

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
Е.Н. Кроткова  
« 29 » 09 2023 г.  
Регистрационный № 037-0523

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ АНТРАЦИКЛИН-  
ИНДУЦИРОВАННОЙ КАРДИТОКСИЧНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ  
СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ  
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования  
«Гродненский государственный медицинский университет», учреждение  
образования «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: Карпуть И.А., д.м.н., профессор, член-корр. НАН Беларуси  
Снежицкий В.А., канд. хим. наук, доцент Бабенко А.С., канд. мед. наук,  
доцент Курбат М.Н., канд. мед. наук Горустович О.А.

Гродно, 2023

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод прогнозирования развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности у пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы, основанный на определении генотипа полиморфных вариантов rs243865 (ген *MMP-2*), rs522616 (ген *MMP-3*), rs281864927 и rs267607155 (ген *TTN*).

Метод предназначен для врачей онкологов-хирургов, врачей-онкологов, врачей-кардиологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам со злокачественными новообразованиями молочной железы в условиях медицинского стационара, и/или в амбулаторных условиях, и/или в условиях отделения дневного пребывания.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Злокачественное новообразование молочной железы (C50)

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ**

1. Лабораторное оборудование и материалы:
  - 1.1. ПЦР-бокс;
  - 1.2. микроцентрифуга-вортекс не менее 500 × g;
  - 1.3. высокоскоростная центрифуга для пробирок вместимостью 1,5-2,0 мл не менее 8000 × g;
  - 1.4. автоматический ДНК-анализатор
  - 1.5. камера для горизонтального электрофореза;
  - 1.6. СВЧ-печь бытовая;
  - 1.7. трансиллюминатор или система документирования гелей;
  - 1.8. программируемый термоциклер для проведения ПЦР/ПЦР-РВ в комплекте с компьютером и программным обеспечением для управления прибором, хранения данных и анализа;

1.9. твердотельный термостат для микропробирок вместимостью 1,5 мл и 2,0 мл с функцией охлаждения и нагрева (минус 10°C ...+100°C);

1.10. холодильник бытовой +2...+8°C с морозильной камерой минус 12...минус 22°C;

1.11. дозаторы переменного объема (0,5-10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл);

1.12. штатив для пробирок вместимостью 0,2 мл;

1.13. штатив для пробирок вместимостью 1,5 мл и 2,0 мл;

1.14. емкость для сброса использованных наконечников;

1.15. пробирки для взятия образцов крови, содержащие этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), фиолетовый цветовой код, предназначенные для взятия 2-5 мл крови или тампон-зонды для взятия буккального эпителия.

1.16. пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл с оптическими крышками;

1.17. пробирки вместимостью 1,5 и 2,0 мл;

1.18. наконечники с фильтрами вместимостью до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл;

1.19. неопудренные перчатки.

2. Наборы и реактивы:

2.1. набор для выделения геномной ДНК;

2.2. набор для проведения ПЦР;

2.3. набор для проведения ПЦР-РВ;

2.4. набор для очистки ДНК из агарозного геля;

2.5. набор для секвенирования;

2.6. агароза для электрофореза;

2.7. буфер для загрузки продуктов ПЦР в агарозный гель;

2.8. вода для молекулярной биологии (свободная от РНКаз/ДНКаз), вода для ПЦР;

2.9. ДНК-маркер молекулярного веса 100-1000 пар оснований;

2.10. изопропиловый спирт;

2.11. трис-ацетатный буферный раствор для агарозного геле-электрофореза, рН 8,5;

2.12. этиловый спирт ректифицированный.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА

Все этапы работы – выделение ДНК из образцов биологического материала и проведение ПЦР-РВ, проводятся в отдельных помещениях согласно правилам организации ПЦР-лаборатории – инструкция по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13 ноября 2008 г. № 090-1008 «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)».

Взятие биологического материала проводится в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 10.11.2015 г. № 1123 «Об утверждении Инструкции о порядке организации преаналитического этапа лабораторных исследований». При работе с образцами биологического материала необходимо соблюдать меры безопасности как при работе с потенциально инфицированным материалом. Взятие крови осуществляется в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт (ЭДТА). Взятие буккального эпителия осуществляется тампон-зондами.

Технология применения метода включает три этапа:

Этап 1 – выделение геномной ДНК из биологического материала (цельная кровь или буккальный эпителий). Выделение геномной ДНК осуществляется согласно инструкции производителя набора реагентов. Допускается хранение полученных образцов ДНК при температуре +2...+8°C в течение 30 суток. Для длительного хранения (более 30 суток) допускается использование бытовых морозильных камер минус 12...минус 20°C.

