

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2788814

Способ малоинвазивной диагностики менингиом и опухолей глиального ряда с уточнением степени злокачественности

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

Авторы: *Пушкин Антон Андреевич (RU), Кит Олег Иванович (RU), Росторгуев Эдуард Евгеньевич (RU), Новикова Инна Арнольдовна (RU), Дженкова Елена Алексеевна (RU), Тимошкина Наталья Николаевна (RU), Гвалдин Дмитрий Юрьевич (RU), Кавицкий Сергей Эммануилович (RU)*

Заявка № 2022115677

Приоритет изобретения **09 июня 2022 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **24 января 2023 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **09 июня 2042 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/57488 (2022.08); C12Q 1/6806 (2022.08); C12Q 1/686 (2022.08); C12Q 1/6876 (2022.08); C12Q 1/6886 (2022.08); C12Q 2600/178 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022115677, 09.06.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.06.2022

Дата регистрации:
24.01.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.06.2022

(45) Опубликовано: 24.01.2023 Бюл. № 3

Адрес для переписки:

344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я Линия, 63,
ФГБУ "НМИЦО" Минздрава РФ, Кит Олег
Иванович

(72) Автор(ы):

Пушкин Антон Андреевич (RU),
Кит Олег Иванович (RU),
Росторгуев Эдуард Евгеньевич (RU),
Новикова Инна Арнольдовна (RU),
Дженкова Елена Алексеевна (RU),
Тимошкина Наталья Николаевна (RU),
Гвалдин Дмитрий Юрьевич (RU),
Кавицкий Сергей Эммануилович (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: RU 2742413 C1, 05.02.2021. RU
2709651 C1, 19.12.2019. WO 2012115885 A1,
30.08.2012. REGAZZO G. et al. A restricted
signature of serum miRNAs distinguishes
glioblastoma from lower grade gliomas. J Exp
Clin Cancer Res. 2016; 35: 124.

(54) Способ малоинвазивной диагностики менингиом и опухолей глиального ряда с уточнением степени злокачественности

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к молекулярной онкологии, и может быть использовано для малоинвазивной диагностики менингиом и опухолей глиального ряда с уточнением степени злокачественности. Проводят анализ экспрессии микроРНК в образце плазмы. Используют высокоспецифичные праймеры для hsa-miR-21-5p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-3180-3, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-190b-5p и cel-miR-39-5p. Вычисляют значения ΔCt hsa-miR-21-5p = Ct hsa-miR-21-5p – Ct cel-miR-39-5p, ΔCt hsa-miR-342-3p = Ct hsa-miR-342-3p – Ct cel-miR-39-5p, ΔCt hsa-miR-3180-3p = Ct hsa-miR-3180-3p – Ct cel-miR-39-

5p, ΔCt hsa-let-7c-5p = Ct hsa-let-7c-5p – Ct cel-miR-39-5p, ΔCt hsa-miR-190b-5p = Ct hsa-miR-190b-5p – Ct cel-miR-39-5p, где Ct - номер порогового цикла, после которого достигается повышение сигнала относительно фоновых значений. При значении ΔCt hsa-miR-21-5p ≥ 1.7 устанавливают диагноз менингиома. При значениях ΔCt hsa-miR-21-5p < 1.7 , ΔCt hsa-miR-342-3p ≥ 2.9 и ΔCt hsa-miR-3180-3p < 13 устанавливают диагноз глиома. При значении ΔCt hsa-miR-21-5p < -1.4 устанавливают GIV степень злокачественности – глиобластома. При значениях ΔCt hsa-let-7c-5p ≥ 0.76 и ΔCt hsa-miR-190b-5p ≥ 10 устанавливают GIII степень

злокачественности – анапластическая астроцитома. При значениях ΔCt hsa-let-7c-5p < 0.76 и ΔCt hsa-miR-190b-5p < 10 устанавливают GII степень злокачественности – диффузная астроцитома. Способ обеспечивает создание и внедрение новой, универсальной, недорогостоящей и точной тест-системы для

диагностики наиболее распространенных первичных опухолей головного мозга, в частности менингиом и опухолей глиального ряда, за счет использования высокоспецифичных праймеров для hsa-miR-21-5p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-3180-3, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-190b-5p и cel-miR-39-5p. 1 табл., 4 пр.

