивную диагностику рака молочной железы и рака яичников.

6. Способ прогнозирования рецидива серозного рака яичников (см. патент на изобретение № 2290078 от 27.12.2006, Бюл. № 36). Изобретение относится к области медицины, в частности онкологии, и предназначено для диагностики до клинической манифестации рецидива серозного рака яичников после проведенного радикального лечения. Может быть использовано в повседневной практике патологоанатомических отделений больниц, онкологических диспансеров, специализированных центров и НИИ. Вероятность развития рецидива представлена дихотомической переменной, вычисляемой по формуле, определяемой логистической регрессией, включающей комбинацию нескольких переменных, которыми являются морфологические параметры опухоли, а именно площадь опухолевой клетки, средняя плоидность ядер опухолевых клеток, уровень экспрессии p53, уровень экспрессии рецепторов эстрогена, уровень экспрессии PCNA.

7. Способ дифференциальной диагностики опухолеподобных образований и опухолей яичников у беременных (см. патент на изобретение № 2325118 от 27.05.2008, Бюл. № 15). Изобретение относится к медицине, в частности к акушерству и онкологии, и может быть использовано при ультразвуковых исследованиях (УЗИ) образований и опухолей яичников у беременных и определения врачебной тактики во время беременности и родов. Проводят абдоминальные, ректальные и вагинальные исследования изменений яичников.

8. Способ диагностики рака молочной железы и рака яичников (см. патент на изобретение № 2696114 от 31.07.2019, Бюл. № 22). Изобретение относится к области

биотехнологии. Предложен способ диагностики рака молочной железы и рака яичников. Способ включает регистрацию нанопроводным НП-чипом содержащихся в крови пациента с онкологическим заболеванием рака молочной железы и яичников микроРНК. На поверхности НП-чипа ковалентно иммобилизуют совокупность комплементарных к микроРНК ассоциированных с заболеванием рака молочной железы и яичников о-ДНК зондов, инкубируют НП-чип с иммобилизированной на его поверхности совокупностью о-ДНК в образце, содержащем выделенные из крови пациента микроРНК, регистрируют изменение величины протекающего через НП-чип тока.

9. Способ диагностики серозного рака яичников высокой степени злокачественности по липидному профилю сыворотки крови (см. заявка на изобретение № 2021134618, дата публ. заявки 26.05.2023, бюл. № 15). Способ диагностики серозного рака яичников высокой степени злокачественности по липидному профилю сыворотки крови, отличающийся тем, что методом высокоэффективной жидкостной хроматографии масс-спектрометрии определяют липидный профиль крови, затем с помощью метода дискриминантного анализа ортогональных проекций на скрытые структуры (OPLS-DA) выполняют построение двух OPLS-DA моделей на основании 128 и 99 липидов, соответственно, для каждой из которых рассчитывают оценочный параметр (ОП).

10. Способ для диагностики рака яичников на основе группы генов микроРНК (см. патент на изобретение RU № 2703399, опубл. 16.10.2019, Бюл. № 29). Описан способ для диагностики рака яичников на основе группы генов микроРНК путем выявления метилирования по крайней мере одного маркера из четырех, отличающийся тем, что маркерами системы являются гены: miR-124a-3, miR-129-2, miR-193a и miR-107. Заявляемый способ позволяет выявить рак яичников с высокой клинической чувствительностью и специфичностью.

