

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2017 г.



Регистрационный № 128-1217

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ
ПАЦИЕНТОВ МОЛОЖЕ 31 ГОДА, СТРАДАЮЩИХ САРКОМАМИ
КОСТЕЙ**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии»

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

Авторы: к.м.н. Л.П. Киселёв, к.б.н. Т.В. Савицкая, к.м.н., доц. А.Г. Жуковец,
д.м.н., профессор, член-корреспондент НАН Беларуси О.В. Алейникова

Минск, 2017

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
22.12.2017
Регистрационный № 128-1217

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ
ПАЦИЕНТОВ МОЛОЖЕ 31 ГОДА, СТРАДАЮЩИХ САРКОМАМИ
КОСТЕЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

АВТОРЫ: канд. мед. наук Л.П. Киселёв, канд. биол. наук Т.В. Савицкая, канд. мед. наук, доц. А.Г. Жуковец, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Беларуси О.В. Алейникова

Минск 2017

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод прогнозирования эффективности лечения пациентов моложе 31 года, страдающих саркомами костей с использованием технологии полимеразной цепной реакции (далее — ПЦР) в режиме реального времени, который может быть использован в комплексе медицинских услуг по лечению указанной патологии.

Метод предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов, врачей-патологоанатомов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающих саркомами костной ткани.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Дюар с жидким азотом.
2. Шаровой гомогенизатор.
3. Вортекс.
4. Спектрофотометр
5. Микроцентрифуга, обеспечивающая скорость вращения ротора до 14000 об./мин.
6. Амплификатор (термоциклер) для проведения ПЦР в режиме реального времени.
7. Автоматические дозаторы переменного объема.
8. Холодильник (2–8°C).
9. Низкотемпературный морозильник (-70°C).

Перечень необходимых реактивов и расходных материалов:

1. Набор реагентов для выделения общей фракции РНК (сорбционный принцип).
2. Обратная транскриптаза MMLV.
3. Буфер для обратной транскриптазы.
4. Рэндом гексамеры.
5. 10 мМ смесь дезнуклеотидтрифосфатов.
6. Ингибитор рибонуклеаз.
7. Вода для ПЦР.
8. Набор для количественной ПЦР в реальном времени.
9. Олигонуклеотиды синтетические (праймеры) и пробы.
10. кДНК клеточной линии Нер-2.
11. Микропробирки объемом 1,5 и 0,5 мл.
12. Оптически прозрачные планшеты и крышки для количественной ПЦР.
13. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл.
14. Хладоэлемент или охладитель проб.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Локализованные формы сарком костной ткани (остеосаркома и саркома Юинга) у лиц в возрасте от 0 до 30 лет включительно.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Подготовка образцов из опухолевой ткани

Для выделения РНК образцы опухолевой ткани, полученные при диагностической операции, замораживают при -70°C . Для гомогенизации образцы переносят в охлажденные при той же температуре металлические контейнеры шаровой мельницы вместе с размольными шарами, затем дополнительно охлаждают стаканы в жидком азоте. При этом объем пробы должен занимать не более 10–15 % размольных стаканов и содержать 2 металлических шара, соответствующих размеру стакана. Гомогенизацию проводят не более 2,5 мин, не допуская размораживания стаканов и оттаивания образцов.

Гомогенизированный образец используют для выделения РНК с помощью коммерческого набора. Качество и количество РНК оценивают спектрофотометрически и электрофоретически. Спектрофотометрическое определение проводят на спектрофотометре. При этом оценивают примесь белков по соотношению поглощения ультрафиолетового света с длиной волны 260 нм (для нуклеиновых кислот) и 280 нм (для белков) (260/280) и примесь углеводов по соотношению 260/230 нм. Образец суммарной РНК считают чистым при значении показателей более 1,8. Качество РНК оценивают также визуально после электрофореза 5 мкл РНК в 1,5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидиумом: в случае качественной РНК флюоресценция в начале (примесь ДНК) и конце (деградированная РНК) дорожки отсутствует, а интенсивность полосы 28S рибосомальной РНК (рРНК) примерно в два раза выше, чем полосы 16S рРНК. Далее проводят реакцию обратной транскрипции, т. е. синтез комплементарных цепочек ДНК (кДНК), используя в качестве матрицы выделенную РНК. Для этого 1,5 мкг РНК в концентрации 0,15 мкг/1 мкл воды денатурируют в течение 10 мин при 70°C . Затем охлажденную на льду аликвоту РНК вносят в смесь для обратной транскрипции (4 мкл 5x буфера для обратной транскриптазы, 2 мкл 10 мМ смеси дезнуклеотидтрифосфатов, 1 мкл 500 мМ случайных праймеров (рэндом гекса-меров), 0,5 мкл ингибитора рибонуклеаз в концентрации 40 Ед/мкл, 1 мкл 200 Ед/мкл обратной транскриптазы MMLV. Доводят водой до конечного объема 20 мкл и синтезируют кДНК, используя программу: 20° — 10 мин, 42° — 45 мин, 99° — 3 мин. Разводят кДНК водой до конечного объема 50 мкл.