R U 2 7 8 8 8 1 4 C 1

R U 2 7 8 8 8 1 4 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/574 (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 33/57488 (2022.08); *C12Q 1/6806* (2022.08); *C12Q 1/686* (2022.08); *C12Q 1/6876* (2022.08); *C12Q 1/6886* (2022.08); *C12Q 2600/178* (2022.08)

(21)(22) Application: **2022115677, 09.06.2022**

(24) Effective date for property rights:
09.06.2022

Registration date:
24.01.2023

Priority:

(22) Date of filing: **09.06.2022**

(45) Date of publication: **24.01.2023** Bull. № 3

Mail address:

**344037, g. Rostov-na-Donu, ul. 14-ya Liniya, 63,
FGBU "NMITSO" Minzdrava RF, Kit Oleg
Ivanovich**

(72) Inventor(s):

**Pushkin Anton Andreevich (RU),
Kit Oleg Ivanovich (RU),
Rostorguev Eduard Evgenevich (RU),
Novikova Inna Arnoldovna (RU),
Dzhenskova Elena Alekseevna (RU),
Timoshkina Natalia Nikolaevna (RU),
Gvaldin Dmitrii Iurevich (RU),
Kavitskii Sergei Emmanuilovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD FOR MINIMALLY INVASIVE DIAGNOSIS OF MENINGIOMAS AND GLIAL TUMORS WITH SPECIFICATION OF THE DEGREE OF MALIGNANCY**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely to molecular oncology, and can be used for minimally invasive diagnosis of meningiomas and glial tumors with specification of the degree of malignancy. Microrna expression is analyzed in the plasma sample. High specific primers are used for hsa-miR-21-5p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-3180-3, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-190b-5p and cel-miR-39-5p. The values are calculated $\Delta Ct \text{ hsa-miR-3180-3p} = Ct \text{ hsa-miR-3180-3p} - Ct \text{ cel-miR-39-5p}$, $\Delta Ct \text{ hsa-let-7c-5p} = Ct \text{ hsa-let-7c-5p} - Ct \text{ cel-miR-39-5p}$, $\Delta Ct \text{ hsa-miR-190b-5p} = Ct \text{ hsa-miR-190b-5p} - Ct \text{ cel-miR-39-5p}$, where Ct is the threshold cycle number after which an increase in signal relative to background values is achieved. With a value of $\Delta Ct \text{ hsa-miR-21-5p} \geq 1.7$, meningioma is diagnosed. With the values $\Delta Ct \text{ hsa-miR-21-5p} < 1.7$, $\Delta Ct \text{ hsa-miR-342-3p} \geq 2.9$ and $\Delta Ct \text{ hsa-miR-3180-}$

$3p < 13$, glioma is diagnosed. With a value of $\Delta Ct \text{ hsa-miR-21-5p} < -1.4$, the GIV degree of malignancy is determined - glioblastoma. At the values of $\Delta Ct \text{ hsa-let-7c-5p} < 0.76$ and $\Delta Ct \text{ hsa-miR-190b-5p} < 10$, grade GIII of malignancy is established - anaplastic astrocytoma. At values of $\Delta Ct \text{ hsa-let-7c-5p} < 0.76$ and $\Delta Ct \text{ hsa-miR-190b-5p} < 10$, GII degree of malignancy is established - diffuse astrocytoma.

EFFECT: method provides for the creation and implementation of a new, universal, inexpensive and accurate test system for the diagnosis of the most common primary brain tumors, in particular meningiomas and glial tumors, through the use of highly specific primers for hsa-miR-21-5p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-3180-3, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-190b-5p and cel-miR-39-5p.

1 cl, 1 tbl, 4 ex

Изобретение относится к медицине, а именно к молекулярной онкологии, и может найти применение для малоинвазивной скрининговой диагностики менингиом и опухолей глиального ряда с уточнением их степени злокачественности.

Наиболее встречаемыми типами первичных опухолей головного мозга являются глиомы и менингиомы, которые в совокупности составляют 60% от всех первичных опухолей головного мозга (см. Росторгуев, Э.Е. Новые подходы к диагностике и экспериментальной терапии глиальных опухолей высокой степени злокачественности: Автореф. дисс.....д-ра мед. наук: 14.01.12 — Ростов-на-Дону, 2021.).