11. Способ дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований внутренних женских половых органов (см. заявка на изобретение RU 2006125704, опубл. 27.01.2008, Бюл. № 3). Способ дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований внутренних женских половых органов, включающий взятие сыворотки крови, исследование оптических полос поглощения и анализ полученных данных, отличающийся тем, что предварительно сыворотку крови высушивают, размельчают, готовят суспензию в вазелиновом масле и проводят инфракрасный спектрофотометрический анализ в области спектра 1350-880 см⁻¹ определяют высоты пиков полос поглощения с максимумами 1320, 1308, 1271, 1241, 1200, 1177, 1169, 1158, 1136, 1117, 1100, 1080, 1035, 982, 973, 943, 935, 891, после чего диагноз доброкачественных новообразований женской половой сферы выставляют при наличии характеристического комплекса пиков полос поглощения образца сыворотки крови с максимумами в 1320, 1241, 1200, 1169, 1117, 982, 973, 943, 935 см⁻¹, диагноз рак шейки матки выставляют при наличии характеристического комплекса пиков полос поглощения образца сыворотки крови с максимумами в 1200, 1169, 1117, 1035, 982, 891 см⁻¹, диагноз рак эндометрия выставляется при наличии следующего характеристического комплекса пиков полос поглощения образца сыворотки крови с максимумами в 1320, 1241, 1177, 982, 973, 891 см⁻¹, диагноз рак яичников выставляется при наличии характеристического комплекса пиков полос поглощения образца сыворотки крови с максимумами в 1320, 1271, 1169, 1158, 1117, 1080, 943, 935 см⁻¹, при норме комплекса пиков полос поглощения образца сыворотки крови с максимумами 1308, 1241, 1200, 1177, 1136, 1117, 1080, 973, 943, 935 см⁻¹.

Однако, описанные выше способы принципиально отличаются от нашего, так как используют иные молекулярные или физические принципы, некоторые из них обладают

меньшей точностью, чувствительностью и специфичностью, чем предлагаемый нами, либо технически более сложны в исполнении и не являются неинвазивными.

Анализ патентных источников (www.fips.ru) также показал отсутствие действующих патентов и заявок на «Неинвазивный способ диагностики злокачественных опухолей яичников и тела матки на основании уровня транскриптов микроРНК в моче».

Техническим результатом заявляемого изобретения является создание нового, простого в исполнении и точного способа с уникальными высокоспецифичными последовательностями синтетических олигонуклеотидов (праймеров) для неинвазивной диагностики злокачественных опухолей яичников и тела матки на основании уровня транскриптов микроРНК в моче.

Сущность способа заключается в том, что используют библиотеку комплементарной ДНК (кДНК), полученную на матрице тотальной РНК с помощью реакции обратной транскрипции с RT-праймерами совмещённой с реакцией полиаденилирования РНК, проводят амплификацию библиотеки кДНК с высокоспецифичными праймерами для микро-РНК *hsa-miR-33b-5p*, *hsa-miR-423-5p* и *hsa-miR-7-5p*, анализируют первичные данные и вычисляют коэффициенты относительной экспрессии микро-РНК *hsa-miR-33b-5p* и *hsa-miR-423-5p* в моче ($K_{hsa-miR-33b-5p}$ и $K_{hsa-miR-423-5p}$) как соотношение относительной экспрессии *hsa-miR-33b-5p* и *hsa-miR-423-5p* относительно *hsa-miR-7-5p*, сравнивают полученные значения K с интервалом диагностического коэффициента, и при значениях $K_{hsa-miR-33b-5p} \leq 1,04 \cdot 10^{-7}$ и $K_{hsa-miR-423-5p} \leq 3,01 \cdot 10^{-7}$ диагностируют рак яичников, при значениях $K_{hsa-miR-33b-5p} \geq 4,71 \cdot 10^{-7}$ и $K_{hsa-miR-423-5p} \geq 5,11 \cdot 10^{-7}$ диагностируют кистозные образования яичника, при значениях $K_{hsa-miR-33b-5p} \geq 12,47 \cdot 10^{-5}$ и $K_{hsa-miR-423-5p} \leq 0,18 \cdot 10^{-9}$ диагностируют рак тела матки, а при значениях коэффициента K между указанными интервалами считают полученный результат неопределённым.

Заявленный анализ основан на определении относительной экспрессии *hsa-miR-33b-5p* и *hsa-miR-423-5p* в моче пациентов с подозрением на рак яичника или тела матки и последующем вычислении соотношения экспрессии относительно референсной микро-РНК *hsa-miR-7-5p*. $K_{miR-33b/miR-423} = E_{miR-33b/miR-423} / E_{miR-7}$.

Изобретение «Способ дифференциальной диагностики рака яичников, кистозных образований яичника и рака тела матки» является новым, так как относительная экспрессия микро-РНК *hsa-miR-33b-5p* и *hsa-miR-423-5p* в моче ранее не использовалась для заявленной в способе цели, также как и последовательности праймеров в составе предлагаемого способа.

