

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2013 г.

Регистрационный № 106-0913

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ПАПИЛЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ  
ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПУТЕМ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ  
ГЕНОВ В МАТЕРИАЛЕ ТОНКОИГОЛЬНОЙ АСПИРАЦИОННОЙ  
БИОПСИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»

АВТОРЫ: член-корреспондент НАН Беларуси, д. м. н., профессор Демидчик Ю.Е., к. б. н. Маньковская С.В., к. м. н. Лущик М.Л., Тузова А.А.

Минск, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц

05.12.2013

Регистрационный № 106-0913

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ПАПИЛЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ  
ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПУТЕМ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ  
ГЕНОВ В МАТЕРИАЛЕ ТОНКОИГОЛЬНОЙ АСПИРАЦИОННОЙ  
БИОПСИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования». ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси Ю.Е. Демидчик, канд. биол. наук С.В. Маньковская, канд. мед. наук М.Л. Лушиц, А.А. Тузова

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) регламентирует технологический процесс анализа экспрессии маркерных генов SFTPВ (повышенная экспрессия) и TFF3 (пониженная экспрессия) в пунктатах узловых образований щитовидной железы (далее — ЩЖ) для диагностики папиллярной карциномы (далее — ПК) на предоперационном этапе.

Инструкция рекомендуется для использования врачами-эндокринологами, врачами-онкологами и иными врачами-специалистами организаций здравоохранения, оказывающим медицинскую помощь пациентам с патологией ЩЖ.

Метод диагностики, изложенный в инструкции, позволяет улучшить выявление папиллярного рака ЩЖ (далее — ПР ЩЖ), уменьшить количество неоправданных хирургических вмешательств, снизить количество повторных тонкоигольных аспирационных биопсий (далее — ТАБ).

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

Данные амбулаторной карты — цитологический диагноз.

Оптимальный набор оборудования: высокоскоростная центрифуга с охлаждением и ротором для пробирок 1,5 мл; холодильник от +2 до 8°C с морозильной камерой до -20°C; микроцентрифуга-вортекс; твердотельный термостат; комплект механических дозаторов (1–1000 мкл) с одноразовыми наконечниками; ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха; амплификатор; камера для горизонтального гель-электрофореза с источником постоянного тока к нему; трансиллюминатор с ультрафиолетовой подсветкой для визуализации геля и возможностью записи на магнитный носитель.

Набор расходных материалов: стабилизирующий нуклеиновые кислоты (далее — НК) раствор (3М сульфат аммония на любом буфере с pH = 5 и 1 мМ ЕДТА); смесь гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформ (ГТС-фенол); хлороформ; гликоген; изопропанол; этанол; DEPC обработанная вода; обратная транскриптаза; смесь нуклеотидтрифосфатов; рандомные гексамеры; ингибитор рибонуклеаз; MgCl<sub>2</sub>; буфер для ПЦР; Taq-полимераза; бидистиллированная вода; бромистый этидий; агароза; 1x ТАЕ-буфер; загрузочный буфер для гель-электрофореза; резиновые перчатки; халаты; наконечники для дозаторов с фильтром; ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл; микроцентрифужные пробирки 0,5 и 1,5 мл; штативы для пробирок; стеклянная химическая посуда.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

1. Узловое образование ЩЖ, подозрительное в отношении рака.
2. Описательное или неинформативное заключение при аспирационной биопсии ЩЖ.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

### **Этап 1. Порядок взятия клинического материала в пробирку**

Пациенту проводят ТАБ узлового образования ЩЖ под контролем ультразвукографии. После нанесения биопсийного материала на предметные стекла для дальнейшего цитологического исследования остатки адгезированных в аспирационной игле и шприце клеток смывают 0,5 мл стабилизирующим НК раствора в пробирку объемом 1,5 мл (типа «эппендорф»). Забор проб биологического материала для молекулярно-генетического тестирования проводится после получения письменного информированного согласия пациентов. Образец в течение 4-х сут хранится при температуре бытового холодильника (4°C). При получении непосредственного цитологического заключения (подозрения рака, описательный ответ) или неинформативного пунктата клинический материал должен быть направлен в молекулярно-генетическую лабораторию. В сопроводительном документе необходимо указать: фамилию, имя и отчество пациента, дату рождения, предполагаемый диагноз, дату и время взятия пробы, наименование учреждения (подразделения), направляющего клинический образец. В случае невозможности доставки пробы в лабораторию в течение 4-х сут допускается однократное замораживание и хранение биоматериала при температуре -20°C до 1 мес.

