

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

« 01 » июня 2017 г.

Регистрационный № 025-0417

МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ
ИМПЛАНТАЦИОННЫХ МЕТАСТАЗОВ У РАДИКАЛЬНО
ОПЕРИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ РАКОМ
ЖЕЛУДКА

инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

Авторы: д.б.н., проф. Р.М.Смолякова, к.м.н., доц. М.Ю.Ревтович,
д.м.н. А.И.Шмак

Минск 2017

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

01.07.2017

Регистрационный № 025-0417

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ ИМПЛАНТАЦИОННЫХ
МЕТАСТАЗОВ У РАДИКАЛЬНО ОПЕРИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ,
СТРАДАЮЩИХ РАКОМ ЖЕЛУДКА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

АВТОРЫ: д-р биол. наук, проф. Р.М. Смолякова, канд. мед. наук, доц.
М.Ю. Ревтович, д-р мед. наук А.И. Шмак

Минск 2017

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод прогнозирования имплантационных метастазов у радикально оперированных пациентов, страдающих раком желудка, на основе многопараметрического анализа молекулярно-генетических маркеров, который может быть использован в комплексе медицинских услуг по лечению рака желудка.

Метод предназначен для врачей-онкологов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим раком желудка.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Перечень необходимых медицинских изделий

1. Бокс биологической безопасности 2 класса (тип В2, без рециркуляции).
2. Термостат твердотельный с функцией охлаждения (4–100°C).
3. Вортекс.
4. Микроцентрифуга, обеспечивающая скорость вращения ротора до 14 000 об/мин.
5. Амплификатор (термоциклер) для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.
6. Автоматические дозаторы переменного объема.
7. Холодильник (2–8°C).
8. Низкотемпературный морозильник (-70°C).
9. Система гель-документации, аналогичная GelDocXR+.
10. Хладоэлемент или охладитель проб.
11. Вакуумный аспиратор.

Перечень необходимых реактивов и расходных материалов

1. Наборы для выделения общей фракции РНК (сорбционный принцип).
2. Набор реагентов для проведения реакции обратной транскрипции.
3. Набор реагентов для проведения бисульфитной конверсии.
4. Набор реагентов для выделения ДНК.
5. Набор реагентов для ПЦР в режиме реального времени.
6. Набор реагентов для метил-специфической ПЦР.
7. Набор реагентов для электрофореза.
8. Микропробирки объемом 1,5 мл.
9. Микропробирки объемом 0,2 мл или микропробирки в стрипах, имеющие маркировку для ПЦР, и оптические крышки к ним.
10. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл.
11. Спирт этиловый 96%.
12. Спирт этиловый 70%.
13. Хлороформ.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Пациенты, страдающие раком желудка pT1-4bN0-3bM0 после радикального хирургического лечения.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Забор материала

Для проведения молекулярно-генетических исследований используются фрагменты нативной и фиксированной в 10% нейтральном формалине и залитой в парафин опухолевой ткани желудка и париетальной брюшины, а также смывы с брюшины.

Опухолевую ткань получают во время хирургического вмешательства либо в ходе диагностической пункционной биопсии, которые производятся стандартными методами. Для получения смывов с брюшины в верхний этаж брюшной полости вводится и аспирируется 50 мл физиологического раствора.

При необходимости допускается хранение нативной опухолевой ткани и смывов с брюшины при температуре -70°C и однократное размораживание.

Определение статуса метилирования промоторного участка гена RECK в первичной опухоли и смывах с брюшины

1. Выделение общей фракции геномной ДНК из опухолевой ткани желудка, заключенной в парафин, с использованием набора реагентов, основанного на сорбционном принципе, согласно инструкции производителя.

2. Выделение общей фракции геномной ДНК из смывов брюшины с использованием набора реагентов, основанного на сорбционном принципе, согласно инструкции производителя.

3. Постановка реакции бисульфитной конверсии с использованием набора реагентов для бисульфитной конверсии согласно инструкции производителя.