Этап 2 – определение генотипа rs522616 (ген *MMP-3*), rs281864927 и rs267607155 (ген *TTN*), rs243865 (ген *MMP-2*). Проводится посредством молекулярно-генетического исследования образцов ДНК.

Каждый образец ДНК пациентов анализируют методом аллельной дискриминации однонуклеотидных замен с использованием ПЦР-РВ или секвенированием по методу Сэнгера.

Для определения генотипов rs522616 (ген *MMP-3*), rs281864927 и rs267607155 (ген *TTN*) используют олигонуклеотиды приведенные в таблице 1.

Таблица 1– Олигонуклеотидные последовательности праймеров и зондов, используемые для генотипирования rs522616 (ген *MMP-3*), rs281864927 и rs267607155 (ген *TTN*)

Код	Последовательность	Мод.5'	Мод.3'
Rs2616_F	CCACGTAGCTGCTCCATA		
Rs2616_R	GAATTCAGTCCGGTAAGCA		
Rs2616_Ref	A[LNA+T][LNA+A][LNA+G]TTGTAGAA <sup>t</sup> TGAAATGAATTA	FAM	BHQ1
Rs2616_Alt	A[LNA+T][LNA+A]GTTGTAGAA <sup>c</sup> TGAAATGAATTA	HEX	BHQ1
TTN155_F	AGCAATTCCACTCTGGAAGG		
TTN155_R	GGAGTGCCACATCTCTGGAT		
TTN155_Rf	GTAGTCTTCCCTGTACCATGTCACTGTC	FAM	BHQ1
TTN155_AI	GTAGTCTTCCCTGTACCGTGTCACTGTC	HEX	BHQ1
TTN927_F	CAGTAGCCTGTGCTTTCACG		
TTN927_R	GTGGAACCTCCCCTGTTCTT		
TTN927_Rf	GTAACATGGTCCTGTGGTGGAAGAA	FAM	BHQ1
TTN927_AI	AAAGAAAAATCCTGTGGTGGAAGAAAA	HEX	BHQ1

Олигонуклеотиды должны поставляться в лиофилизированном виде в защищенной от света упаковке. Каждый олигонуклеотид и зонд растворяют отдельно в воде для ПЦР до конечной концентрации 100 пикомоль/мкл.

Генотипирование rs522616 (ген *MMP-3*), rs281864927 и rs267607155 (ген *TTN*) методом ПЦР-РВ проводят с использованием готовой смеси для ПЦР-РВ или отдельных компонентов с соблюдением следующих требований: конечный объем реакционной смеси (в пробирке) включающей все компоненты для проведения ПЦР-РВ, а также ДНК-матрицу – 25 мкл; концентрация ионов магния в реакционной смеси 2 мМ (2 миллимоль/литр); концентрация дНТФ (дезоксинуклеотидтрифосфатов) в реакционной смеси 0,2 мМ (миллимоль/литр) каждого (дА, дТ, дЦ и дГ); количество термостабильной Taq ДНК-полимеразы 1,25 единицы активности (1,25 ед.); количество ДНК-матрицы 50-500 нг; количество каждого олигонуклеотида, включая зонды для ПЦР-РВ 10 пикомоль (концентрация 400 наномоль/литр). При использовании растворов олигонуклеотидов с концентрацией 100 пикомоль/мкл требуется использовать 0,1 мкл раствора каждого олигонуклеотида. Рекомендуется готовить общую смесь всех 4 олигонуклеотидов и вносить по 0,4 мкл такого раствора для проведения единичного исследования (реакции).

Пример составления протокола постановки анализа методом ПЦР-РВ приводится в таблицах 2 и 3 с использованием готовой смеси

для ПЦР-РВ и отдельных компонентов для проведения ПЦР-РВ соответственно.

