

МИНСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

 Д.Л. Пиневиц

2017 г.

Регистрационный № 099 – 1117

**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ РАКОМ
ТОЛСТОЙ КИШКИ, ПУТЕМ ОПТИМИЗАЦИИ АДЬЮВАНТНОЙ
ХИМИОТЕРАПИИ**

Инструкция по применению

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

Авторы: д.м.н. Кохнюк В.Т., д.м.н. Портянко А.С., к.м.н. Субоч Е.И., к.м.н. Ануфреенок И.В., Рукша К.Г., Смирнов С.Ю., Батура К.Н., Михнюк Д.В.

Минск, 2017

**МИНСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
01.12.2017

Регистрационный № 099-1117

**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ РАКОМ ТОЛСТОЙ
КИШКИ, ПУТЕМ ОПТИМИЗАЦИИ АДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук В. Т. Кохнюк, д-р мед. наук А. С. Портянко, канд. мед.
наук Е. И. Субоч, канд. мед. наук И. В. Ануфреенок, К. Г. Рукша, С. Ю. Смирнов,
К. Н. Батура, Д. В. Михнюк

Минск 2017

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод лечения пациентов, страдающих раком толстой кишки, основанный на оптимизации адъювантной химиотерапии путем выявления молекулярных маркеров чувствительности опухоли к действию фторпиримидинов. Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов, страдающих раком толстой кишки.

Данная инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов, врачей-онкологов-хирургов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим раком толстой кишки, в стационарных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Стандартное операционное оборудование для выполнения хирургического вмешательства при раке толстой кишки.

2. Стандартное лабораторное оборудование для молекулярно-генетических исследований с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

3. Стандартное оборудование для разведения лекарственных средств и химиотерапии.

Количество инструментария и материалов определяется нагрузкой на персонал. Обустройство рабочего места осуществляется в соответствии с санитарными нормами и требованиями.

4. Лекарственные средства: 5-фторурацил, оксалиплатин, кальция фолинат, водно-солевые кристаллоидные растворы для внутривенных капельных инфузий.

5. Набор реагентов для выделения общей фракции РНК из биологических образцов.

6. Набор реагентов для постановки реакции обратной транскрипции.

7. Набор реагентов для амплификации кДНК с использованием ПЦР в режиме реального времени.

8. Олигонуклеотиды синтетические (праймеры).

9. Спирт этиловый 96 %.

10. Микропробирки объемом 1,5 мл.

11. Микропробирки объемом 0,2 мл или микропробирки в стрипах объемом 0,2 мл, имеющие маркировку для ПЦР, и оптические крышки к ним.

12. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рак толстой кишки pT1-4N1-2M0 — III стадии (код МКБ-10: C18, C19).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Соответствуют таковым для назначения лекарственных средств, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод лечения пациентов, страдающих раком толстой кишки, состоит из радикальной операции в соответствии с локализацией опухоли, а также курсов адъювантной химиотерапии через 28–30 дней после радикальной операции в зависимости от индивидуального прогноза, основанного на исследовании молекулярных маркеров.

1. Перечень обязательных исследований до лечения, объем хирургического вмешательства, ведение послеоперационного периода в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 11.03.2012 № 258 «Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований».

2. Требования, предъявляемые к забору материала для молекулярно-генетических исследований

Для исследования используется опухолевая ткань толстой кишки, полученная во время хирургического вмешательства. Биологический материал помещается в индивидуальный полипропиленовый пакет либо фольгу и транспортируется в лабораторию в закрытом контейнере на хладоэлементе (-20 °С).

При необходимости допускается хранение образца при температуре (-70 °С) в течение 1 года без дополнительных циклов замораживания/оттаивания.

3. Пробоподготовка (выделение общей фракции РНК из образцов опухолевой ткани и постановка реакции обратной транскрипции)

Для выполнения процедуры применяются набор реагентов для выделения общей фракции РНК согласно инструкции производителя, спирт этиловый 96 %. Чистота препарата и концентрация полученной РНК оцениваются спектрофотометрически, исходя из соотношения поглощения при длинах волн 260/280 нм.

При необходимости допускается хранение РНК при температуре (-20 °С) в течение 1 мес. и однократное размораживание.

Для синтеза кДНК, который производится непосредственно после получения общей фракции РНК, применяется набор реагентов для постановки реакции обратной транскрипции согласно инструкции производителя. Для одной реакции обратной транскрипции используется 500-1000 нг выделенной РНК.

При необходимости допускается хранение кДНК при температуре (-20 °С) в течение 1 мес. и однократное размораживание.

4. Постановка ПЦР в режиме реального времени

Для амплификации в режиме реального времени фрагментов кДНК готовится реакционная смесь для постановки ПЦР в дублях в составе, представленном в таблице 1 (из расчета на одну реакцию).

Таблица 1. — Компоненты реакционной смеси для ПЦР

Компонент	Объем/реакция, мкл
Хлорид магния (50 мМ)	1
Дезоксинуклеотидтрифосфаты (10 мМ)	0,25
Смесь олигонуклеотидов	0,3
Буферный раствор (10x)/(5x)	2,5/5
Полимераза (5 ед./мкл)	0,25
кДНК	3
Вода для ПЦР	17,7/15,2

При анализе более 8 образцов в рамках одной постановки рекомендуется готовить реакционную смесь с учетом дополнительного образца для компенсации потерь реагентов при пипетировании (на каждые 8 образцов рекомендуется один дополнительный). Остаток реагентов используется для постановки отрицательного контроля ПЦР с использованием воды для ПЦР вместо матрицы кДНК.

Последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров и зондов для амплификации в режиме реального времени фрагментов кДНК представлены в таблице 2. В качестве референсного гена используется SCARNA.