4. Постановка полимеразной цепной реакции (далее — ПЦР) с использованием набора реагентов для амплификации и праймеров согласно инструкции производителя.

5. Анализ продуктов ПЦР в 2% агарозном геле по стандартной методике.

Определение экспрессии маркеров биологической активности аденокарциномы желудка MMP-7, PRL-3, COX-2, TOP I, TOP II α

1. Выделение общей фракции РНК из нативной опухолевой ткани желудка с использованием набора реагентов, основанного на сорбционном принципе, согласно инструкции производителя.

2. Постановка реакции обратной транскрипции с использованием набора реагентов для постановки реакции обратной транскрипции согласно инструкции производителя.

3. Постановка ПЦР в режиме реального времени с использованием набора реагентов для амплификации и праймеры (указаны в таблице) согласно

инструкции производителя. В качестве референсного гена используется SCARNA5.

Таблица — Последовательности олигонуклеотидных праймеров для ПЦР в режиме реального времени

Исследуемый ген	Последовательности олигонуклеотидных праймеров	
MMP-7	Прямой праймер	5'– AACTCCCGCGTCATAGAAAT–3'
	Обратный праймер	5'– GATACGATCCTGTAGGTGAC–3'
	ТaqMan зонд	FAM-CTGCAACATCTGGCACTCCAC-BHQ1
PRL-3	Прямой праймер	5'– GGGACTTCTCAGGTTCGTGTC–3'
	Обратный праймер	5'– AGCCCCGTACTTCTTCAGGT–3'
	ТaqMan зонд	FAM-TGGAGGTGAGCTACAAACACATGCG-BHQ1
COX-2	Прямой праймер	5'– GAATCATTCACCAGGCAAATTG–3'
	Обратный праймер	5'– TTTCGTTACTGCGGGTGGAAAC–3'
	ТaqMan зонд	FAM-TTCCTACCACCAGCAACCCTGCCA-BHQ1
TOP I	Прямой праймер	5'– AAGATGGGCATGCTGAAGAGACGA–3'
	Обратный праймер	5'– AAGATGCCAAGGTTCTTCTCCTCCT–3'
	ТaqMan зонд	FAM-TCCAGGAAACCAGCCAAGTAACCT-BHQ1
TOP II α	Прямой праймер	5'– AGTCGCTTTCAGGGTTCTTGAG–3'
	Обратный праймер	5'– TTTCATTTACAGGCTGCAATGG–3'
	ТaqMan зонд	FAM-CCCTTCACGACCGTCACCATGGA-BHQ1
SCARNA5	Прямой праймер	CCTCCCGTCACATTTAAGTCA
	Обратный праймер	GCCGATCACTCTCAGAAACAC
	ТaqMan зонд	FAM-TCATGGAGCAGCTGATAATTTG-BHQ1

4. Анализ результатов

Для нормализации данных используется усредненное значение C_p (кроссинг поинт) образцов ткани желудка без признаков морфологического изменения. Для получения значений C_p применяется метод максимума второй производной кривых флуоресценции образцов.

Пороговыми значениями экспрессии генов во фрагментах первичной опухоли являются:

- для MMP-7 — 4 отн. ед.
- для TOP I — 7 отн. ед.
- для TOP II α — 6 отн. ед.

Пороговыми значениями экспрессии генов во фрагментах париетальной брюшины диафрагмы и боковых каналов являются:

- для MMP-7 — 0 отн. ед.
- для PRL-3 — 2 отн. ед.
- для COX-2 — минус 1 отн. ед.

Диагностические критерии оценки степени метастатического поражения регионарного лимфоколлектора

pN0 — нет признаков метастатического поражения регионарных лимфатических узлов;

- pN1 — метастазы в 1–2 регионарных лимфоузлах;
- pN2 — метастазы в 3–6 регионарных лимфоузлах;
- pN3 — метастазы в 7 или более регионарных лимфоузлах;
- pN3a — метастазы в 7–15 регионарных лимфоузлах;
- pN3b — метастазы в 16 или более регионарных лимфоузлах.