Таблица 2 – Протокол постановки ПЦР-РВ с использованием готовой смеси

№	Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
1	Вода для ПЦР	7,1
2	Готовая смесь для проведения ПЦР-РВ	12,5
3	Смесь олигонуклеотидов	0,4
4	ДНК-матрица	5

Таблица 3 – Протокол постановки ПЦР-РВ с использованием отдельных компонентов

№	Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
1	Вода для ПЦР	15,6
2	Раствор хлорида магния (50 мМ)	1
3	Смесь дНТФ (10 мМ)	0,25
4	Смесь олигонуклеотидов	0,4
5	Буферный раствор 10х	2,5
6	Раствор ДНК-полимеразы (5 ед/мкл)	0,25
7	ДНК-матрица	5

Программа термоциклирования представлена в таблице 4

Таблица 4 – Программа термоциклирования

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация первичная	95	2 мин	1
Денатурация	95	5 сек	50
*Отжиг	см. ниже	10 сек	
Элонгация	72	20 сек	

\*rs522616: отжиг при +58 °С; rs281864927: отжиг при +57 °С; rs267607155 (ген *TTN*): отжиг при +62 °С.

Детекция осуществляется по каналу FAM и по каналу HEX в конце каждого цикла на этапе элонгации. При высоких концентрациях ДНК количество циклов может быть уменьшено до 40.

Генотипирование rs243865 (ген *MMP-2*) проводят с помощью метода секвенирования по Сэнгеру с использованием олигонуклеотидных праймеров представленных в таблице 5.

Таблица 5 – Олигонуклеотидные праймеры для проведения секвенирования по Сэнгеру rs243865 (ген *MMP-2*)

Код	Направление	Последовательность
Rs3865_F	Прямой	GTCTGAAGCCCACTGAGACC
Rs3865_R	Обратный	CCTGTGACAACCGTCTCTGA

Первую ПЦР проводят с использованием готовой смеси для ПЦР или отдельных компонентов с соблюдением следующих требований: конечный объем реакционной смеси (в пробирке), включающей все компоненты для проведения ПЦР, а также ДНК-матрицу – 25 мкл; концентрация ионов магния в реакционной смеси 2 мМ (2 миллимоль/литр); концентрация дНТФ в реакционной смеси 0,2 мМ (миллимоль/литр) каждого (дА, дТ, дЦ и дГ); количество термостабильной Taq ДНК-полимеразы 1 единица активности (1 ед.); количество ДНК-матрицы 100-500 нг; количество каждого олигонуклеотида, включая зонды для ПЦР-РВ, 10 пикомоль (концентрация 400 наномоль/литр). При использовании растворов олигонуклеотидов с концентрацией 100 пикомоль/мкл требуется использовать 0,1 мкл раствора каждого олигонуклеотида. Рекомендуется готовить общую смесь всех 4 олигонуклеотидов и вносить по 0,2 мкл такого раствора для проведения единичного исследования (реакции).

Пример составления протокола постановки ПЦР приводится в таблицах 6 и 7 с использованием готовой смеси для ПЦР и отдельных компонентов для проведения ПЦР соответственно.

Таблица 6 – Протокол постановки ПЦР с использованием готовой смеси

№	Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
1	Вода для ПЦР	7,3
2	Готовая смесь для проведения ПЦР	12,5
3	Смесь олигонуклеотидов	0,2
4	ДНК-матрица	5

Таблица 7 – Протокол постановки ПЦР с использованием отдельных компонентов

№	Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
1	Вода для ПЦР	15,85
2	Раствор хлорида магния (50 мМ)	1
3	Смесь дНТФ (10 мМ)	0,25
4	Смесь олигонуклеотидов	0,2
5	Буферный раствор 10х	2,5
6	Раствор ДНК-полимеразы (5 ед/мкл)	0,2
7	ДНК-матрица	5

Программа термоциклирования представлена в таблице 8.

Таблица 8 – Программа термоциклирования

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация первичная	95	2 мин	1
Денатурация	95	5 сек	33
Отжиг	58	10 сек	
Элонгация	72	40 сек	
Финальная элонгация	72	5 мин	

Контроль наличия продуктов ПЦР выполняют методом электрофореза в 1,5% агарозном геле при 115В в течение 30 минут. Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора по сравнению с ДНК-маркером. Размер целевого ПЦР-продукта составляет 525 п.н. При наличии в дорожках геля соответствующей полосы ее вырезают и помещают в стерильную пробирку для последующей очистки.

Очистка целевого фрагмента ДНК осуществляется согласно инструкции, предоставляемой производителем соответствующего набора реагентов. Постановка термоциклического секвенирования проводится согласно инструкции производителя соответствующего набора реагентов. Для каждой пробы проводят реакцию с прямым олигонуклеотидом, используемым для постановки ПЦР (таблица 5). В каждую пробирку с реакционной смесью вносят только один олигонуклеотидный праймер.

