

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

«25» сентября 2019 г.

Регистрационный № 012-0319

**АЛГОРИТМ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ
РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ БЕЗ МЫШЕЧНОЙ ИНВАЗИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова»,
Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

АВТОРЫ: к.б.н. М.П. Смаль, д.м.н. А.И. Ролевич, к.м.н. Т.И. Набебина, член-корреспондент НАН Беларуси, д.м.н., профессор С.А. Красный, д.м.н. С.Л. Поляков, д.б.н., профессор Р.И. Гончарова

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц

25.04.2019

Регистрационный № 012-0319

**АЛГОРИТМ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ
РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ БЕЗ МЫШЕЧНОЙ ИНВАЗИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова», ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

АВТОРЫ: канд. биол. наук М. П. Смаль, д-р мед. наук А. И. Ролевич, канд. мед. наук Т. И. Набебина, чл.-корр., д-р мед. наук, проф. С. А. Красный, д-р мед. наук С. Л. Поляков, д-р биол. наук, проф. Р. И. Гончарова

Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод прогнозирования отдаленных результатов лечения, в частности, рецидивирования и прогрессирования заболевания у пациентов, страдающих раком мочевого пузыря без мышечной инвазии (РМПБМИ), основанный на определении генетических и эпигенетических маркеров. Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение РМПБМИ.

Метод предназначен для врачей-онкологов, врачей-урологов, врачей-патологоанатомов и врачей лабораторной диагностики организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с РМПБМИ в стационарных и (или) амбулаторных условиях.

Предложенный метод рекомендован для внедрения в онкологических диспансерах при наличии необходимого оборудования и материалов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Перечень необходимых медицинских изделий: световой микроскоп; пипеточные дозаторы; микроцентрифуга; твердотельный термостат; вортекс; спектрофотометр; ПЦР-бокс с УФ-лампой; амплификатор; микроволновая печь; лабораторные весы; рН-метр; магнитная мешалка; аппараты для горизонтального и вертикального электрофореза; источник питания; система гель-документирования; генетический анализатор.

Перечень необходимых расходных материалов: наконечники для автоматических пипеток; микроцентрифужные пробирки; лабораторная посуда.

Перечень необходимых реактивов: набор реагентов для выделения ДНК; набор реагентов для бисульфитной конверсии ДНК; Taq ДНК-полимераза; Tornado ДНК-полимераза с буферами; смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTPs); диметилсульфоксид (ДМСО); $MgCl_2$, специфические олигонуклеотидные праймеры, деионизированная вода; ДНК-маркер молекулярного веса, агароза, акриламид, бис-акриламид, персульфат аммония (ПСА), ТЕМЕД, сахароза, Трис-боратный электродный (ТВЕ) буфер, глицерин, бромфеноловый синий, ксиленцианол, бромистый этидий, загрузочный буфер; термочувствительная щелочная фосфатаза (FastAP), экзонуклеаза I; набор для секвенирования, 5x буфер для секвенирования, набор для SNaPshot-реакции, Hi-Di формамид, ацетат аммония, Трис- $MgCl_2$ буфер, размерный стандарт.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Гистологически верифицированный первичный или рецидивный уротелиальный РМПБМИ.

2. Выполнение макроскопически полной (радикальной) трансуретральной резекции (ТУР) мочевого пузыря.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Ограниченная прогнозируемая продолжительность жизни пациента (менее 1 года) вследствие тяжелых сопутствующих заболеваний.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Анализ гистологических микропрепаратов

Для определения степени распространенности опухоли выполняется микроскопическая оценка гистологических микропрепаратов уротелиального рака мочевого пузыря на обзорном увеличении (окуляр $\times 10$, объектив $\times 10$), затем на больших увеличениях (окуляр $\times 10$, объектив $\times 20-40$), при необходимости на иммерсионном увеличении (окуляр $\times 10$, объектив $\times 100$). Определение степени злокачественности уротелиального рака осуществляется в соответствии с критериями по системам ВОЗ (1973 и 2004).

Выделение ДНК из опухолевого материала

Геномную ДНК выделяют из свежего опухолевого материала, тканевых срезов парафиновых блоков или мочи пациентов с помощью коммерческих наборов реагентов согласно инструкции производителя либо стандартного метода фенол-хлороформной экстракции. Качество и количество выделенной ДНК оценивают спектрофотометрически. ДНК растворяют до рабочей концентрации 100 мкг/мл и выдерживают при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ для длительного хранения.