Таблица 2. — Последовательности праймеров и зондов

Ген	Нуклеотидная последовательность праймера
TYMS_F	5'-GGCCTCGGTGTGCCTTT-3'
TYMS_R	5'-GATGTGCGCAATTCATGTACGT-3'
TYMS_P	FAM-AACATCGCCAGCTACGCCCTGC-BHQ1
TYMP_F	5'-CCTGCGGACGGAATCCT-3'
TYMP_R	5'-TCCACGAGTTTCTTACTGAGAATGG-3'
TYMP_P	FAM-CAGCCAGAGATGTGACAGCCACCG-BHQ1
SCARNA_F	5'-CCTCCCGTCACATTTAAGTCA-3'
SCARNA_R	5'-GCCGATCACTCTCAGAAACAC-3'
SCARNA_P	FAM-TCATGGAGCAGCTGATAATTTG-BHQ1

Исходные концентрации всех олигонуклеотидных праймеров и зондов должны быть доведены до концентрации 100 пмоль/мкл.

ПЦР в режиме реального времени осуществляется со считыванием флуоресценции по каналу FAM. Для реакции используется следующий протокол:

- 1) 95 °C – 5 мин – 1 цикл
 - 2) 95 °C – 10 с
 - 3) 60 °C – 1 мин
- } – 45 циклов

5. Анализ результатов

Оценка относительного уровня экспрессии генов осуществляется с помощью метода $2^{-\Delta\Delta C_p}$. После проведения реакции получают значения C_p (crossing point) с использованием программного обеспечения прибора в автоматическом или ручном режиме посредством вычисления максимума второй производной уравнения, описывающего каждую кривую флуоресценции. Для каждого образца и маркера (TYMS, TYMP и SCARNA5) процедура осуществляется индивидуально.

5.1. Рассчитывают значения ΔC_p генов-мишеней для образцов опухолевой ткани согласно формуле 1:

$$\Delta C_p^{\text{МИШЕНЬ}}_{\text{ОПУХОЛЬ}} = C_p^{\text{МИШЕНЬ}}_{\text{ОПУХОЛЬ}} - C_p^{\text{SCARNA5}}_{\text{ОПУХОЛЬ}}, \quad (1)$$

где $\Delta C_p^{\text{МИШЕНЬ}}_{\text{ОПУХОЛЬ}}$ — экспрессия генов-мишеней в опухолевой ткани, нормализованная по референсному гену;

$C_p^{\text{МИШЕНЬ}}_{\text{ОПУХОЛЬ}}$ — значение верхнего максимума второй производной функции, описывающей кривую флуоресценции образца опухолевой ткани, анализируемого на предмет экспрессии гена-мишени;

$C_p^{\text{SCARNA5}}_{\text{ОПУХОЛЬ}}$ — значение верхнего максимума второй производной функции, описывающей кривую флуоресценции образца опухолевой ткани, анализируемого на предмет экспрессии гена SCARNA5.

5.2. Вычисляют значение $\Delta\Delta C_p$ для гена TYMS согласно формуле 2:

$$\Delta\Delta C_p^{\text{TYMS}} = \Delta C_p^{\text{TYMS}}_{\text{ОПУХОЛЬ}} - 1,2, \quad (2)$$

где ΔC_p^{TYMS} — экспрессия гена TYMS, нормализованная по нормальной ткани.

Вычисляют значение $\Delta\Delta C_p$ гена TYMP согласно формуле 3:

$$\Delta\Delta C_p = \Delta C_p^{\text{TYMP}}_{\text{ОПУХОЛЬ}} - 8,4. \quad (3)$$

где ΔC_p^{TYMP} — экспрессия гена TYMP, нормализованная по нормальной ткани.

5.3. Вычисляют значения $2^{-\Delta\Delta C_p}$:

Уровень экспрессии гена TYMS считают повышенным при значении $2^{-\Delta\Delta C_p} > 1,81$ усл. ед.

Уровень экспрессии гена TYMP считают повышенным при значении $2^{-\Delta\Delta C_p} > 6,78$ усл. ед.

Уровень экспрессии гена TYMS считают пониженным при значении $2^{-\Delta\Delta C_p} < 0,6$ усл. ед.

Уровень экспрессии гена TYMP считают пониженным при значении $2^{-\Delta\Delta C_p} < 0,15$ усл. ед.

6. Выбор схемы лечения пациентов в зависимости от индивидуального прогноза заболевания:

6.1. В случае определения неблагоприятного прогноза на 28–30-й день после радикального хирургического лечения пациенту проводится 6 курсов адъювантной химиотерапии по схеме FOLFOX-4 (согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 11.03.2012 № 258 «Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований»).

6.2. В случае определения у пациента благоприятного прогноза на 28–30 день после радикального хирургического лечения проводится 6 курсов адьювантной химиотерапии по следующей схеме: внутривенная капельная инфузия кальция фолината в дозе 200 мг/м² и 5-фторурацила в дозе 400 мг/м² непосредственно после введения кальция фолината. Продолжительность каждого курса профилактического лечения 5 дней с перерывами между курсами 4 недели (начало очередного курса не позднее 28-го дня от начала предыдущего курса лечения).

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Интра- и послеоперационные осложнения.

Устранение: использовать общехирургические стандартные подходы.

2. Нарушения в технологии лабораторного тестирования (использование реагентов с истекшим сроком годности, несоблюдение времени инкубации, температурного режима и т. д.).

Устранение: не использовать реагенты с истекшим сроком годности, точно следовать инструкции к используемому набору реагентов.

3. Осложнения и побочные реакции при проведении химиотерапии.

Устранение: назначить посиндромную терапию, решить вопрос о редукции дозы или отмене химиотерапевтического лечения.