### **Этап 2. Выделение РНК**

1. Пробирку с клиническим материалом центрифугируют при 5000 g в течение 10 мин, удаляют супернатант, содержащий стабилизирующий НК раствор.

2. Добавляют в пробирку 0,5 мл смеси ГТС-фенол, ресуспензируют осадок пипетированием. Инкубируют образец в течение 5 мин при комнатной температуре.

3. Добавляют 0,1 мл хлороформа, встряхивают пробирку на вортексе в течение 10 с, инкубируют 2–3 мин при комнатной температуре. Центрифугируют пробирку при 12000 g в течение 15 мин при 4°C.

4. Отбирают водную фазу в заранее подготовленную пробирку, добавляют 1 мкл гликогена и 2–3 раза аккуратно переворачивают пробирку.

5. Добавляют 0,35 мл изопропанола для преципитации, встряхивают пробирку на вортексе в течение 3–5 с, инкубируют при комнатной температуре 10 мин. Центрифугируют пробирку при 12000 g в течение 10 мин при 4°C.

6. Не задевая осадок (РНК обычно образует гелеподобную «пуговку» на стенке или дне пробирки), полностью удаляют надосадочную жидкость.

7. К осадку добавляют 0,75 мл 75 %-го этанола в DEPC-воде и 3–5 раз аккуратно переворачивают пробирку. Центрифугируют пробирку при 7500 g в течение 5 мин при 4°C.

8. Не задевая осадок, полностью удаляют надосадочную жидкость. Открывают крышку пробирки и высушивают осадок в течение 10–15 мин.

9. Растворяют РНК в 25 мкл DEPC-воды. Прогревают пробирку при 60°C в течение 10 мин.

Препарат ОНК готов для реакции обратной транскрипции (далее — ОТ).

Образец РНК помещается на хранение при -70°C.

### Этап 3. Проведение реакции ОТ

Смесь реагентов для одной реакции в объеме 25 мкл состоит из 2,5 мкл буфера для ПЦР, 2,5 мкл 10 мМ смеси dNTP, 0,5 мкл рандомных гексомеров, 0,7 мкл ингибитора рибонуклеаз (10 ед./мкл), 1 мкл обратной транскриптазы, 5 мкл MgCl<sub>2</sub>, 7,8 мкл DEPC-воды и 5 мкл выделенной РНК. Для постановки реакции используют положительный и отрицательный контроли. Положительный контроль — 1 мкл РНК высокого качества (40 нг/мкл) вносится в отдельную пробирку, содержащую смесь реагентов. Отрицательный контроль — в отдельную пробирку вносится смесь для проведения реакции, но без РНК. Реакция ОТ проводится по следующей программе: 60 мин при 41°C, 2 мин при 90°C и охлаждение до 4°C.

### Этап 4. Полимеразная цепная реакция

Аmplификацию кДНК осуществляют с двумя парами праймеров: одна из них служит для размножения фрагмента гена KPNA4, использующегося в качестве внутреннего контроля, другая — исследуемого гена (TFF3 или SFTPВ). Последовательности праймеров и реагенты для амплификации представлены в таблицах 1 и 2 соответственно. Условия ПЦР: 94°C — 10 мин, затем 35 циклов по схеме: 94°C — 30 с, 61°C — 30 с, 72°C — 30 с, финальная элонгация при 72°C — 10 мин и охлаждение до 4°C.