Заявленный способ включает следующие приёмы:

Выделение тотальной РНК из биологического образца, получение на её матрице кДНК с помощью реакции обратной транскрипции с RT-праймерами совмещённой с реакцией полиаденилирования РНК, ПЦР-амплификацию кДНК с высокоспецифичными праймерами для микро-РНК *hsa-miR-33b-5p*, *hsa-miR-423-5p* и *hsa-miR-7-5p*, анализ первичных данных и вычисление коэффициентов относительной экспрессии *hsa-miR-33b-5p* и *hsa-miR-423-5p* в моче, сравнение их значений со значениями коэффициентов экспрессии, характерными для группы пациентов с раком яичника, кистами яичника и раком тела матки.

Для реализации способа были разработаны специфичные олигонуклеотидные прямые и обратные праймеры для *hsa-miR-33b-5p*, *hsa-miR-423-5p* и *hsa-miR-7-5p* (см. табл. 1).

Таблица 1

Способ дифференциальной диагностики рака яичников, кистозных образований

яичника и рака тела матки

микро-РНК	Последовательность микро-РНК	Последовательность праймеров
hsa-miR-7-5p	TGGAAGACTAGTGATTTTGTGT	F:CGTCAGTGGAGACTAGTGA (SEQ ID №1) R:GTCCAGT(15)AACAAACA (SEQ ID №2) RT:CAGGTCCAGT(15)AA (SEQ ID №3)
hsa-miR-33b-5p	GTGCATTGCTGTTGCATTGC	F: GCAGGTGCATTGCTGT (SEQ ID №4) R: GTCCAG T(15)GCAAT (SEQ ID №5) RT:CAGGTCCAGT(15)ACG (SEQ ID №6)
hsa-miR-423-5p	TGAGGGGCGAGAGCGAGACTTT	F: GCAGGTGCATTGCTGT (SEQ ID №7) R: GTCCAG T(15)GCAAT (SEQ ID №8) RT:CAGGTCCAGT(15)AAA (SEQ ID №9)

Способ осуществляют следующим образом:

1. Аликвоты утренней мочи объемом 10 мл центрифугируют при 3500 об. мин. в течение 30 минут при температуре 2°C. Осадок переносят в новую пробирку.

2. Препараты РНК из мочи получают при помощи метода Chomczynski и Sacchi (см. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform extraction : twenty-something years on // Nat. Protoc. 2006. Vol. 1, № 2. P. 581–585.). К осадку последовательно прибавляют 400 мкл лизирующего буфера (5М гуанидин-изотиоцианат, 14 мМ Трис-ацетат (pH 6.4), 1% Sarkosyl, 2% 2-меркаптоэтанол) и 75 мкл 2М ацетата натрия (pH 4.0) и перемешивают. Далее добавляют 800 мкл водонасыщенного фенола и перемешивают. Для разделения водной и органической фаз добавляют 250 мкл хлороформ:изоамилового спирта в соотношении 49 к 1, перемешивают в течение 10 сек и инкубируют в течение 30 мин при 2°C. Затем полученную смесь центрифугируют при 10000g в течение 15 мин при 2°C. Верхнюю водную фазу отбирают и переносят в новую пробирку. К водной фазе прибавляют равный объем этанола и наносят на колонку с фильтром из диоксида кремния (RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). РНК эффективно связывается с мембраной из диоксида кремния. Колонку дважды промывают буфером (4М гуанидин-изотиоцианат, 10 мМ трис-ацетат, 50% этанол, 1% 2-меркаптоэтанол) и центрифугируют. Затем колонку дважды промывают буфером (10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 0,1 М NaCl, 75% этанол), центрифугируют при 400g, 2 минуты. РНК из колонки элюируют добавлением 150 мкл свободной от РНКаз деионизированной воды. Далее центрифугируют при 400g, 10 мин.

3. Для выявления микро-РНК препарат суммарной РНК используют в реакции обратной транскрипции совмещенной с полиаденилированием РНК (используют RT-праймеры. Реакционная смесь (объемом 20 мкл) содержит 1-кратный поли(А) буфер, 10 единиц/мкл М-MuLV, 0,1 мМ dNTPs, 1 мМ АТФ, 1 мкМ RT-праймера, 0,5 единиц/мкл Poly(А)-полимераза и 0,3 мкг тотальной РНК. Реакцию проводят в течение 25 мин при 20°C, 20 мин при 42°C, затем обратную транскриптазу инактивируют в течение 5 минут при 85°C.

