

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»



Первый заместитель Министра

Е.Л. Богдан

2021 г.

Регистрационный номер № 051-0621

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ
ТРАНСФОРМАЦИИ ЛЕЙКОПЛАКИЙ СЛИЗИСТОЙ
ОБОЛОЧКИ РТА**

(инструкция по применению)

Учреждения-разработчики:

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»

ГНУ «Институт Генетики и Цитологии НАН Беларуси»

Авторы: д.м.н., профессор Рубникович С.П., д.б.н., академик НАН
Беларуси Кильчевский А.В., к.м.н. Карпук Н.А., к.б.н. Михаленко Е.П.,
д.м.н., доцент Карпук И.Ю., Мазур О.Ч., д.м.н., доцент Жильцов И.В.

Витебск, 2021

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на прогнозирование трансформации лейкоплакий слизистой оболочки рта (СОР) (K13.2) в плоскоклеточный рак слизистой оболочки рта (C06.9) путём оценки наличия и характера генетических вариантов (мутаций) в геноме клеток из очага лейкоплакий.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-стоматологов, онкологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с симптомами лейкоплакий слизистой оболочки рта.

**Перечень необходимых медицинских изделий,
лекарственных средств, реактивов и т.д.**

1. Ультраморозильник.
2. Центрифуга для пробирок Эппендорфа, способная разгоняться до 8000 об/мин.
3. Компактный флуориметр Quantus.
4. Вортекс.
5. Термостат.
6. Термоциклер для выполнения ПЦР в реальном времени; оборудование ПЦР-лаборатории.
7. Аппарат для капиллярного электрофореза TapeStation (Agilent).
8. Высокопроизводительный секвенатор NextSeq 550 (Illumina).
9. Персональный компьютер с установленной операционной системой Windows 10, имеющий высокоскоростное подключение к сети Интернет, с установленным программным обеспечением, необходимым

для биоинформационного и статистического анализа данных секвенирования.

10. Набор реагентов для экстракции ДНК из биологических образцов.

11. Набор Nextera DNA ExomeKit для подготовки ДНК-библиотек и выполнения собственно секвенирования, пригодных для секвенирования с использованием высокопроизводительного секвенатора IlluminaNextSeq 550.

12. Калибровочный стандарт для флуориметра QuantiFluor-буфер или аналог.

13. Вакуумные пробирки объемом 10 мл с К2 ЭДТА.

14. Пробирки Эппендорфа объёмом 1,5 мл и 0,2 мкл.

15. Пипеточные дозаторы с изменяемым объёмом на 0,1-2 мкл, 2-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл.

16. Сменные наконечники к пипеточным дозаторам с фильтрами.

Показания к применению

1. Лейкоплакия слизистой оболочки рта (К13.2) (при наличии гистологических признаков дисплазии эпителия слизистой оболочки рта).

Противопоказания для применения

1. Противопоказаний нет.

Описание технологии использования метода с указанием этапов

Способ осуществляется в несколько этапов следующим образом:

Этап 1. Отбор биологического материала.

Периферическая кровь забирается из кубитальной вены утром натощак в вакуумные пробирки объемом 10 мл с К2 ЭДТА, после чего

из нее путем центрифугирования получают плазму, которая подвергается глубокой заморозке для последующего хранения ($t^{\circ} = -80^{\circ}\text{C}$).

Этап 2. Выделение ДНК из крови.

Выделение ДНК из венозной крови осуществляют с помощью любого коммерческого набора реагентов для выделения ДНК из крови согласно инструкции фирмы-производителя.

Этап 3. Проведение полноэкзомного секвенирования с использованием высокопроизводительного секвенатора NextSeq 550 (Illumina).

1. Измерение концентрации образцов ДНК на Quantus-флуориметре.

Процедура:

– откалибровать прибор, смешав 1 мкл лямбда-ДНК с 200 мкл QuantiFluor-буфера и используя эту пробу в качестве стандарта.

– добавить 2 мкл образца в 200 мкл QuantiFluor-буфера;

– встряхнуть на вортексе в течение 1 минуты, осадить, инкубировать 5 мин в темном месте;

– измерение: поставить оптическую пробирку в прибор, закрыть крышку, выставить режим «автоматическое измерение», запустить прибор.

2. Разведение образцов ДНК ресуспензирующим буфером до концентрации 5 нг/мкл.

Минимальный объем исходной ДНК – 10 мкл.

Проводится поэтапно:

– разведение образцов ДНК до концентрации 10 нг/мкл.

Необходимо смешать раствор исходной ДНК с ресуспензирующим буфером в 1,5 мл пробирке Эппендорфа. Объем буфера необходимо

рассчитать в соответствии с концентрацией исходной ДНК. Полученную смесь нужно встряхнуть на шейкере при 1200 об/мин в течение 1 минуты.

- измерение концентрации разведенной ДНК на Quantus-флуориметре.

- разведение образцов ДНК до концентрации 5 нг/мкл.

- измерение концентрации разведенной ДНК на Quantus-флуориметре.

Конечный объем образца не менее 50 нг геномной ДНК с концентрацией 5 нг/мкл.

3. Подготовка ДНК-библиотек для секвенирования на приборе NextSeq 550.

Подготовку образцов ДНК для секвенирования проводят с использованием комплекта реагентов Nextera DNA ExomeKit или аналога, разрешенного фирмой производителем секвенатора NextSeq 550.

Все операции по подготовке ДНК-библиотек к секвенированию выполняются пошагово в строгом соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой производителем к набору реагентов.