Таблица 1. — Характеристика праймеров, использованных в работе

Праймер	Последовательность нуклеотидов в праймере, 5'-3'	Продукт ПЦР, п.о.
SFTPВ	F – AATTCCCCATTCCTCTCCCCTAT R - GATGCCGCCCCGCCAC	137
TFF3	F – TGGTGTTTCAAGCCCCTGCA R - CAAAGGGACAGAAAAGCTGAGATGA	147
KPNA4	F – AAGTTGTGCAAGTAGTACTCGATGG R - ATCAATGATTCATAGGCCAATTT	170

Таблица 2. — Набор реагентов для амплификации

Реагент, концентрация	Количество, мкл
ПЦР буфер, 10x	2,5
Смесь dNTP, 2 мМоль каждого	2,5
MgCl <sub>2</sub> , 25 мМ	1,5
F праймер KPNA4, 5 мкМ	1
R праймер KPNA4, 5 мкМ	1
F праймер TFF3 (или SFTPВ), 5 мкМ	0,3
R праймер TFF3 (или SFTPВ), 5 мкМ	0,3
Taq полимераза, 5 U/мкл	0,5
кДНК	2
H <sub>2</sub> O бидистиллированная	13,4
Общий объем смеси	25

### Этап 5. Детекция продуктов амплификации методом горизонтального гель-электрофореза

1. Взвесить 3,5 г агарозы, поместить в термостойкую стеклянную колбу объемом 200 мл.

2. Долить 100 мл 1x TAE-буфера и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы.

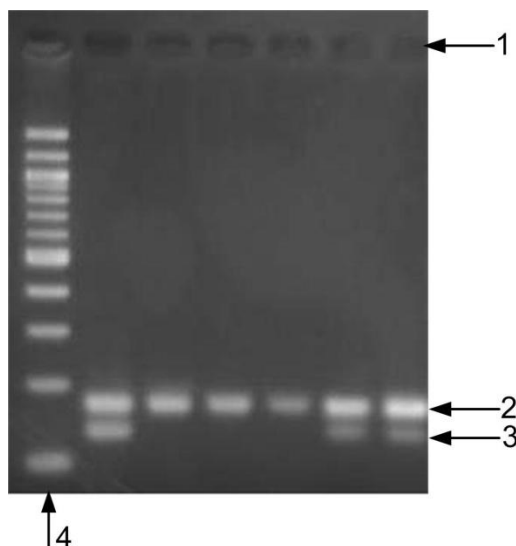
3. Остудить до 50–60°C°, добавить бромистый этидий до концентрации 0,1 %.

4. Залить форму и оставить гель на 30 мин для полимеризации.

5. В каждую лунку внести по 10 мкл образцов кДНК, предварительно добавив 1 мкл загрузочного буфера для гель-электрофореза.

6. Электрофорез проводить при 10–15 В/см в течение 30 мин.

Амплификаты визуализируются при помощи УФ-трансиллюминатора, фотографируются и фиксируются на магнитном носителе. На рисунке 1 представлен результат фракционирования амплифицированных фрагментов генов KPNA4 и SFTPВ.



1 — старт (лунки в геле); 2 — фрагмент гена KPNA4; 3 — фрагмент гена SFTPВ;  
4 — маркер молекулярного веса

**Рисунок 1. — Электрофореграмма продуктов амплификации**

### Этап 6. Интерпретация результатов гель-электрофореза

Для определения степени насыщенности продуктов ПЦР на электрофореграмме изображения геля обрабатываются с помощью программного обеспечения. Об уровне экспрессии изучаемого гена в образе судят по отношению интенсивности свечения полосы гена к интенсивности свечения полосы, соответствующей гену KPNA4. Случаи, в которых уровень экспрессии гена SFTPВ повышал уровень экспрессии TFF3, интерпретируются как ПРЦЖ-подобные (положительный молекулярный тест) и, наоборот, случаи, в которых уровень экспрессии гена TFF3 повышал уровень экспрессии SFTPВ,

диагностируются как доброкачественный процесс (отрицательный молекулярный тест).

Результаты данного метода диагностики должны оцениваться в комплексе с результатами других диагностических исследований с последующим выставлением диагноза согласно МКБ-10.

При положительном молекулярном тесте рекомендуется направление к врачам-онкологам и более частое (не реже 1 раза в 3 мес.) тщательное обследование этого пациента. При отрицательном молекулярном тесте врач-эндокринолог осуществляет динамическое наблюдение за пациентом в стандартном режиме. На рисунке 2 представлена схема ведения пациента.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

При внимательном следовании инструкции ошибки исключены.