4. Полученную комплементарную ДНК (кДНК) используют в RT-qPCR. ПЦР-смесь (20 мкл) содержит 1x PCR-буфер, 0,25 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 1x EvaGreen, 1 ед. акт. Taq-DNA-полимеразы, по 400 нМ прямого и обратного праймеров. Постановку RT-qPCR проводят в трех технических повторах по следующей программе: 2 минуты 95 °C, 45 циклов: денатурация при 95 °C 10 с, отжиг и элонгация - 64°C 30 с. Результаты, соответствующие Ct>37 признаются отрицательными.

Относительная экспрессия микро-РНК вычисляется следующим способом:

- вычисляют среднее геометрическое C_t по трём повторам для таргетной и референсной микро-РНК,

- вычисляют величину $\Delta C_t = C_{t(hsa-miR-423-5p \text{ или } hsa-miR-33b-5p)} - C_{t(hsa-miR-7-5p)}$

- коэффициент K рассчитывают по формуле $1.9^{-\Delta C_t}$ (см. Кутилин Д.С. Регуляция экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком. Молекулярная биология. 2020. Т. 54. № 4. С. 580-595).

Далее сравнивают полученные значения K с интервалом диагностического коэффициента, и при значениях $K_{hsa-miR-33b-5p} \leq 1,04 \cdot 10^{-7}$ и $K_{hsa-miR-423-5p} \leq 3,01 \cdot 10^{-7}$ диагностируют рак яичников (чувствительность 85%), при значениях $K_{hsa-miR-33b-5p} \geq 4,71 \cdot 10^{-7}$ и $K_{hsa-miR-423-5p} \geq 5,11 \cdot 10^{-7}$ диагностируют кистозные образования яичника (чувствительность 90%), а при значениях $K_{hsa-miR-33b-5p} \geq 12,47 \cdot 10^{-5}$ и $K_{hsa-miR-423-5p} \leq 0,18 \cdot 10^{-9}$ диагностируют рак тела матки (чувствительность 90%). При значениях коэффициента K между указанными интервалами считают полученный результат неопределенным.

Предлагаемый способ применим только для больных раком яичников и тела матки, а также больных с кистозными образованиями яичников.

С помощью предлагаемого способа было осуществлено диагностирование заболевания у 300 пациентов.

Для доказательства прогностической ценности предлагаемого способа приводятся 3 выписки из историй болезни.

Пример №1. Пациентка О., 1985 года рождения. Из анамнеза: УЗИ малого таза - признаки кистозно-солидных образований малого таза вероятно исходящих из обоих яичников (192 × 92 × 126 мм слева, 124 × 104 × 91 мм справа), асцит. Онкомаркеры: СА 125-730,5 ед/мл, НЕ 4-384,7 пмоль/л, ROMA - 92,95%. SCC - 0,9 нг/мл. Пациентка самостоятельно обратилась в КДО НМИЦ онкологии на консультацию, обследована в НМИЦ онкологии.

Результаты молекулярного анализа образца мочи (получена до лечения) $K_{hsa-miR-33b-5p} = 0,91 \cdot 10^{-7}$ и $K_{hsa-miR-423-5p} = 2,15 \cdot 10^{-7}$ соответствуют диагностическим коэффициентам рака яичников.

Проведено КТ ОГК, ОБП, ОМТ - Патологических изменений в органах грудной клетки не выявлено. Мтс-инфильтрация большого сальника. Асцит. Опухолевое поражение придатков матки. 08.04.2024 г. Выполнена трепан-биопсия образования. По данным гистологического анализа - в трепан-биоптатах - морфологическая картина серозной пограничной опухоли с микропапиллярным паттерном, в объеме исследованного материала инвазивный рост не определяется.

На основании морфологического заключения, данных анамнеза и клинико-лабораторных данных установлен диагноз: (С56) Пограничная опухоль яичников Ст.3с сТ3сNхM0 кл.гр.2. Состояние после трепан-биопсии 08.04.2024 г.