На этапах оценки качества полученных отдельных ДНК-библиотек и пула ДНК-библиотек используется Quantus-флуориметр (для оценки концентраций) как описано выше, а также аппарат для капиллярного электрофореза TapeStation (Agilent).

Оценка качества полученных ДНК-библиотек с использованием TapeStation (Agilent).

- оценить чистоту проб, отсутствие димеров, длину полученных библиотек по показаниям TS. Ожидаемая длина фрагментов – 200-500 пар нуклеотидов;

– при наличии посторонних пиков провести дополнительную очистку образцов на магнитных частицах AMPurebeads, при отсутствии или низкой концентрации библиотек в образце – вернуться на этап амплификации с индексными адаптерами.

Готовый пул ДНК-библиотек можно заморозить при $-25^{\circ}\text{C} \dots -15^{\circ}\text{C}$ и хранить до 7 дней.

4. Подготовка пула библиотек к секвенированию.

На данном этапе пул подготовленных ДНК-библиотек разводится до загрузочной концентрации, денатурируется, нормализуется и смешивается с контрольным образцом для последующей загрузки в секвенатор.

Необходимо рассчитать молярную концентрацию пула библиотек согласно формуле «С пула/средняя длина библиотек/ 660×10^6 » и развести ее в RSB-буфере до 0,5-4 nM (в зависимости от исходной концентрации подготовленных ДНК-библиотек).

5. Запуск секвенатора NextSeq 550 (Illumina).

Подготовить для запуска прибора реагенты (картридж, проточную ячейку, буферный картридж), внести подготовленную пробу и контроль в загрузочный картридж, запустить секвенирование.

Этап 3. Биоинформационный анализ данных.

Проводится согласно разработанному исследователями алгоритму или с использованием готовых коммерческих решений.

Независимо от выбранного способа обработки данные проходят следующие этапы анализа:

- исключение ридов с низким качеством прочтения;
- выравнивание данных на референсный геном (alignment) – процесс соотнесения каждого короткого рида по отношению к соответствующей позиции референсного генома;

– определение вариантов (variant calling) – этап выявления вариантов, отличающихся от референсной последовательности, позволяет определить тип генетических вариантов, включая их наследственный характер, оценить уровень экспрессии генов, идентифицировать новые гены и регуляторные элементы;

– аннотация вариантов (variant annotation) – этап, заключающийся в описании найденных вариантов с использованием имеющихся баз данных (ClinVar, COSMIC, OMIM и др.);

– фильтрация вариантов – этап отбора вариантов, наиболее подходящих под клинику заболевания.

Результаты биоинформационного анализа оформляются в заключение по стандартной форме (см. рисунок 1).

1. Патогенные варианты нуклеотидной последовательности, являющиеся вероятной причиной заболевания.

Ген	Положение (GRCh37/hg19)	Генотип	Экзон	Положение в кДНК	Замена АК	Частота аллеля*	Референсная последовательность	Глубина прочтения

2. Вероятно патогенные варианты нуклеотидной последовательности, являющиеся возможной причиной заболевания.

Ген	Положение (GRCh37/hg19)	Генотип	Экзон	Положение в кДНК	Замена АК	Частота аллеля*	Референсная последовательность	Глубина прочтения

3. Варианты с неизвестным клиническим значением, имеющие возможное отношение к фенотипу. Для уточнения статуса патогенности таких мутаций и их отношения к заболеванию у пациента могут потребоваться дополнительные исследования.

Ген	Положение (GRCh37/hg19)	Генотип	Экзон	Положение в кДНК	Замена АК	Частота аллеля*	Референсная последовательность	Глубина прочтения
<i>KIF1B</i>	chr1:10356666	C/T	18	c.1666C>T	p.(Arg536Cys)	0.0000203	NM_013074.3	67

4. Ранее описанные патогенные мутации, ассоциированные с другими значимыми моногенными заболеваниями.

Ген	Положение (GRCh37/hg19)	Генотип	Экзон	Положение в кДНК	Замена АК	Частота аллеля*	Референсная последовательность	Глубина прочтения
<i>BRCA1</i>	chr17:41276045	CT/del	2	c.68_69 delAG	p.(Glu23Val fs*17)	0.0001987	NM_007294.3	110

*Частоты аллелей приведены по базе *gnomAD* (выборка до 138632 человек). н/д = нет данных (не описан).

Рисунок 1 – Стандартное оформление заключения по результатам биоинформационного анализа данных секвенирования

Этап 4. Интерпретация результатов.

При выявлении у пациентов с лейкоплакией СОР высокопатогенных вариантов в генах *APC* (*p.Glu853Ter*, *p.Gln1378Ter*), *TP53* (*p.Arg248Gln*), *MSH2* (*p.Arg406Ter*), *PTEN* (*p.Gly293Ter*), *MSH3* (*p.Lys383ArgfsTer32*), *MSH6* (*p.Phe1088LeufsTer5*), *KRAS* (*p.Gly13Asp*, *p.Gly12Asp*), *ERCC3* (*p.Arg425Ter*), *SMARCA4* (*p.Thr859Met*)⁶, вероятность злокачественной трансформации оценивается как высокая. Выявление перечисленных патогенных генетических вариантов, поодиночке или в произвольном сочетании, с высокой вероятностью указывает либо на происходящую, либо на уже произошедшую злокачественную трансформацию лейкоплакией СОР.

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

Осложнения: нет.

Ошибки при выполнении и способы их устранения приведены в инструкциях по применению, прилагаемых к наборам для экстракции ДНК из биологических образцов и для выполнения высокопроизводительного экзомного секвенирования.