Определение мутаций в гене *PIK3CA*

*Аmplification фрагментов, содержащих 9-й и 20-й экзоны гена *PIK3CA**

Для анализа мутационной изменчивости гена *PIK3CA* первоначально производят ПЦР с использованием соответствующих олигонуклеотидных праймеров (таблица 1).

Таблица 1. — Последовательность ПЦР-праймеров

Экзон	Праймеры	Размер продукта, п.н.	Температура отжига, $^{\circ}\text{C}$
9	F: AGTAACAGACTAGCTAGAGA R: ATTTTAGCACTTACCTGTGAC	139	52
20	F: GACCCTAGCCTTAGATAAAAC R: GTGGAAGATCCAATCCATT	109	52

Реакционная смесь общим объемом 15 мкл содержит 1-250 нг геномной ДНК, 1х ПЦР-буфер, 2 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTPs, 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров, 3 % ДМСО и 0,5 единиц активности Taq-полимеразы. Амплификацию фрагментов гена *PIK3CA* выполняют при следующих условиях: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 4 мин; 35 циклов: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 30 с, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 30 с, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 50 с; конечная элонгация в течение 5 мин при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Качество амплификации оценивают посредством разделения ПЦР-продуктов в 3 %-м агарозном геле с бромистым этидием при напряжении 5 В/см.

Ферментативная обработка ПЦР-продуктов

ПЦР-продукты обрабатывают ферментативно для удаления не вошедших в реакцию праймеров и не включенных dNTPs. К ПЦР-продукту добавляют 3 ед. активности щелочной фосфатазы (FastAP) и 2 ед. активности экзонуклеазы (Exo I). Инкубируют при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин, реакцию останавливают прогреванием при $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин.

SNaPshot реакция

Минисеквенирующую SNaPshot-реакцию выполняют с использованием внутренних праймеров (таблица 2) и соответствующего коммерческого набора, содержащего четыре типа флуоресцентно меченных ddNTPs.

Таблица 2. — Последовательность праймеров для SNaPshot-реакции

Мутация	Ориентация	Последовательность праймеров 5' - 3'	WT	MT	Конечная концентрация, мкМ
E542K	F	T ₁₇ ACACGAGATCCTCTCTCT	G	A	0,1
E545K/Q	F	T ₂₅ ATCCTCTCTCTGAAATCACT	G	A/C	0,4
E545G	F	T ₂₁ CCTCTCTCTGAAATCACTG	A	G	0,6
H1047L/R	F	T ₃₀ GAAACAAATGAATGATGCAC	A	T/G	0,3
Примечания: 1) — WT — аллель дикого типа; 2) — MT — мутантный аллель.					

Реакционная смесь общим объемом 10 мкл содержит 2,5 мкл SNaPshot-реагента, 1х буфер для секвенирования, смесь праймеров с конечными концентрациями, указанными в таблице 2, и 1 мкл ферментативно обработанного ПЦР-продукта.

Программа SNaPshot-реакции включает 35 циклов: 96 °C в течение 10 с, 50 °C в течение 5 с и 60 °C в течение 30 с. SNaPshot-продукты обрабатывают FastAP для удаления не вошедших в реакцию ddNTPs. К реакционной смеси добавляют 1 ед. активности щелочной фосфатазы, инкубируют при 37 °C в течение 10 мин, инактивацию фермента осуществляют при 75 °C в течение 5 мин.

Анализ продуктов SnaPshot-реакции

Продукты SNaPshot-реакции анализируют с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе с использованием полимера POP-7 и капилляров длиной 50 см. Для этого 1 мкл SNaPshot-продукта смешивают с 8,6 мкл Hi-Di формамида и 0,4 мкл размерного стандарта. После разделения образцов полученные данные рассматривают с помощью пакета компьютерных программ GeneMapper v 4.1. О наличии мутации судят по появлению на электрофореграмме дополнительного пика рядом с позицией пика дикого типа.

Определение мутаций гена TP53

Амплификация

Первоначально производят амплификацию фрагментов 5, 6, 7 и 8 экзонов методом ПЦР с праймерами, представленными в таблице 3.