Прогнозирование развития имплантационных метастазов

При отрицательном статусе метилирования RECK в смывах после лимфодиссекции (RECK–смывы) и при степени метастатического поражения регионарного лимфоколлектора, соответствующей pN0-1 вероятность развития перитонеальной диссеминации (по Каплан-Майеру) составляет в течение одного года 14%, в течение двух лет — 17%, в течение трех лет — 21%, что соответствует стандартному риску развития перитонеальной диссеминации. С увеличением степени метастатического поражения регионарного лимфоколлектора до pN2-3 (т. е. при наличии метастазов в 7 и более регионарных лимфатических узлах) **и/или** при наличии RECK+ смывов после лимфодиссекции вероятность развития перитонеальной диссеминации (по Каплан-Майеру) составляет в течение одного года 48%, в течение двух лет — 55%, в течение трех лет — 59%, что соответствует высокому риску ее развития.

Оценка риска развития имплантационных метастазов выполняется по следующему алгоритму. Для прогнозирования развития имплантационных метастазов после радикального хирургического лечения рака желудка оценивается статус метилирования промоторного участка гена *RECK* в смывах с брюшины после завершения лимфодиссекции (этап 1). Положительный статус метилирования свидетельствует о высоком риске развития имплантационных метастазов; при отрицательном статусе метилирования оценивается степень метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (этап 2): а) при pN2-3 имеется высокий риск формирования канцероматоза, что не требует дополнительных исследований; б) при отсутствии метастазов в регионарных лимфоузлах или при наличии метастазов в 1-2 регионарных лимфоузлах (pN0-1) для повышения точности прогноза и снижения вероятности ложноотрицательного результата при определении статуса метилирования RECK оправдано использование значений экспрессии любого из генов, упомянутых в таблице (этап

3): в первичной опухоли — MMP-7, TOP I, TOP II α ; в париетальной брюшине диафрагмы и боковых каналов — MMP-7, PRL-3, COX-2. Схема алгоритма оценки риска формирования канцероматоза после радикального хирургического лечения представлена на рисунке.

