

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

 Богдан Е.Л.

« *22* » *07* 2021 г.

Регистрационный № 071-0621

МЕТОД
ОЦЕНКИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И РЕЗИСТЕНТНОСТИ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К ЛЕКАРСТВЕННОМУ ПРЕПАРАТУ
ТРАСТУЗУМАБУ НА ОСНОВЕ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ
МИКРОРНК В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ
(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ:

к.м.н., доцент Шляхтунов Е.А., д.м.н., профессор Семенов В.М.,
к.б.н., доцент Побяржин В.В., к.б.н., доцент Пашинская Е.С.,
Горбачев В.В.

Минск, 2021

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод оценки чувствительности и резистентности к лекарственному препарату трастузумабу, применяемому при лечении пациентов, страдающих эпителиальными злокачественными новообразованиями молочной железы (рак молочной железы) с гиперэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста HER2-neu, путем определения экспрессии микроРНК в циркулирующих опухолевых клетках (далее ЦОК), выделенных из периферической крови пациентов, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на повышение эффективности лечения злокачественных эпителиальных новообразований молочной железы.

Инструкция предназначена для врачей-онкологов, онкологов-хирургов, врачей-химиотерапевтов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения и научных организаций, оказывающих медицинскую помощь на амбулаторном и/или стационарном уровне пациентам, страдающим злокачественными эпителиальными новообразованиями молочной железы.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ:

1. Пробирки стерильные вакуумные с К2ЭДТА объемом 5 мл для забора периферической венозной крови.
2. Термоциклер для Real-Time PCR.
3. Программное обеспечение термоциклера для анализа и протоколирования данных.
4. Пластиковые расходные материалы для термоциклера (RNA-se/DNA-se Free).

5. Микроцентрифуга скоростная (15000 об. мин.), пригодная для пробирок объемом 0,2 мл, 1,5 мл и 2,0 мл, а также для 96-луночных микропланшетов.

6. Твердотельный термостат, пригодный для пробирок объемом 0,2 мл, 1,5 мл и 2,0 мл, а также для 96-луночных микропланшетов.

7. Вортекс, центрифуга-вортекс.

8. Пробирки типа эппендорф 1,5 мл.

9. Дозаторы механические или электронные переменного объема.

10. Одноразовые наконечники (обязательно наконечники с фильтром для предотвращения кросс-контаминации).

11. Наборы для выделения общей фракции РНК (сорбционный принцип).

12. Набор реагентов для проведения реакции обратной транскрипции.

13. Набор реагентов для проведения ПЦР в режиме реального времени.

14. Средства индивидуальной защиты (лабораторный халат, перчатки, очки)

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рак молочной железы (С 50).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

1. Взятие и хранение биологического материала.

Взятие периферической венозной крови осуществляют утром натощак из локтевой вены в стерильную вакуумную пробирку объемом 5 мл с К2ЭДТА. Полученный образец периферической венозной крови транспортируются в контейнере для транспортировки биологических образцов в лабораторию и выполняют последующие этапы исследования. Допускается при необходимости хранение образца в холодильнике не более 4 часов при температуре +4 °С.

2. Обогащение, выделение и изоляция ЦОК.

Обогащение, выделение и изоляцию ЦОК из периферической крови производят с применением метода экспресс-выделения опухолевых клеток из цельной крови на основе ковалентно-связанных антител для CD326 (ЕрСАМ) на немагнитную полимерную матрицу крупных микросфер с последующей изоляцией ЦОК по размеру (согласно инструкции производителя набора для выделения), либо с применением метода иммуномагнитного обогащения опухолевых клеток через эпителиальные и связанные с опухолью антигены (антител против MUC-1 и GA733-2 / ЕрСАМ) и экстракцией ЦОК магнитным концентратом частиц (согласно инструкции производителя набора для выделения).

3. Определение экспрессии микроРНК в ЦОК.

3.1. Из ЦОК выделяют микроРНК (согласно инструкции производителя набора для выделения).

3.2. Проводят реакцию обратной транскрипции для получения кДНК микроРНК (согласно инструкции производителя набора для синтеза кДНК).

3.3. Полученную кДНК используют для проведения TaqMan ПЦР в режиме реального времени с использованием необходимых пар праймеров и зондов для микроРНК miR-155, miR-21, let-7a, miR-210, miR-31, miR-17,

miR-221, let-7c, miR-542-3p и для контрольного референсного гена *RNU1* (согласно инструкции производителя набора для определения эспрессии).

4. Интерпретация результатов.

Критерии оценки уровня экспрессии микроРНК в ЦОК при РМЖ представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Критерии оценки уровня экспрессии микроРНК в ЦОК при РМЖ

микроРНК	Уровень экспрессии, отн. ед.		
	низкий	умеренный	высокий
miR-155	<0,23	0,23–4,45	≥4,46
miR-21	<0,25	0,25–4,16	≥4,17
let-7a	<0,10	0,10–4,93	≥4,94
miR-210	<0,10	0,10–4,24	≥4,25
miR-31	<0,10	0,10–5,65	≥5,66
miR-17	<0,20	0,20–4,90	≥4,91
miR-221	<0,10	0,10–4,95	≥4,96
let-7c	<0,10	0,10–3,94	≥3,95
miR-542-3p	<0,16	0,16–6,14	≥6,15

4.1. В случае, если определяется высокий уровень экспрессии онкогенных микроРНК miR-21 и/или miR-210, средний или высокий уровень экспрессии miR-221 и miR-155 в сочетании с низким уровнем miR-542-3p, а также низким или умеренным уровнем miR-31, miR-17, let-7a, let-7c в образце, то делают заключение о резистентности ЦОК к лекарственному препарату трастузумабу.

4.2. В случае, если определяется низкий уровень экспрессии онкогенных микроРНК miR-21 и/или miR-210, miR-221, miR-155, в сочетании с высоким уровнем miR-542-3p в образце, то делают заключение о чувствительности ЦОК к лекарственному препарату трастузумабу.

4.3. В случае, если определяется высокий уровень экспрессии онкосупрессорных микроРНК miR-31, miR-17, let-7a, let-7c в сочетании с умеренным или высоким уровнем miR-542-3p в образце, а также умеренным или низким уровнем микроРНК miR-21, miR-210, miR-221 и miR-155 в образце, то делают заключение о чувствительности ЦОК к лекарственному препарату трастузумабу

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Неправильный забор, транспортировка и хранение биологического материала.

Устранение: биологический материал (периферическая венозная кровь) после забора незамедлительно доставляется в лабораторию, где допускается при необходимости его хранение при температуре +4°C в течении 4 часов до использования.

2. Применение 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.

3. Неточное дозирование реагентов.

Устранение: ежегодная поверка автоматических дозаторов.

4. Нарушение технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т. д.).

Устранение: точно следовать инструкции к используемому набору реагентов.

5. Возможные ошибки могут быть связаны с нарушением протокола выделения РНК, синтеза кДНК, и проведения TaqMan ПЦР в режиме реального времени.

Устранение: точно следовать инструкции по применению производителей наборов для выделения РНК, синтеза кДНК, и проведения TaqMan ПЦР в режиме реального времени.