

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
 Д.Л. Пиневич
_____ 2015 г.
Регистрационный № 165-1115

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ
КЛЕТОК ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К ХИМИОТЕРАПИИ ПО
СХЕМЕ АС (ДОКСОРУБИЦИН+ЦИКЛОФОСФАМИД)**

Инструкция по применению

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

Авторы: д.б.н., доцент Р.М. Смолякова, д.м.н. Е.В. Шаповал, Е.А.
Гутковская, Н.А. Козловская

Минск 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

27.11.2015

Регистрационный № 165-1115

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ
КЛЕТОК ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К ХИМИОТЕРАПИИ
ПО СХЕМЕ АС (ДОКСОРУБИЦИН+ЦИКЛОФОСФАМИД)**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р биол. наук, доц. Р.М. Смолякова, д-р мед. наук Е.В. Шаповал,
Е.А. Гутковская, Н.А. Козловская

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения чувствительности опухолевых клеток при раке молочной железы (РМЖ) к химиотерапии по схеме АС (доксорубицин+циклофосфамид) по уровню экспрессии микроРНК, который может быть использован в комплексе медицинских услуг по лечению пациентов, страдающих раком молочной железы, с целью индивидуализации схемы лечения для каждого конкретного пациента.

Метод предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов, врачей-патологоанатомов и иных врачей-специалистов учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим раком молочной железы.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Перечень необходимого оборудования:

1. Низкотемпературный морозильник (-70°C).
2. Термостат твердотельный с функцией охлаждения ($4-100^{\circ}\text{C}$).
3. Вихревой смеситель.
4. Автоматические дозаторы переменного объема.
5. Амплификатор (термоциклер) для проведения ПЦР в режиме реального времени.
6. Холодильник ($2-8^{\circ}\text{C}$).
7. Микроцентрифуга, обеспечивающая скорость вращения ротора до 14000 об./мин.
8. Термос.

Реактивы и расходные материалы:

1. Наборы для выделения общей фракции РНК (сорбционный принцип).
2. Набор реагентов для проведения реакции обратной транскрипции.
3. Набор реагентов для проведения ПЦР в режиме реального времени.
4. Микропробирки объемом 1,5 мл.
5. Микропробирки объемом 0,2 мл или микропробирки в стрипах, имеющие маркировку для ПЦР, и оптические крышки к ним.
6. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов.
7. Спирт этиловый 96%.
8. Спирт этиловый 70%.
9. Лед, хладоэлемент или охладитель проб.
10. Полипропиленовые микропестики.
11. Вакуумный аспиратор.
12. Маркер.
13. Хлороформ.
14. Жидкий азот.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рак молочной железы.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Забор материала

Опухолевую ткань получают при трипанобиопсии. Биологический материал незамедлительно помещают в термос с жидким азотом и доставляют в лабораторию, где допускается при необходимости его хранение при температуре -70°C до использования. *Многokратное размораживание биологического материала запрещается!*

Для исследования используют замороженную опухолевую ткань (трепанобиоптаты) молочной железы.

2. Выделение общей фракции РНК из замороженной опухолевой ткани.

3. Постановка реакции обратной транскрипции.

4. Постановка ПЦР в режиме реального времени.

В качестве референсного гена следует использовать RNU1.

5. Анализ результатов

Для оценки чувствительности опухоли к лечению по схеме АС необходимо использовать значение dCt.

5.1. Получить значения максимума второй производной для каждого образца. Полученные численные значения обозначить Ct.

5.2. Вычислить значения dCt для образцов опухолевой ткани согласно следующей формуле:

$$dCt_{\text{ОПУХОЛЬ}}^{\text{МИШЕНЬ}} = Ct_{\text{ОПУХОЛЬ}}^{\text{МИШЕНЬ}} - Ct_{\text{ОПУХОЛЬ}}^{\text{РЕФЕР.ГЕН}},$$

где $dCt_{\text{ОПУХОЛЬ}}^{\text{МИШЕНЬ}}$ — экспрессия гена-мишени в опухолевой ткани, нормализованная по референсному гену;

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

$Ct_{\text{ОПУХОЛЬ}}^{\text{РЕФЕР.ГЕН}}$ — значение верхнего максимума второй производной функции, описывающей кривую флуоресценции образца опухолевой ткани, анализируемого на предмет экспрессии референсного гена.

5.3. Оценить чувствительность опухоли к лечению по схеме АС на основе значений dCt (таблица).

Таблица — Критерии оценки чувствительности опухоли к лечению по схеме АС у пациенток, страдающих раком молочной железы

Прогнозируемая эффективность лечения	dCt miR-17, отн. ед.	dCt miR-34a, отн. ед.
Уменьшение объема опухоли <50%	<13	<8
Уменьшение объема опухоли \geq 50%	\geq 13	\geq 8

У пациентов, страдающих раком молочной железы, при применении НПХТ по схеме АС при значении $dCt\ miR-17 \geq 13$ отн. ед. или $dCt\ miR-34a \geq 8$ отн. ед. прогнозируется регрессия объема опухоли $\geq 50\%$; при значении $dCt\ miR-17 < 13$ отн. ед. или $dCt\ miR-34a < 8$ отн. ед. прогнозируется регрессия объема опухоли $< 50\%$.

Диагностическая чувствительность метода для микроРНК $miR-34a$ составляет — 83,3%, $miR-17$ — 66,7%; диагностическая специфичность — 75,0% соответственно.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Неправильный забор, транспортировка и хранение биологического материала.

Профилактика: биологический материал после забора незамедлительно помещать в термос с жидким азотом и доставлять в лабораторию, где допускается при необходимости его хранение при температуре -70°C до использования.

2. Использование реагентов с истекшим сроком годности или реагентов, условия хранения которых не соблюдались.

Профилактика: не использовать реагенты с истекшим сроком годности и соблюдать условия их хранения.

3. Неточное дозирование реагентов.

Профилактика: ежегодная поверка автоматических дозаторов.

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

Профилактика: точно следовать инструкции к используемому набору реагентов.