Глиомы развиваются из глиальных клеток и классифицируются по гистопатологическим и молекулярным признакам на четыре класса, чаще всего на глиомы низкой степени злокачественности (LGG, GI – плацентарная астроцитома и GII – диффузная астроцитома) и глиомы высокой степени злокачественности (HGG, GIII – анапластическая астроцитома и GIV - глиобластома), где наиболее часто встречаемая — глиобластома. Так как прогноз и стратегия лечения пациентов с глиомой зависят от степени злокачественности опухоли, установка точного диагноза имеет важное клиническое значение (см. Altieri R. et al. Molecular biology of gliomas: present and future challenges //Translational medicine@ UniSa. – 2014. – Т. 10. – С. 29).

Глиомы встречается с частотой с частотой 4,7–5,7 случаев на каждые 100 000 человек и является одной из самых агрессивных опухолей головного мозга, так как даже после проведения комбинированной терапии медиана показателей общей выживаемости составляет всего около 14,6 месяцев (см. Ostrom Q. T. et al. Response to “the epidemiology of glioma in adults: a ‘state of the science’ review” //Neuro-oncology. – 2015. – Т. 17. – №. 4. – С. 624-626.). В свою очередь, менингиомы в большинстве случаев являются медленно растущими опухолями и представляют собой наиболее распространенные первичные опухоли головного мозга у взрослых, характеризующиеся почти в два раза более частым возникновением у женщин, чем у мужчин. Большинство менингиом -доброкачественные опухоли (см. Shaikh N., Dixit K., Raizer J. Recent advances in managing/understanding meningioma //F1000Research. – 2018. – Т. 7.).

Прогноз и терапия зависят от раннего определения типа опухоли головного мозга, а точное определение степени злокачественности имеет решающее значение в качестве жизни пациента. Современные подходы к диагностике основаны на методах визуализации - компьютерная томография (КТ), магнитно-резонансная томография (МРТ) с последующим гистологическим и молекулярно-генетическим исследованием опухолевой ткани. Гистологическое и молекулярно-генетическое исследование опухолевого материала, полученного в результате циторедукции или биопсии в настоящее время являются золотым стандартом морфогенетической диагностики глиом. Некоторые глиальные опухоли недоступны для проведения игольчатой биопсии из-за своей локализации, например при расположении в стволе головного мозга (см. Faulkner H. et al. The surgical resection of brainstem glioma: Outcomes and prognostic factors //World neurosurgery. – 2021. – Т. 146. – С. e639-e650.). Более того, ткань, полученная в результате игольчатой стереотаксической биопсии, не всегда охватывает морфологическую и молекулярно-генетическую гетерогенность всей опухолевой массы (см. Wang J., Bettgowda C. Applications of DNA-based liquid biopsy for central nervous system neoplasms //The Journal of Molecular Diagnostics. – 2017. – Т. 19. – №. 1. – С. 24-34.).

Исследования циркулирующих микроРНК в плазме крови представляют надежные и воспроизводимые результаты по диагностике ряда онкологических заболеваний, в том числе первичных опухолей головного мозга (см. Butz H. Circulating Noncoding RNAs in Pituitary Neuroendocrine Tumors—Two Sides of the Same Coin //International Journal of

Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – №. 9. – С. 5122.)

Анализ патентных источников показал наличие способа ранней диагностики глиомы (см. Патент RU 2 772 193 C1, опубликовано 18.05.2022, Бюл. № 14). Патент описывает способ, включающий выбор последовательности ДНК-олигонуклеотидных зондов, комплементарной к участкам кольцевой РНК, ассоциированной с развитием глиомы, и последующую регистрацию кольцевой РНК, циркулирующей в крови пациента, с помощью биосенсора нанопроволочного чипа. По образованию комплексов между указанными последовательностями ДНК-олигонуклеотидных зондов и комплементарными им участками кольцевой РНК диагностируют глиому.

Описанный способ имеет принципы, схожие с нашим способом, но в качестве диагностических молекул используются кольцевые РНК. Кроме того, описанный способ позволяет выявить глиальные опухоли, но без уточнения степени злокачественности и не позволяет дифференцировать глиому от менингиомы.