Метод относительной количественной ПЦР в реальном времени

Для амплификации референс-гена GAPDH используют праймеры и зонды в виде коммерческих наборов. Для амплификации сплайс-вариантов MGST1 и IGFR2 используют последовательности проб и праймеров указанные ниже. Последовательность прямого и обратного праймеров для MGST1 составляет: 5'-AGAGTAGAACGTGTACGCAGAGC-3', 5'-TCTGAAGTGCAGGATGGCTGTAG-3', пробы: Fam- TCCTTGAGTGGTCCCGACCCC-BHQ1. Последовательность прямого и обратного праймеров для IGFR2 составляет:

5'-GAGGAGGCTGAATACCGCAA-3', 5'-TGGCCACTTGCATGACATCT-3'
пробы: Fam- GCCCAGACCTGAAAGGAAGCGGG-BHQ1.

Для реакции ПЦР используют набор для проведения количественной ПЦР с использованием TaqMan технологии в состав которого входит фермент урацил-N-гликозилаза, позволяющий предотвратить повторную реамплификацию продуктов при перекрестной контаминации продуктов ПЦР. Для гена GAPDH конечная концентрация праймеров и зондов в реакционной смеси составляет 900 нм и 300 нм соответственно. Для MGST1 и IGFR2 — 300 и 200 нм. В реакционную смесь добавляют 4 мкл кДНК, конечный объем смеси 20 мкл. Все образцы исследуют в дубликатах.

Собственно ПЦР проводят как однокомпонентную реакцию (в каждой пробирке праймеры и зонд к одной мишени), используя следующие условия: 20° — 10 мин, 42° — 45 мин, 99° — 3 мин. Количество циклов — 50.

Амплификацию и уровень экспрессии гена определяют с использованием прибора и программного обеспечения системы с детекцией в режиме реального времени.

Используемый метод анализа результатов ПЦР не требует построения калибровочной кривой и оценивает изменение экспрессии гена относительно калибровочного стандарта, в качестве которого используют кДНК клеточной линии Hep-2. Так как референс-ген GAPDH экспрессируется на одном уровне в исследуемых образцах, то разные значения его экспрессии отражают разницу в количестве загруженной кДНК в реакцию. Относительный уровень экспрессии каждого гена рассчитывают по формуле:

$$N = 2^{-[\Delta\Delta Ct]} = 2^{(Ct_{ген} - Ct_{GAPDH})_{калибратор} - (Ct_{ген} - Ct_{GAPDH})_{исследуемый образец}}$$

где Ct (thres hold cycle) — точка пересечения графика накопления ДНК и пороговой линии реакции, выражается в циклах ПЦР.

Определение прогностически неблагоприятных локализованных форм сарком костей

Остеосаркома

Пациенты с локализованными формами остеосаркомы и уровнем экспрессии мРНК гена IGFR2 в ткани опухоли <0,38 относительной единицы классифицируются в группу низкого риска раннего возврата заболевания.

Пациенты с локализованными формами остеосаркомы и уровнем экспрессии мРНК гена IGFR2 в ткани опухоли $\geq 0,38$ относительной единицы классифицируются в группу высокого риска раннего возврата заболевания. Для них персонально выбираются варианты по использованию более агрессивных схем и увеличению длительности системной терапии.