С 25.04.2024 г. по 15.05.2024 г. была госпитализирована в отделение онкогинекологии ФГБУ НМИЦ онкологии МЗ РФ, где 26.04.2024 г. выполнена операция: тотальная гистерэктомия (экстирпация матки) с придатками лапаротомическая. Резекция большого сальника при гинекологической патологии. Этапы хирургического стадирования (селективная тазовая лимфаденэктомия, биопсия париетальной и висцеральной брюшины, забор смывов с брюшной полости). По данным цитологического исследования: цитограмма наиболее характерна для метастаза пограничной опухоли яичника. Послеоперационный гистологический анализ: серозная пограничная опухоль обоих яичников с фокусами микроинвазивной серозной карциномы низкой степени

злокачественности (инвазия менее 5 мм), с ростом опухоли на поверхности яичников, ростом на серозной оболочке маточных труб и тела матки, инвазией лимфатических сосудов. В теле матки эндометрий пролиферативного типа. В шейке матки - ретенционные кисты, хроническое неактивное воспаление. В линии резекции шейки матки опухолевого роста не обнаружено № 2. В сальнике - неинвазивные импланты серозной пограничной опухоли, полнокровие сосудов, хроническое воспаление, реактивная пролиферация мезотелия. В 2-х лимфатических узлах - фокусы пограничной серозной опухоли №3. В париетальной брюшине - фокусы серозной карциномы низкой степени злокачественности (инвазивные имплантаты) №4. В биоптате висцеральной брюшины - полнокровие, очаговая лимфоидная инфильтрация, пролиферация мезотелия №5. В лимфатическом узле - липоматоз.

Пример № 2. Пациентка А., 52 года. Из анамнеза: УЗИ малого таза - аденомиоз тела матки. Образование кистозного строения в проекции левых придатков матки 9,7 × 7,8 см (возможно эндометриоидного содержимого). Кровь на опухолевые маркеры - СА125-17,13 ед/мл; НЕ4-42,17 пмоль/л. Рентгенография ОГК - патологических изменений со стороны органов грудной клетки не выявлено.

Результаты молекулярного анализа образца мочи (получена до лечения) $K_{hsa-miR-33b-5p}=5,03 \cdot 10^{-7}$ и $K_{hsa-miR-423-5p}=9,47 \cdot 10^{-7}$ соответствуют диагностическим коэффициентам кистозных образований яичника.

На основании морфологического заключения, данных анамнеза и клинико-лабораторных данных установлен диагноз: (D27.) Цистаденома левого яичника (эндометриоидного генеза). (80.0) Аденомиоз.

С 10.04.2024 г. по 22.04.2024 г. была госпитализирована в отделение онкогинекологии ФГБУ НМИЦ онкологии МЗ РФ, где 11.04.2024 г. выполнена операция: тотальная гистерэктомия (экстирпация матки) с придатками лапароскопическая с использованием видеоэндоскопических технологий. Резекция большого сальника с использованием видеоэндоскопических технологий. Послеоперационный гистологический: атрофичный эндометрий. Лейомиоматоз. Наботовы кисты, эктопия желез. Покровный эпителий и линия резекции имеют обычное строение. В правом яичнике - поверхностная цистаденома. В левом яичнике - киста, выстланная уплощенным эпителием, киста желтого тела с кровоизлияниями. В маточных трубах - обычное строение. Паратубарные кисты. В жировой клетчатке сальника - эктазия и полнокровие сосудов.

Пример №3. Пациентка С., 63 лет. Из анамнеза: По месту жительства выполнено диагностическое выскабливание полости матки и цервикального канала. Гистологический анализ в ц/канале и полости матки - G2 аденокарцинома с воспалением. КТ ОГК, ОБП, ОМТ - Увеличение размеров, неоднородность структуры матки (матка - 6,9 × 4,8 см неоднородной структуры, шейка 5,7 × 3,6 см деформирована), забрюшинная лимфаденопатия (парааортальные, паракаваальные, межаортокаваальные, подвздошные, внутритазовые до 1,4 см). Кисты печени и правой почки.