Техническим результатом заявляемого способа является создание и внедрение новой, универсальной, не дорогостоящей и точной тест-системы с высокоспецифичными последовательностями синтетических олигонуклеотидов для диагностики наиболее распространенных первичных опухолей головного мозга, в частности менингиом и опухолей глиального ряда.

Технический результат достигается тем, что проводят анализ экспрессии микроРНК в образце плазмы, включающий внесение экзогенного контроля в образец плазмы и выделение тотальной РНК, обратную транскрипцию с последующей амплификацией в режиме реального времени, при этом используют высокоспецифичные праймеры для hsa-miR-21-5p, hsa-miR-342-3p и hsa-miR-3180-3, hsa-miR-21-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-190b-5p и cel-miR-39-5p, анализируют полученные данные и вычисляют значения ΔCt hsa-miR-21-5p = Ct hsa-miR-21-5p – Ct cel-miR-39-5p, ΔCt hsa-miR-342-3p = Ct hsa-miR-342-3p – Ct cel-miR-39-5p, ΔCt hsa-miR-3180-3p = Ct hsa-miR-3180-3p – Ct cel-miR-39-5p, ΔCt hsa-let-7c-5p = Ct hsa-let-7c-5p – Ct cel-miR-39-5p, ΔCt hsa-miR-190b-5p = Ct hsa-miR-190b-5p – Ct cel-miR-39-5p, где Ct - номер порогового цикла, после которого достигается повышение сигнала относительно фоновых значений, при значении ΔCt hsa-miR-21-5p ≥ 1.7 устанавливают диагноз менингиома, при значениях ΔCt hsa-miR-21-5p < 1.7 , ΔCt hsa-miR-342-3p ≥ 2.9 и ΔCt hsa-miR-3180-3p < 13 устанавливают диагноз глиома; при значении ΔCt hsa-miR-21-5p < -1.4 устанавливают GIV степень злокачественности - глиобластома, при значениях ΔCt hsa-let-7c-5p ≥ 0.76 и ΔCt hsa-miR-190b-5p ≥ 10 устанавливают GIII степень злокачественности – анапластическая астроцитома, при значениях ΔCt hsa-let-7c-5p < 0.76 и ΔCt hsa-miR-190b-5p < 10 устанавливают GII степень злокачественности – диффузная астроцитома.

Способ малоинвазивной диагностики менингиом и опухолей глиального ряда реализуется путем оценки экспрессии микроРНК hsa-miR-21-5p, hsa-miR-342-3p и hsa-miR-3180-3p относительно экзогенного контроля cel-miR-39-5p в образцах плазмы крови. При выявлении глиальной опухоли головного мозга данный способ позволяет установить степень злокачественности путем оценки экспрессии hsa-miR-21-5p, hsa-let-7c-5p и hsa-miR-190b-5p относительно экзогенного контроля cel-miR-39-5p в образцах плазмы крови.

Способ является новым, так как оценка экспрессии сигнатуры данных микроРНК ранее не использовалась с целью малоинвазивной дифференциальной диагностики менингиом и опухолей глиального ряда, и позволяет оценить степень злокачественности глиомы.

В предварительном исследовании была проведена оценка относительной экспрессии

hsa-miR-21-5p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-3180-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-190b-5p в образцах плазмы крови условно-здоровых добровольцев, пациентов с менингиомой и пациентов с глиальными опухолями различной степени злокачественности (GII-GIV).

Для способа были разработаны специфичные олигонуклеотидные прямые и обратные праймеры для hsa-miR-21-5p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-3180-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-190b-5p, cel-miR-39-5p (см. таблица 1).

Таблица 1.