Реакционная смесь общим объемом 15 мкл, содержит 1–250 нг геномной ДНК, 1х ПЦР-буфер (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), 0,2 мкМ каждого праймера, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs и 0,5 ед. активности Taq-полимеразы. После 5-минутной инкубации при 94 °C производят 35 циклов амплификации: денатурация при 94 °C — 30 с, отжиг при 58, 56 или 55 °C в зависимости от анализируемого экзона (таблица 3) — 30 с, элонгация при 72 °C — 50 с. Конечную элонгацию осуществляют в течение 10 мин при 72 °C.

Таблица 3. — Последовательность праймеров для амплификации фрагментов 5–8 экзонов гена *TP53*

Экзон	Праймеры	Размер продукта, п.н.	Температура отжига, °C
5	F: TCTTCCTACAGTACTCCCCT R: AGCTGCTCACCATCGCTATC	205	58
6	F: GATTGCTCTTAGGTCTGGCC R: TTAACCCCTCCTCCCAGAGA	162	56
7	F: TTATCTCCTAGGTTGGCTCT R: AAGAAATCGGTAAGAGGTGG	213	55
8	F: TCCTGAGTAGTGGAATCTA R: GCTTGCTTACCTCGCTTAGT	157	55

SSCP-анализ

ПЦР-продукты (3 мкл) смешивают с раствором LIS (20 мкл) (10 % сахара, 0,01 % бромфеноловый синий и 0,01 % ксиленцианол), инкубируют 5 мин при 97 °C, немедленно помещают в лед, после чего наносят на 10 % полиакриламидный гель, содержащий 5 % глицерина. Электрофорез производят при постоянном напряжении 280 В в течение 7 ч при температуре 8 °C. Результаты электрофореза визуализируют с помощью бромистого этидия или других более чувствительных флуоресцентных красителей.

Секвенирование

Все образцы, проявившие измененную электрофоретическую подвижность в SSCP-анализе, подвергают прямому секвенированию для определения нуклеотидной последовательности ДНК. Для этого ПЦР-продукты предварительно обрабатывают FastAP и Exo I в конечной концентрации 0,1 и 0,3 ед./мкл соответственно; инкубируют 20 мин при 37 °C, после чего инактивируют ферменты в течение 15 мин при 80 °C.

Реакцию секвенирования производят в объеме 5 мкл, содержащем 0,5 мкл смеси для секвенирования, 1,2х буфер для секвенирования, один из праймеров с конечной концентрацией 0,3 мкМ и 1 мкл ферментативно обработанного ПЦР-продукта. Для секвенирования используют те же праймеры, что и для амплификации фрагментов 5–8 экзонов. Программа секвенирующей реакции включает: прогревание при 96 °C в течение 1 мин, после чего следуют 30 циклов, включающих денатурацию при 96 °C — 10 с; отжиг при 50 °C — 5 с и синтез при 60 °C — 4 мин. Секвенирование каждого фрагмента выполняют дважды как с прямого, так и с обратного праймеров.

Осаждение продуктов реакции секвенирования выполняют с помощью 15 мкл 96 %-го этанола и 2 мкл 5 М ацетата аммония. После центрифугирования супернатант удаляют, а осадок промывают 70 %-м этанолом, высушивают и растворяют в Hi-Di формамиде. Разделение продуктов секвенирующей реакции осуществляют с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе. Нуклеотидные последовательности анализируют с использованием программы Chromas Lite.

Определение статуса метилирования гена *RUNX3*

Бисульфитная модификация ДНК

Бисульфитную обработку ДНК производят с использованием любого коммерческого набора в соответствии с рекомендациями производителя. В ходе бисульфитной модификации происходит полная конверсия всех неметилированных цитозинов в урацил; метилированные цитозины в составе CpG-динуклеотидов остаются неизменными.

Метил-специфическая ПЦР (МС-ПЦР)

Статус метилирования промоторной области гена *RUNX3* определяют с помощью МС-ПЦР с праймерами, специфичными к метилированному и неметилированному аллелю (таблица 4).

Таблица 4. — Последовательность праймеров, используемых в МС-ПЦР

Аллель	Праймеры	Размер продукта, п.н.	Температура отжига, °С
Метилированный аллель	F: GAGGGGCGGTCGTACGCGGG R: AAACGACCGACGCGAACGCCTCC	215	69
Неметилированный аллель	F: GAGGGGTGGTTGTATGTGGG R: AAACAACCAACACAAACACCTCC	215	61
Неконвертированная ДНК	F: GAGGGGCGGCCGACGCGGG R: CGGCCGGCGCGGGCGCCTCC	212	70

Кроме того, в каждом образце проверяют полноту конверсии за счет постановки ПЦР с праймерами, специфичными к неконвертированной ДНК.