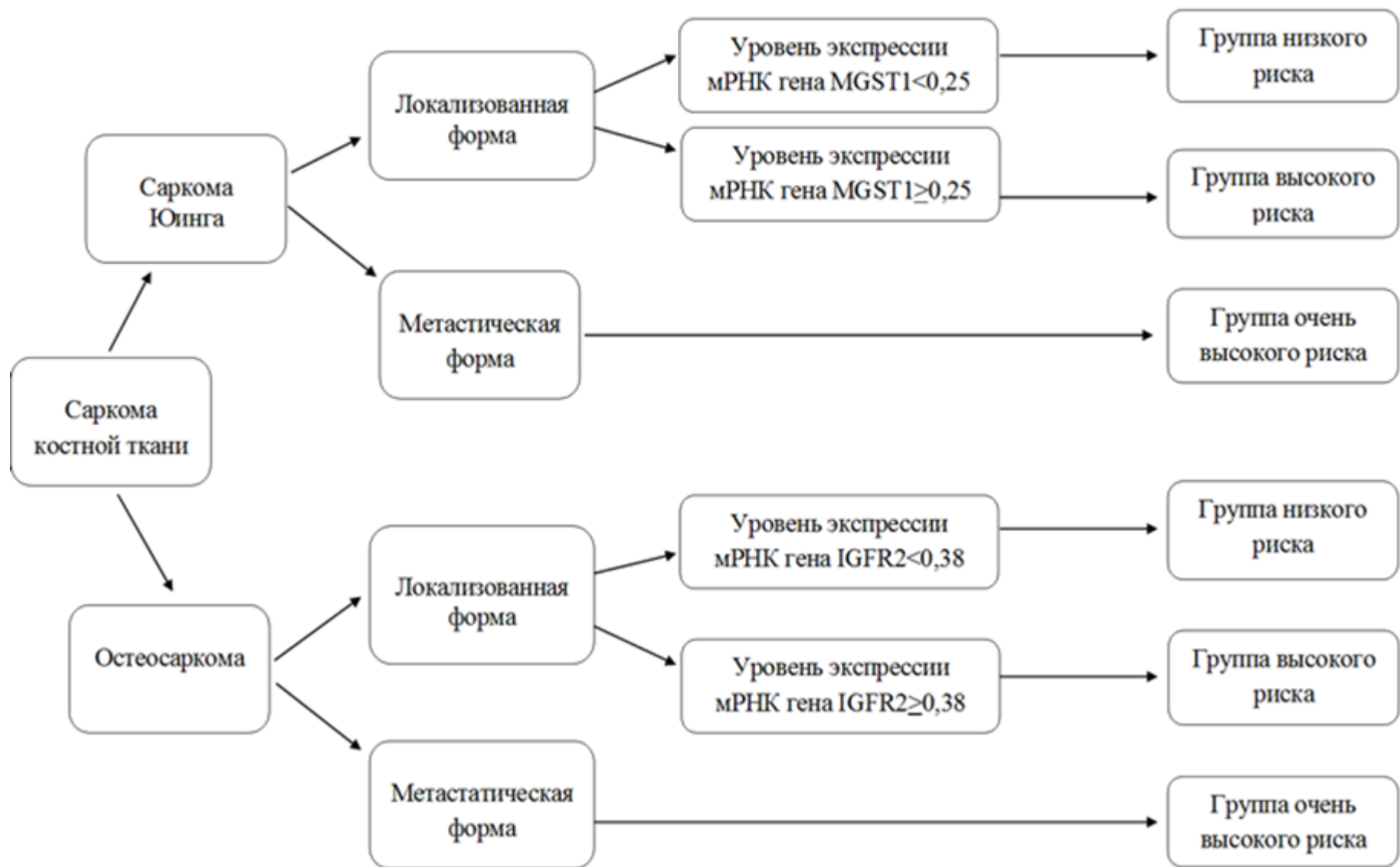
Саркома Юинга

Пациенты с локализованными формами саркомы Юинга и уровнем экспрессии мРНК гена MGST1 в ткани опухоли <0,25 относительной единицы классифицируются в группу низкого риска раннего возврата заболевания.

Пациенты с локализованными формами саркомы Юинга и уровнем экспрессии мРНК гена *MGST1* в ткани опухоли $\geq 0,25$ относительной единицы классифицируются в группу высокого риска раннего возврата заболевания. Для них персонально выбираются варианты по использованию более агрессивных схем и увеличению длительности системной терапии.

Метод прогнозирования эффективности лечения пациентов моложе 31 года, страдающих саркомами костей, представлен в виде схемы.

Метод прогнозирования эффективности лечения пациентов, моложе 31 года, страдающих саркомами костей



ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Использование реагентов, условия хранения которых не соблюдались. Путь устранения: соблюдать условия хранения.

2. Неточное дозирование реагентов. Путь устранения: ежегодно поверять автоматические дозаторы переменного объема.

3. Нарушения в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т. д.). Путь устранения: точно следовать инструкции к используемому набору реагентов.