

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Ю.Л.Горбич

2024 г.

Регистрационный №

007-0524



**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ  
МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ У РАДИКАЛЬНО ОПЕРИРОВАННЫХ  
ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ РАКОМ ЛЕГКОГО IА-IIВ  
СТАДИИ, НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК  
СУРВИВИНА (*BIRC5*) В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ  
КЛЕТКАХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы  
народов медицинский университет», учреждение здравоохранения  
«Витебский областной клинический онкологический диспансер»

АВТОРЫ: Лясников К.А., д.м.н., доцент Шляхтунов Е.А., д.м.н.,  
профессор Семенов В.М., к.м.н. Томчина А.В.

Минск, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод оценки вероятности метастазирования у радикально оперированных пациентов, страдающих раком легкого IA-IIВ стадии, на основе определения экспрессии мРНК сурвивина (*BIRC5*) в циркулирующих опухолевых клетках (далее ЦОК), выделенных из периферической крови пациентов.

Инструкция предназначена для врачей-онкологов, врачей-онкологов-хирургов, врачей-радиационных онкологов, врачей-хирургов, врачей-торакальных хирургов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим раком легкого, за исключением мелкоклеточного рака легкого.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Злокачественные опухоли легкого (С34) IA-IIВ стадии, за исключением мелкоклеточного рака легкого, у радикально оперированных пациентов.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ**

1. Пробирки стерильные вакуумные с К<sub>2</sub>ЭДТА объемом 5 мл для хранения периферической венозной крови.
2. Термоциклер для Real-Time PCR.
3. Пластиковые расходные материалы для термоциклера.

4. Микроцентрифуга скоростная (15000 g), пригодная для пробирок объёмом 0,2 мл, 1,5 мл и 2,0 мл, а также для 96-луночных микропланшетов.

5. Твердотельный термостат, поддерживающий температуру 95°C, пригодный для пробирок объёмом 0,2 мл, 1,5 мл и 2,0 мл, а также для 96-луночных микропланшетов.

6. Вихревой смеситель.

7. Пробирки типа эппендорф объёмом 1,5 мл.

8. Дозаторы механические или электронные объёмом 10-100 мкл.

9. Одноразовые наконечники (обязательно наконечники с фильтром для предотвращения кросс-контаминации).

10. Набор для обогащения и выделения CD326/EpCAM положительных клеток из периферической крови.

11. Наборы для выделения общей фракции РНК (сорбционный принцип).

12. Набор реагентов для проведения реакции обратной транскрипции.

13. Набор реагентов для проведения ПЦР в режиме реального времени.

14. Средства индивидуальной защиты (лабораторный халат, перчатки, очки).

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

1. Определение экспрессии сурвивина (*BIRC5*) в ЦОК через 3 месяца после хирургического вмешательства.

1.1. Получение и хранение биологического материала.

Получение периферической венозной крови осуществляют утром натощак из локтевой вены в стерильную вакуумную пробирку объемом 5 мл с К<sub>2</sub>ЭДТА. Полученный образец периферической венозной крови транспортируется в контейнере для транспортировки биологических образцов в лабораторию и выполняются последующие этапы исследования. Допускается при необходимости хранение образца в холодильнике не более 4 часов при температуре +4 °С.

### 1.2. Обогащение и выделение ЦОК.

Обогащение и выделение ЦОК из периферической крови производят с применением метода экспресс-выделения опухолевых клеток из цельной крови с использованием ковалентно-связанных антител для CD326 (EрСАМ) на немагнитной полимерной матрице с последующим разделением ЦОК по размеру (согласно инструкции производителя набора для выделения).

### 1.3. Определение нормализованной экспрессии гена сурвивина (*BIRC5*) в ЦОК.

Из ЦОК выделяют РНК, проводят реакцию обратной транскрипции для получения кДНК, которую используют для проведения TaqMan ПЦР в режиме реального времени с использованием необходимых пар праймеров и зондов для гена сурвивина (*BIRC5*) и для контрольного референсного гена *c-ABL*, затем проводят амплификацию по программе: 1 цикл: 95°С – 4 мин.; 45 циклов: 95°С – 30 с, 59°С – 1 мин., проводят детекцию флуоресценции по каналам FAM для гена сурвивина (*BIRC5*) и FAM для гена *c-ABL*.

Наличие экспрессии гена сурвивина (*BIRC5*) определяется по каналу FAM, при этом значение порогового цикла находится в пределах от 18 до 35, и по каналу FAM для гена *c-ABL*, значение порогового цикла находится в пределах от 18 до 35. Отсутствие экспрессии гена сурвивина (*BIRC5*) определяется по каналу FAM – значение порогового цикла не определяется

или больше 35, а по каналу FAM для гена *c-ABL*, значение порогового цикла находится в пределах от 18 до 35.

2. Интерпретация результатов и принятие управленческого решения.

2.1. В случае если через 3 месяца после операции не определяется нормализованная экспрессия гена сурвивина (*BIRC5*) в циркулирующих опухолевых клетках, то делают заключение о низкой вероятности метастазирования у радикально оперированных пациентов. Пациенту показано дальнейшее диспансерное наблюдение.

2.2. В случае если через 3 месяца после операции определяется нормализованная экспрессия гена сурвивина (*BIRC5*) в циркулирующих опухолевых клетках, то делают заключение о высокой вероятности метастазирования у радикально оперированных пациентов и назначают адъювантную химиотерапию.

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

Возможные ошибки могут быть связаны с неправильным взятием, транспортировкой и хранением биологического материала, применением реагентов с истекшим сроком годности, неточным дозированием реагентов, нарушением технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т. д.), нарушением протокола выделения РНК, синтеза кДНК, и проведения TaqMan ПЦР в режиме реального времени.

Устранение: для того чтобы избежать ошибок нужно точно следовать этапам данной инструкции по применению и инструкциям производителя материалов и реагентов.