Реакционная смесь общим объемом 15 мкл, содержит 100 нг бисульфит-конвертированной ДНК, 1х ПЦР-буфер, 0,2 мкМ каждого праймера, 0,2 mM dNTPs, 0,3 ед. активности Tornado Taq-полимеразы и ДМСО в конечной концентрации 5 %. После 15-минутной инкубации при 95 °С производят 40 циклов амплификации (денатурация при 99 °С — 1 с, отжиг при 70, 69 и 61 °С — 10 с для выявления неконвертированной, метилированной и неметилированной ДНК, соответственно элонгация при 72 °С — 10 с). Конечную элонгацию осуществляют в течение 2 мин при 72 °С.

Анализ продуктов метил-специфической ПЦР выполняют в 8 %-м полиакриламидном геле при напряжении 130 В. Результаты электрофореза визуализируют с помощью бромистого этидия.

ДНК считают метилированной в случае образования продукта длиной 215 п.н. в реакции с праймерами к метилированному аллелю (М-реакция); ДНК считают неметилированной при наличии продукта ПЦР с праймерами к неметилированному аллелю и его отсутствии в М-реакции.

Прогноз клинического течения РМПБМИ

Производится по алгоритму, схематически представленному на рисунке.

При подозрении на первичный или рецидивный рак мочевого пузыря, пациенту выполняется трансуретральная резекция (ТУР) мочевого пузыря, в ходе которой производится цистоскопия и, при возможности, полное удаление опухоли мочевого пузыря. При микроскопической оценке гистологических

микропрепаратов удаленного после ТУР материала определяется гистологический тип и распространенность опухоли. После гистологического подтверждения уротелиального РМПБМИ образец опухолевой ткани направляется на генетическое исследование.

Для предсказания рецидивирования заболевания учитывают наличие предшествующих рецидивов и мутационный статус гена *PIK3CA*. В случае рецидивного РМПБМИ и отсутствия мутации *PIK3CA* в опухолевом материале пациента относят к группе высокого риска возврата заболевания. В этом случае пациенту назначается адъювантная внутривузырная лекарственная терапия, включающая химиотерапию либо иммунотерапию вакциной БЦЖ.