Наименование микроРНК	Последовательность микроРНК	Последовательность
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	F: CGCAGTAGCTTATCAGACTG (SEQ ID №1) R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTCAACAT (SEQ ID №2)
hsa-miR-342-3p	UCUCACACAGAAUCCGACCCGU	F: CGCAGTCTCACACAGAAATC (SEQ ID №3) R: CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTACGGGT (SEQ ID №4)
hsa-miR-3180-3p	UGGGGCGGAGCUUCCGGAGGC	F: CGCAGGGGGCGGAGCT (SEQ ID №5) R: AGGTCCAGTTTTTTTTTTTGGCCT (SEQ ID №6)
hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	F: CGCAGTGAGGTAGTAGGTTGTA (SEQ ID №7) R: CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTAAACCA (SEQ ID №8)
hsa-miR-190b-5p	UGAUUGUUUGAUUUGGGUUG	F: CGCAGTGATATGTTTGATATTGG (SEQ ID №9) R: CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTCAAC (SEQ ID №10)
cel-miR-39-5p	GCAGAGCTGATTCGTCTTG	F: GCAGAGCTGATTCGTCTTG (SEQ ID №9) R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTATTAC (SEQ ID №9)
Универсальный RT-праймер	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTNN (SEQ ID №13), где N представляет собой A, C и G, а N представляет собой A, C, G и T	

Заявленный способ осуществляется следующим образом:

На первом этапе образцы крови объемом 6 мл получают путем венепункции в вакутейнеры, содержащие K_2 ЭДТА. После взятия пробирки перемешивают переворачиванием в течение 10 сек. и хранят до обработки не более 30 минут при +4°C. Для получения плазмы кровь центрифугируют при 1500g, +4°C в течение 10 минут. Бесклеточную фракцию переносят в новую пробирку и центрифугируют при 12000g, +4°C в течение 10 минут, супернатант отбирают и хранят при -80°C.

На втором проводят выделение фракции циркулирующих микроРНК из образцов плазмы с использованием набора miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) с учетом рекомендаций производителя. Фракцию микроРНК элюируют в 15 мкл ультрачистой воды. Перед выделением в образце плазмы вносят 5 мкл 5мМ экзогенного еонтроля cel-miR-39-5p.

На третьем этапе проводят синтез кДНК с использованием смеси реактивов, включающую 1x реакционный буфер, 0.1 мМ АТФ, 1 мкМ универсального праймера для обратной транскрипции, 0.1 мМ смеси дидезоксинуклеотидов (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 10 ед/мкл обратной транскриптазы MMLV (Евроген, Россия), 0.1 ед/мкл поли (А)-полимеразы (New England Biolabs, США), 1 ед/мкл Ribolock ингибитора РНКаз (Thermo Fisher Scientific, США), 1 мМ DTT и 14 мкл элюата, содержащего фракцию микроРНК, общий объем смеси составляет 26 мкл. Реакционную смесь инкубируют при 42 °С в течение часа, с последующей инактивацией ферментов при 95°C в течение 5 минут с использованием амплификатора C1000 touch (Bio-Rad Laboratories, США).

На четвертом этапе полученную комплементарную ДНК (кДНК) используют для проведения полимеразной цепной реакции в общем объеме 20 мкл в присутствии 5 мкл 10x разведенной кДНК, 1x EvaGreen (Евроген, Россия), 1x реакционного буфера, 0.2 мМ смеси дидезоксинуклеотидов (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 2мМ $MgCl_2$, 0.25 мкМ прямого и обратного праймера, 0.05 ед/мкл Taq-полимеразы (Евроген, Россия). Для каждого образца и пары праймеров проводят исследования контроля без матрицы (no template control, NTC) и контроля без обратной транскрипции (no reverse transcriptase

control, NRT). Температурный режим амплификации включает: 95С в течение 5-10 мин, затем 40 циклов при 95С в течение 10 с и 60С в течение 30 с, с детекцией сигнала FAM-каналом. Амплификацию каждой микроРНК проводят в трех повторах.

Относительная экспрессия микро-РНК вычисляется следующим образом:

5 - рассчитывают среднее геометрическое C_t по трём повторам для целевой и референсной микроРНК, где C_t - номер порогового цикла, после которого достигается повышение сигнала относительно фоновых значений;

- рассчитывают значение $\Delta C_t \text{ hsa-miR-21-5p} = C_t \text{ hsa-miR-21-5p} - C_t \text{ cel-miR-39-5p}$;

10 - рассчитывают значение $\Delta C_t \text{ hsa-miR-342-3p} = C_t \text{ hsa-miR-342-3p} - C_t \text{ cel-miR-39-5p}$;

- рассчитывают значение $\Delta C_t \text{ hsa-miR-3180-3p} = C_t \text{ hsa-miR-3180-3p} - C_t \text{ cel-miR-39-5p}$;

- рассчитывают значение $\Delta C_t \text{ hsa-let-7c-5p} = C_t \text{ hsa-let-7c-5p} - C_t \text{ cel-miR-39-5p}$;

- рассчитывают значение $\Delta C_t \text{ hsa-miR-190b-5p} = C_t \text{ hsa-miR-190b-5p} - C_t \text{ cel-miR-39-5p}$.