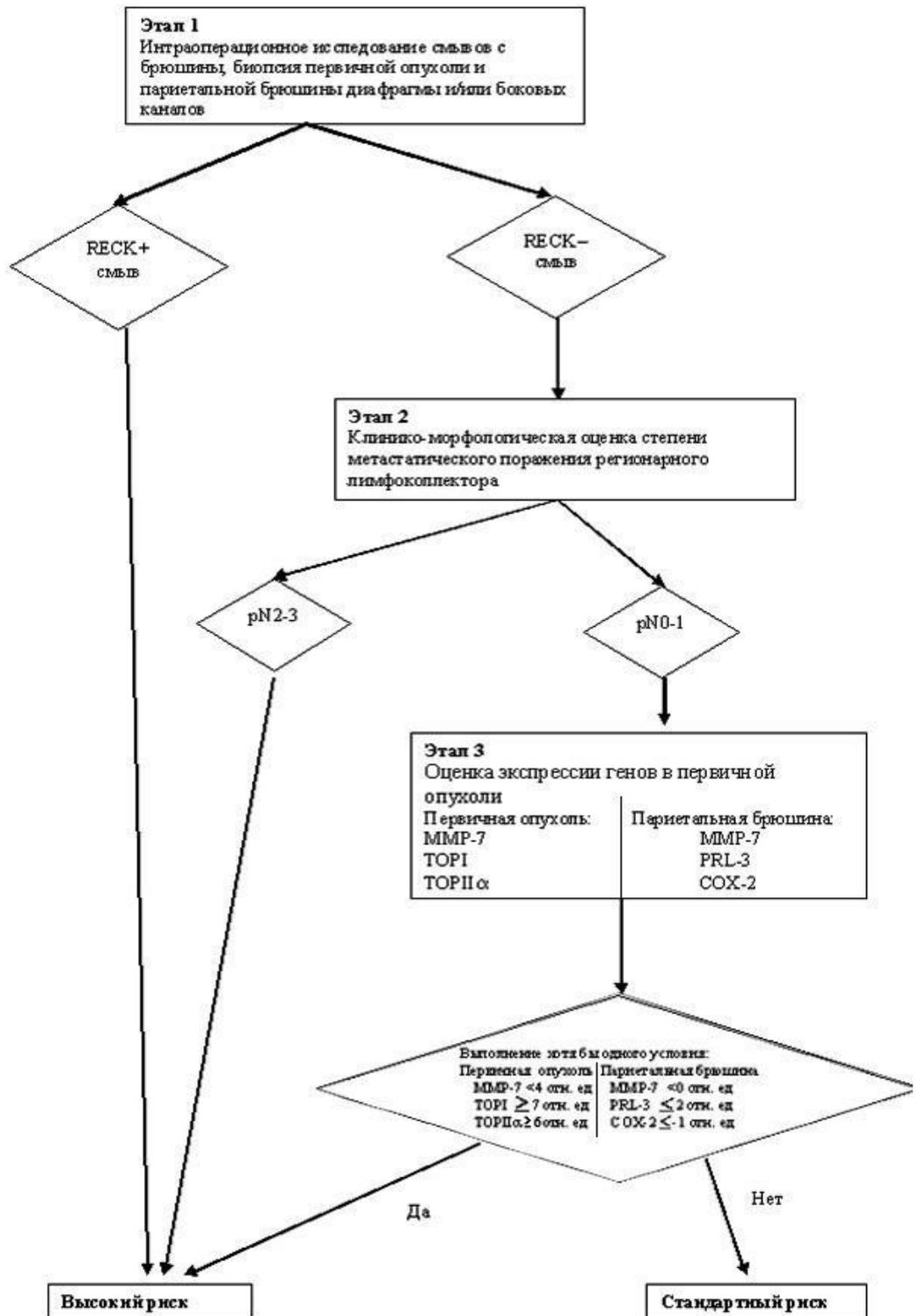


Рисунок — Алгоритм использования метода прогнозирования развития имплантационных метастазов у радикально оперированных пациентов, страдающих раком желудка

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Неправильное хранение биологического материала.

Устранение: биологический материал после забора незамедлительно доставлять в лабораторию.

2. Использование реагентов с истекшим сроком годности или реагентов, условия хранения которых не соблюдались.

Устранение: не использовать реагенты с истекшим сроком годности и соблюдать условия их хранения.

УТВЕРЖДАЮ

руководитель учреждения, в котором

внедрен способ

« ____ » _____ 20 ____ г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. Название предложения для внедрения: Метод прогнозирования развития имплантационных метастазов у радикально оперированных пациентов, страдающих раком желудка.

2. Кем предложено (наименование учреждение-разработчика, автор):
ГУ РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, 223040, Минский р-н, агр. Лесной, доктор биологических наук, проф. Р.М.Смолякова, кандидат медицинских наук, доц. М.Ю.Ревтович, доктор медицинских наук А.И.Шмак

3. Источник информации: инструкция по применению № _____

4. Где и когда начато внедрение _____

наименование лечебного учреждения, дата внедрения

5. Общее количество наблюдений _____

6. Результаты применения метода за период с _____ по _____

положительные (к-во наблюдений): _____

отрицательные (к-во наблюдений): _____

неопределенные (к-во наблюдений): _____

7. Эффективность внедрения: _____

8. Замечания, предложения _____

Дата _____

Ответственные за
внедрение

должность, Ф.И.О., кафедра

подпись

Примечание. Акт о внедрении направляется организации-разработчику (п.2), п.п. 4 – 8 заполняются организацией, внедрившей разработку.