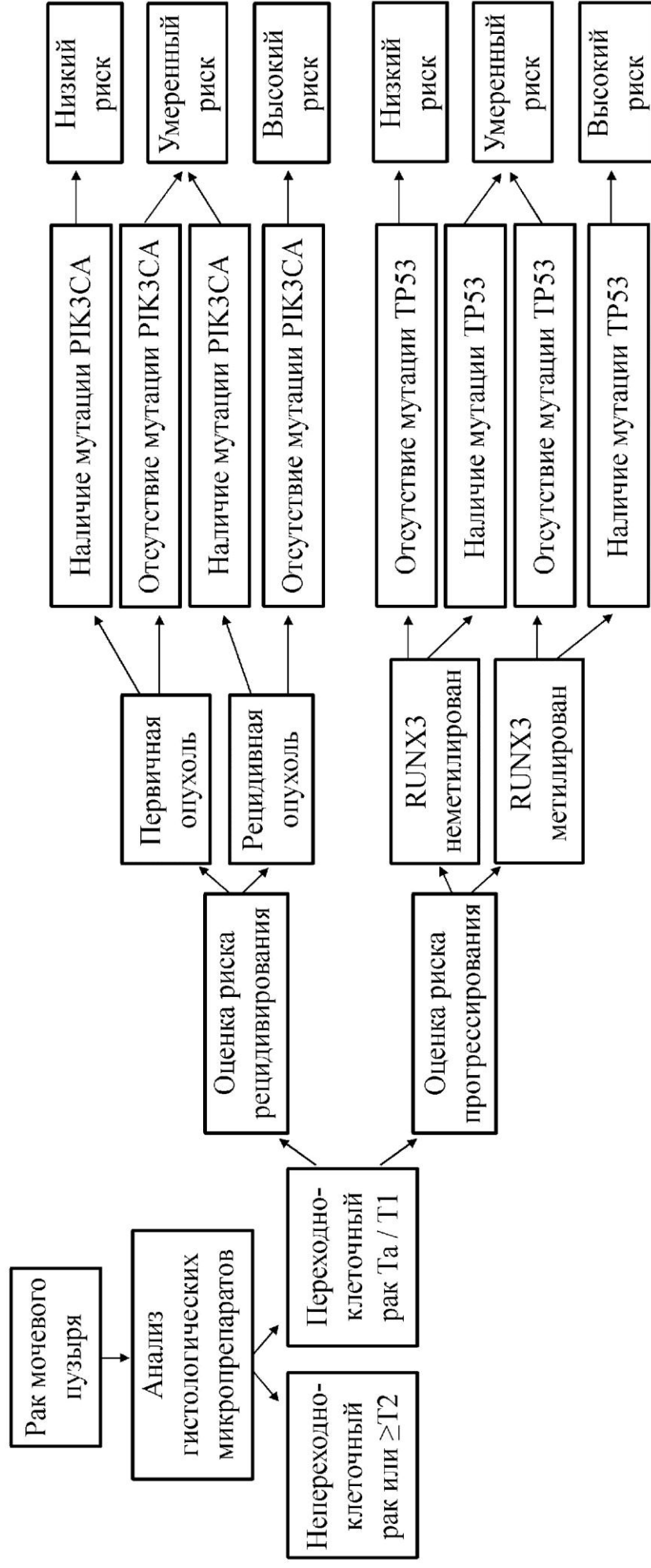


Рисунок — Алгоритм предсказания рецидивирования и прогрессирования РМПБМИ

Прогноз в отношении прогрессирования РМПБМИ оценивают в зависимости от мутаций гена *TP53* и метилирования гена *RUNX3*. Совместное наличие данных молекулярных изменений указывает на высокий риск развития мышечно-инвазивного рака и целесообразность применения тактики ранней цистэктомии для таких пациентов либо интенсивной адъювантной иммунотерапии БЦЖ с использованием длительных поддерживающих внутрипузырных инстилляций вакцины.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Неточное дозирование реагентов и изменение состава реакционной смеси.

Устранение: своевременная поверка пипеточных дозаторов, использование положительного и отрицательного контроля.

2. Низкая концентрация ДНК, изолированной из срезов парафиновых блоков.

Устранение: увеличение числа циклов до 45 в ПЦР.

3. Нарушения в технологии лабораторного тестирования.

Устранение: точное следование настоящей инструкции, а также рекомендациям производителей используемых наборов реагентов.

4. Выявление продукта длиной 212 п.н. в ПЦР с праймерами, специфичными к неконвертированной ДНК.

Устранение: повторная бисульфитная обработка образца ДНК.

5. Появление неспецифических пиков на электрофореграмме.

Устранение: выдерживание реакционной смеси на льду до помещения пробирок в термоциклер; использование свежих растворов ферментов FastAP и Eho I для удаления не вошедших в реакцию нуклеотидов и праймеров; избегание контаминации за счет соблюдения принципов стерильности и зонирования лабораторных помещений для генетических исследований.

УТВЕРЖДАЮ

руководитель учреждения, в котором

внедрен способ

« ____ » _____ 20__ г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. Название предложения для внедрения: Метод предсказания результатов лечения рака мочевого пузыря без мышечной инвазии на основе панели молекулярно-генетических и эпигенетических маркеров.

2. Кем предложено (наименование учреждения-разработчика, автор): РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, 223040, Минский р-н, а/г Лесной-2, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; канд. биол. наук М. П. Смаль, д-р мед. наук А. И. Ролевич, канд. мед. наук Т. И. Набебина, чл.-корр., д-р мед. наук, проф. С. А. Красный, д-р мед. наук С. Л. Поляков, д-р биол. наук, проф. Р. И. Гончарова

3. Источник информации: инструкция по применению №

4. Где и когда начато внедрение _____

наименование лечебного учреждения, дата внедрения

5. Общее количество наблюдений _____

6. Результаты применения метода за период с _____ по _____

положительные (количество наблюдений): _____

отрицательные (количество наблюдений): _____

неопределенные (количество наблюдений): _____

7. Эффективность внедрения: _____

8. Замечания, предложения _____

Дата

Ответственные за
внедрение

должность, Ф.И.О., кафедра

подпись

Примечание. Акт о внедрении направляется организации-разработчику (п. 2), п.п. 4–8 заполняются организацией, внедрившей разработку.