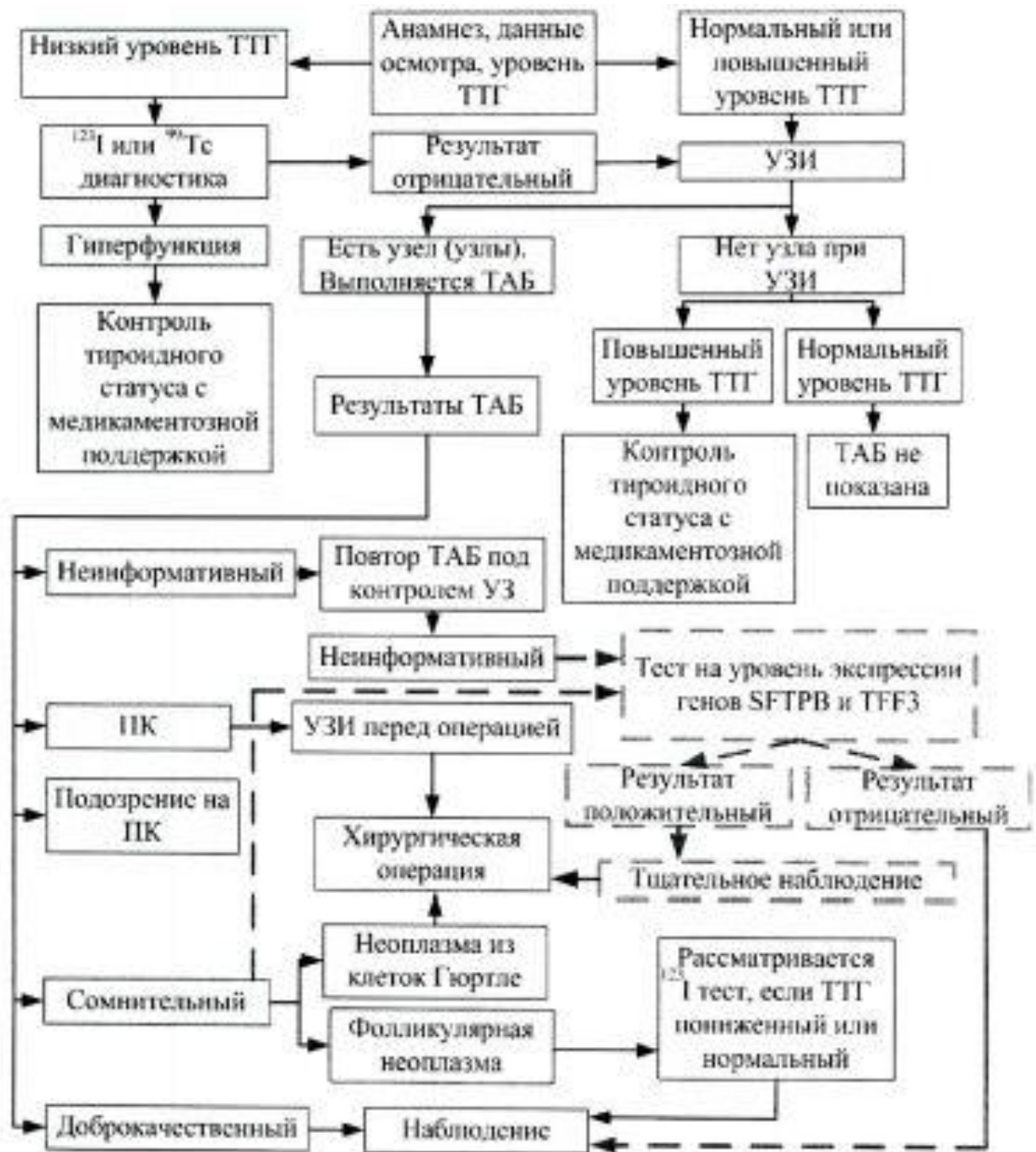


Рисунок 2. — Схема ведения пациентов с узлами в ЩЖ