15 При значении $\Delta C_t \text{ hsa-miR-21-5p} \geq 1.7$ устанавливают диагноз менингиома, при значениях $\Delta C_t \text{ hsa-miR-21-5p} < 1.7$, $\Delta C_t \text{ hsa-miR-342-3p} \geq 2.9$ и $\Delta C_t \text{ hsa-miR-3180-3p} < 13$ устанавливают диагноз глиома. При выявлении глиальной опухоли головного мозга способ позволяет уточнить степень злокачественности – при значении $\Delta C_t \text{ hsa-miR-21-5p} < -1.4$ устанавливают GIV степень злокачественности -глиобластома, при значениях
20 $\Delta C_t \text{ hsa-let-7c-5p} \geq 0.76$ и $\Delta C_t \text{ hsa-miR-190b-5p} \geq 10$ устанавливают GIII степень злокачественности – анапластическая астроцитома, при значениях $\Delta C_t \text{ hsa-let-7c-5p} < 0.76$ и $\Delta C_t \text{ hsa-miR-190b-5p} < 10$ устанавливают GII степень злокачественности – диффузная астроцитома.

25 Для доказательства прогностической ценности предлагаемой тест-системы приводятся выписки из 4х историй болезни.

Пример 1.

30 Больная Х., 62 г. Жалобы на головную боль, приступы головокружения, приступы потери сознания. МРТ головного мозга с контрастированием от 25.08.2020: Картина вне мозгового образования (парасагиттальная менингиома), размерами 21,3х25х19мм.

Результаты молекулярного анализа образца плазмы крови до лечения $\Delta C_t \text{ hsa-miR-21-5p} = 1.9$ соответствует наличию у пациента менингиомы.

Дата операции: 04.09.2020 – резекционная краниэктомия в левой лобной области, удаление менингиомы с применением нейрофизиологического мониторинга (1 степень радикальности по Симпсону), пластикой дефекта ТМО при помощи пластины Nemonatch.
35 Диагноз- (D32.0) Переходная менингиома (гистологическое исследование 75597-07\2020 WHO G1 в левой лобной области головного мозга с внутрикостным ростом и ростом в стенку верхнего сагиттального синуса. Состояние после краниэктомии, удаления менингиомы – 1 степень радикальности по Симпсону (04.09.2020, «НМИЦ онкологии»).

40 Пример 2.

Больной Л., 49 л. Жалобы на головные боли, генерализованные судорожные приступы. МРТ головного мозга с контрастным усилением от 13.10.2020: Срединные структуры смещены вправо на 7 мм. Вещество мозга протяженно инфильтрировано опухолью. В левой лобной, островковой и левой височной доле выявлена массивная
45 кистозно-солидная опухоль с интравентрикулярным ростом, с распространением на подкорковые ядра с пери-фокальным вазогенным отеком, общими размерами 47х55х42 мм. Структура опухоли изменена за счет участков ограничения диффузии в солидной ткани, участков с центральным некрозом. Объемный эффект в виде сужения прилежащих

субарахноидальных пространств, компрессии и инфильтрации тела левого бокового желудочка. Опухоль вовлекает ветви левой СМА. После в/в усиления опухоль диффузно неоднородно накапливает контраст солидным компонентом по периферии полостей некроза. В опухоли патологическая сосудистая сеть, больше в правой лобной доле.

5 Миндалины мозжечка расположены на уровне большого затылочного отверстия. При DTI кортикоспинальный и кортикоталамический тракты слева на уровне опухоли и перитуморальной зоны частично разрушены, отмечается оскуднение и смещение проводящих путей, в опухоли прослеживаются нечетко.

