

**МИНСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2017 г.



Регистрационный № 098 –1117

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ  
РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СРЕДСТВАМИ:  
5-ФТОРУРАЦИЛ + КАЛЬЦИЯ ФОЛИНАТ**

**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**

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневиц

01.12.2017

Регистрационный № 098-1117

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ  
РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СРЕДСТВАМИ:  
5-ФТОРУРАЦИЛ + КАЛЬЦИЯ ФОЛИНАТ**

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 определения неблагоприятного прогноза при раке толстой кишки, основанный на определении уровня экспрессии генов TUMS и TUMP с использованием технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Метод может применяться 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**

*Перечень необходимых медицинских изделий:*

1. Бокс биологической безопасности 2 класса (тип В2 — без рециркуляции).
2. Термостат твердотельный (от 25 до 100 °С).
3. Охладитель проб (от 4С до 10 °С).
4. Вортекс.
5. Микроцентрифуга, обеспечивающая скорость вращения ротора до 14 000 об/мин.
6. Вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой.
7. Амплификатор (термоциклер) для ПЦР в режиме реального времени.
8. Автоматические дозаторы переменного объема.
9. Холодильник (от 2 до 8 °С).
10. Низкотемпературный морозильник (-70 °С).

*Перечень необходимых реактивов и расходных материалов:*

1. Набор реагентов для выделения общей фракции РНК из биологических образцов.
2. Набор реагентов для реакции обратной транскрипции.
3. Набор реагентов для амплификации кДНК с использованием ПЦР в режиме реального времени.
4. Олигонуклеотиды синтетические (праймеры).
5. Спирт этиловый 96 %.
6. Микропробирки объемом 1,5 мл.
7. Микропробирки объемом 0,2 мл или микропробирки в стрипах объемом 0,2 мл, имеющие маркировку для ПЦР, и оптические крышки к ним.
8. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Рак толстой кишки (код по МКБ-10 С18, С19).

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

### 1. Требования, предъявляемые к забору материала 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.

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

При исследовании применяются набор реагентов для выделения общей фракции РНК согласно инструкции производителя и 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 проводится непосредственно после получения общей фракции РНК, применяется набор реагентов для постановки реакции обратной транскрипции согласно инструкции производителя. В 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.

### 3. 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 применяется 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 используется ген 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 постановки реакции используется следующий протокол:

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

#### 4. Анализ результатов

Оценка относительного уровня экспрессии генов осуществляется с помощью метода  $2^{-\Delta\Delta C_p}$ . По завершении 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 каждого маркера (TYMS, TYMP и SCARNA5) процедура производится индивидуально.

4.1. Рассчитывают значения  $\Delta Cp$  генов-мишеней для образцов опухолевой ткани согласно формуле 1:

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

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

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

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

4.2. Вычисляют значение  $\Delta\Delta Cp$  для гена TUMS согласно формуле 2:

$$\Delta\Delta Cp^{\text{TUMS}} = \Delta Cp_{\text{ОПУХОЛЬ}}^{\text{TUMS}} - 1,2, \quad (2)$$

где  $\Delta\Delta Cp^{\text{TUMS}}$  — экспрессия гена TUMS, нормализованная по нормальной ткани.

Вычисляют значение  $\Delta\Delta Cp$  гена TUMP согласно формуле 3:

$$\Delta\Delta Cp = \Delta Cp_{\text{ОПУХОЛЬ}}^{\text{TUMP}} - 8,4, \quad (3)$$

где  $\Delta\Delta Cp^{\text{TUMP}}$  — экспрессия гена TUMP, нормализованная по нормальной ткани.

4.3. Вычисляют значения  $2^{-\Delta\Delta Cp}$ .

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

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

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

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

## 5. Критерии прогноза

В случае определения повышенного уровня экспрессии гена TUMS ( $> 1,81$  усл. ед.) при нормальном либо пониженном уровнях экспрессии гена TUMP ( $< 6,77$  усл. ед.) у пациента, страдающего раком толстой кишки, прогноз неблагоприятный.

Клинические примеры определения индивидуального прогноза приведены в приложении к инструкции по применению «Метод прогнозирования эффективности лечения рака толстой кишки лекарственными средствами: 5-фторурацил + кальция фолинат».

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

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

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

2. Неточное дозирование реагентов.

Устранение: ежегодно проверять автоматические дозаторы переменного объема.

3. Нарушения в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т. д.).

Устранение: точно следовать инструкции к используемому набору реагентов.

**Клинические примеры прогнозирования эффективности лечения пациентов, страдающих раком толстой кишки, лекарственными средствами: 5-фторурацил + кальция фолинат**

*Пример 1*

Пациент А. Диагноз: рак восходящей ободочной кишки, pT3N1M0, III стадия. Хирургическое вмешательство произведено 04.08.2011. В опухолевой ткани определены уровни экспрессии генов TУMS и TУMP методом ПЦР в режиме реального времени. Уровень экспрессии гена TУMS составил 4,03 усл. ед., гена TУMP — 1,58 усл. ед. Прогноз неблагоприятный. Прогрессирование опухолевого процесса (метастазы в обоих легких, забрюшинных лимфатических узлах) выявлено 08.02.2013 (18 мес.).

*Пример 2*

Пациент Б. Диагноз: рак печеночного изгиба ободочной кишки, pT4N2M0, III стадия. Хирургическое вмешательство произведено 14.07.2011. В опухолевой ткани определены уровни экспрессии генов TУMS и TУMP методом ПЦР в режиме реального времени. Уровень экспрессии гена TУMS составил: 2,36 усл. ед., гена TУMP — 0,049 усл. ед. Прогноз неблагоприятный. Прогрессирование опухолевого процесса (метастазы в большом сальнике, диссеминация по брюшине) выявлено 07.04.2015 (45 мес.).