Результаты молекулярного анализа образца мочи (получена до лечения) $K_{hsa-miR-33b-5p}=17,02 \cdot 10^{-5}$ и $K_{hsa-miR-423-5p}=0,05 \cdot 10^{-9}$ соответствуют диагностическим коэффициентам рака тела матки.

На основании морфологического заключения, данных анамнеза и клинико-лабораторных данных установлен диагноз: (C54.9) ЗНО тела матки, cT2NxM0 кл.гр.2. Состояние после ДВПМ и ЦК 29.03.2024 г.

Была госпитализирована в отделение онкогинекологии ФГБУ НМИЦ онкологии МЗ РФ, где 19.04.2024 г. Операция: Нервосберегающая расширенная экстирпация матки

с придатками и тазовой лимфаденэктомией. Лимфаденэктомия забрюшинная. Резекция большого сальника при гинекологической патологии. Послеоперационный гистологический анализ: эндометриоидная аденокарцинома, G2, тела матки, с изъязвлением, с инвазией всей толщины стенки матки, с ангиоваскулярной и периневральной инвазией. Вне опухоли - аденомиоз. В строме шейки матки - опухолевого роста не определяется. По линии резекции влагалища - опухолевого роста не обнаружено. В яичниках с обеих сторон - белые тела, ангиоматоз. В левой маточной трубе - фиброз. На месте правой маточной трубы - фиброз, остатки шовного материала. В жировой клетчатке сальника, тазовой клетчатки и лимфатических узлах справа и слева, в парааортальной клетчатке и лимфоузлах - метастаза карциномы не обнаружено.

Технико-экономическая эффективность изобретения «Способ дифференциальной диагностики рака яичников, кистозных образований яичника и рака тела матки» позволяет с высокой точностью неинвазивно диагностировать такие заболевания как рак яичников и тела матки, а также кистозные образования яичников. Заявляемый способ включает разработанные нами синтетические олигонуклеотиды и является экономически оправданным для неинвазивной предварительной диагностики указанных выше заболеваний, осуществляется в условиях стандартной лаборатории молекулярной биологии (ПЦР), без использования специального дорогостоящего оборудования; обладает высокой чувствительностью, относится к малоинвазивной диагностике, для осуществления анализа используется доступный биоматериал (моча) и занимает не более 8 часов.

(57) Формула изобретения

1. Способ дифференциальной диагностики рака яичников, кистозных образований яичника и рака тела матки, включающий выделение тотальной РНК из мочи и получение на её матрице кДНК, определение транскриптов микро-РНК hsa-miR-33b-5p, hsa-miR-423-5p и hsa-miR-7-5p в моче, анализируют первичные данные и вычисляют коэффициенты относительной экспрессии микро-РНК hsa-miR-33b-5p (Khsa-miR-33b-5p) и hsa-miR-423-5p (Khsa-miR-423-5p) в моче как соотношение относительной экспрессии hsa-miR-33b-5p и hsa-miR-423-5p относительно референсной микро-РНК hsa-miR-7-5p, сравнивают полученные значения K с интервалом диагностического коэффициента и при значениях $K_{hsa-miR-33b-5p} \leq 1,04 \cdot 10^{-7}$ и $K_{hsa-miR-423-5p} \leq 3,01 \cdot 10^{-7}$ диагностируют рак яичников, при значениях $K_{hsa-miR-33b-5p} \geq 4,71 \cdot 10^{-7}$ и $K_{hsa-miR-423-5p} \geq 5,11 \cdot 10^{-7}$ диагностируют кистозные образования яичника, при значениях $K_{hsa-miR-33b-5p} \geq 12,47 \cdot 10^{-5}$ и $K_{hsa-miR-423-5p} \leq 0,18 \cdot 10^{-9}$ диагностируют рак тела матки, а при значениях коэффициента K между указанными интервалами считают полученный результат неопределенным.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для оценки уровня hsa-miR-7-5p используют праймеры SEQ ID N1, SEQ ID N2 и SEQ ID N3.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для оценки уровня hsa-miR-33b-5p используют праймеры SEQ ID N4, SEQ ID N5 и SEQ ID N6.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для оценки уровня hsa-miR-423-5p используют праймеры SEQ ID N7, SEQ ID N8 и SEQ ID N9.