10 Результаты молекулярного анализа образца плазмы крови до лечения ΔCt hsa-miR-21-5p = 0.5, ΔCt hsa-miR-342-3p = 3.1 и ΔCt hsa-miR-3180-3p = 12.3 соответствуют наличию глиальной опухоли. Значения ΔCt hsa-let-7c-5p = 0.81 и hsa-miR-190b-5p = 10.3 предполагают наличие анапластической астроцитомы - GIII.

15 Название и дата операции: 06.11.2020 – костнопластическая краниотомия в левой височной области, удаление опухоли с интраоперационным пробуждением пациента и применением нейрофизиологического мониторинга.

20 Диагноз. (C71.8) Анапластическая астроцитома Grade III (номер гистологической верификации 97904–08\2020. левых лобной и височной долей с распространением на островковую долю головного мозга. Состояние после костнопластической краниотомии в левой височной области, удаления опухоли с интраоперационным пробуждением пациента и применением нейрофизиологического мониторинга (06.11.2020, НМИЦ онкологии»). Без стадии. Клиническая группа 2. Осложнение основного: Симптоматическая эпилепсия.

Пример 3.

25 Больная К., 64 г. (C71.8). Жалобы на снижение зрения, слабость в левых конечностях. МРТ головного мозга с контрастным усилением от 16.10.2020: Срединные структуры смещены влево на уровне СЧЯ до 5–6 мм. В подкорковых ядрах, таламусе, теменной доле правого полушария выявлена зона, представленная опухолью с вазогенным отеком по периферии, общими размерами около 40x34x41мм. Структура кистозно-солидная, в солидном компоненте участки геморрагического пропитывания. Компрессия III-го
30 и правого бокового желудочка мозга. Сужение с/а пространств, боковой щели правого полушария. После в/в усиления отмечается диффузное равномерное периферическое накопление контраста тканью опухоли в подкорковых ядрах и таламусе, в виде сливающихся между собой узлов размерами 23x29 и 17x14 мм. При DTI разрушение/
35 инфильтрация проводящих трактов на уровне опухоли, вовлечение в процесс правого кортикоспинального тракта, инфильтрация заднего бедра внутренней капсулы. Боковые желудочки мозга асимметричны, D < S, не расширены.

Результаты молекулярного анализа образца плазмы крови до лечения ΔCt hsa-miR-21-5p = -1.5 предполагают наличие глиальной опухоли – GIV глиобластома.

40 Название и дата операции: 29.10.2020 – стереотаксическая биопсия опухоли с применением навигационной системы Medtronic «StealthStation S7», нейрофизиологического мониторинга и интраоперационной флюоресцентной микроскопии.

45 Диагноз- глиобластома Grade IV (гистологическое исследование № 94239\2020) подкорковых ядер, таламуса, теменной доли правого полушария головного мозга. Состояние стереотаксической биопсии опухоли (29.10.2020, «НМИЦ онкологии»). Без стадии. Клиническая группа 2. Осложнение основного: Дислокационный синдром. Левосторонний гемипарез.

Пример 4.

Больной Ш. 32 г. Жалобы: головная боль, генерализованные судорожные приступы. МРТ головного мозга с контрастным усилением от 09.10.2020: Срединные структуры не смещены. Вещество мозга локально деформировано. В левой височной области по ходу нижней и средней височных извилин с перифокальным вазогенным отеком, и глиозом выявлена область диспластических изменений общими размерами 24x18x18 мм, с локальным нарушением типичного рисунка борозд и извилин. Объемный эффект не выражен. После в/в усиления зона диспластических изменений не накапливает контраст. Миндалины мозжечка расположены на уровне большого затылочного отверстия. При DTI кортико-спинальный и кортико-таламический тракты справа и слева сохранены, в височной доле локально разрушены. Толщина коры за пределами процесса диффузно снижена до 2-3 мм. Ликвородинамика не нарушена. Боковые желудочки мозга симметричны по 8 мм, не изменены. III-й желудочек не расширен. IV-й желудочек не расширен. Дополнительных образований в области мостомозжечковых углов не выявлено. Базальные цистерны не расширены, не деформированы, субарахноидальные конвекситальные пространства и борозды полушарий головного мозга не расширены. Кости черепа без деструкции. Краниовертебральный переход - без особенностей. Искривление носовой перегородки. Пневматизация синусов не нарушена, отек и гипертрофия слизистой левой верхнечелюстной пазухи. Орбиты и хиазмальная область без особенностей, гипофиз толщиной 5 мм, ткань гипофиза имеет обычный сигнал. Внутренние слуховые проходы не расширены. Без инфильтрации по ходу зрительных нервов.

Результаты молекулярного анализа образца плазмы крови до лечения ΔCt hsa-miR-21-5p = 0.7, ΔCt hsa-miR-342-3p = 3.3 и ΔCt hsa-miR-3180-3p = 11.4 соответствуют наличию глиальной опухоли. Значения ΔCt hsa-let-7c-5p = 0.55 и hsa-miR-190b-5p = 9.7 предполагают наличие диффузной астроцитомы GII.

Название и дата операции: 22.10.2020 – костнопластическая краниотомия в левой височной области, удаление опухоли с интраоперационным пробуждением пациента и применением нейрофизиологического мониторинга. Диагноз (C71.2)- диффузная астроцитома G II (гистологическая верификация 91944-47\20) левой височной доли головного мозга. Состояние после костнопластической краниотомии в левой височной области, удаления опухоли с интраоперационным пробуждением пациента (22.10.2020, «НМИЦ онкологии»). Осложнение: Симптоматическая эпилепсия.

Клинические данные, полученные в результате амбулаторного обследования данных пациентов, впоследствии подтвердили поставленный диагноз в соответствии с диагностическим значением микроРНК в образцах плазмы крови пациентов, полученных до начала лечения.

Анализ представленных клинических случаев демонстрирует возможности малоинвазивной диагностики менингиом и опухолей глиального ряда с уточнением их степени злокачественности с использованием оценки экспрессии hsa-miR-21-5p, hsa-miR-342-3p и hsa-miR-3180-3, hsa-miR-21-5p, hsa-let-7c-5p и hsa-miR-190b-5p в образцах плазмы крови относительной экзогенного контроля cel-miR-39-5p методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

(57) Формула изобретения

Способ малоинвазивной диагностики менингиом и опухолей глиального ряда с уточнением степени злокачественности, заключающийся в том, что проводят анализ экспрессии микроРНК в образце плазмы, включающий внесение экзогенного контроля в образец плазмы и выделение тотальной РНК, обратную транскрипцию с последующей

амплификацией в режиме реального времени, при этом используют высокоспецифичные праймеры для hsa-miR-21-5p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-3180-3, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-190b-5p и cel-miR-39-5p, анализируют полученные данные и вычисляют значения ΔCt hsa-miR-21-5p = Ct hsa-miR-21-5p – Ct cel-miR-39-5p, ΔCt hsa-miR-342-3p = Ct hsa-miR-342-3p – Ct cel-miR-39-5p, ΔCt hsa-miR-3180-3p = Ct hsa-miR-3180-3p – Ct cel-miR-39-5p, ΔCt hsa-let-7c-5p = Ct hsa-let-7c-5p – Ct cel-miR-39-5p, ΔCt hsa-miR-190b-5p = Ct hsa-miR-190b-5p – Ct cel-miR-39-5p, где Ct - номер порогового цикла, после которого достигается повышение сигнала относительно фоновых значений, при значении ΔCt hsa-miR-21-5p ≥ 1.7 устанавливают диагноз менингиома, при значениях ΔCt hsa-miR-21-5p < 1.7 , ΔCt hsa-miR-342-3p ≥ 2.9 и ΔCt hsa-miR-3180-3p < 13 устанавливают диагноз глиома; при значении ΔCt hsa-miR-21-5p $< -1,4$ устанавливают GIV степень злокачественности - глиобластома, при значениях ΔCt hsa-let-7c-5p ≥ 0.76 и ΔCt hsa-miR-190b-5p ≥ 10 устанавливают GIII степень злокачественности – анапластическая астроцитома, при значениях ΔCt hsa-let-7c-5p < 0.76 и ΔCt hsa-miR-190b-5p < 10 устанавливают GII степень злокачественности – диффузная астроцитома.