Очистка продуктов реакции термоциклического секвенирования осуществляется методом преципитации этанолом. Протокол очистки

с помощью преципитации этанолом изложен в инструкции к набору для секвенирования. Распознавание последовательности ДНК проводится в автоматическом режиме с использованием генетического анализатора согласно инструкции к прибору, с использованием соответствующего программного обеспечения.

Этап 3 – интерпретация результатов.

Генотипирование rs522616 (ген *MMP-3*). Возможные варианты генотипов: гомозигота ТТ либо СС, гетерозигота ТС. Наличие аллели С (уровень флуоресценции по каналу HEX пересек пороговую линию – рассчитывается автоматически программным обеспечением) вне зависимости от генотипа связано с повышенной вероятностью развития кардиотоксичности.

Генотипирование rs281864927 (ген *TTN*). Возможные варианты генотипов: гомозигота ССАТГТТАСТТ либо (Т)<sub>5</sub>СТТТСА, гетерозигота ССАТГТТАСТТ/(Т)<sub>5</sub>СТТТСА. Наличие генотипа ССАТГТТАСТТ/(Т)<sub>5</sub>СТТТСА (уровень флуоресценции по каналам FAM и HEX пересек пороговую линию – рассчитывается автоматически программным обеспечением) связано с повышенной вероятностью развития кардиотоксичности.

Генотипирование rs267607155 (ген *TTN*). Возможные варианты генотипов: гомозигота АА либо GG, гетерозигота AG. Наличие генотипа AG (уровень флуоресценции по каналам FAM и HEX пересек пороговую линию – рассчитывается автоматически программным обеспечением) связано с повышенной вероятностью развития кардиотоксичности.

Генотипирование rs243865 (ген *MMP-2*) Возможные варианты генотипов: гомозигота ТТ либо СС, гетерозигота ТС. Наличие аллелей Т и С определяется путем сравнения результатов секвенирования по Сэнгеру с референсными последовательностями: ССССАСССAGCACTCC – наличие аллели С; ССССАСССAGCACTCT – наличие аллели Т.

Генотип ТТ связан с повышенной вероятностью развития кардиотоксичности.

При повышенной вероятности развития кардиотоксичности необходимо проведение мероприятий по медицинской профилактике.

## **ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МЕТОДА И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

При использовании метода ПЦР для генотипирования основной причиной ошибок являются факторы, связанные с нарушением правил взятия, хранения и транспортировки проб, загрязненными реагентами, инструментарием, перекрестной контаминацией (загрязнением) продуктами амплификации.

Во избежание данных ошибок необходимо четкое соблюдение правил взятия, хранения и транспортировки образцов; выполнение процедур, связанных с проведением ПЦР-исследования.

\_\_\_\_\_  
название  
\_\_\_\_\_  
учреждения  
\_\_\_\_\_  
здравоохранения

УТВЕРЖДАЮ  
Главный врач

\_\_\_\_\_  
И.О.Фамилия  
\_\_\_\_\_  
202\_\_\_\_  
МП

## А К Т

### о внедрении результатов научных исследований в лечебную практику

**1. Наименование предложения для внедрения:** инструкция по применению «Метод прогнозирования развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности у пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы».

**2. Кем предложена разработка:** сотрудниками УО «Гродненский государственный медицинский университет» Карпуть И.А., д.м.н., профессором, член-корр. НАН Беларуси Снежицким В.А., к.м.н., доцентом Курбатом М.Н., к.м.н. Горустович О.А., сотрудником УО «Белорусский государственный медицинский университет» к.х.н., доцентом Бабенко А.С.,

**3. Источник информации:** Метод прогнозирования развития антрациклин-индуцированной кардиотоксичности у пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы: инструкция по применению № 037-0423, утв. МЗ РБ 29.09.2023

**4. Краткая аннотация разработки:** Метод позволяет прогнозировать вероятность развития кардиотоксичности у пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы еще до начала проведения химиотерапии препаратами антрациклинового ряда, что поможет уменьшить число пациентов с кардиомиопатией, обусловленной полихимиотерапией в Республике Беларусь.

**5. Где внедрено:** \_\_\_\_\_

**6. Результаты применения метода за период с \_\_\_\_\_ по \_\_\_\_\_**

Общее количество наблюдений \_\_\_\_\_.

Из них: положительные \_\_\_\_\_, отрицательные \_\_\_\_\_.

**7. Эффективность внедрения** (восстановление трудоспособности, снижение заболеваемости, рациональное использование коечного фонда, врачебных кадров и медицинской техники) \_\_\_\_\_

**8. Замечания, предложения** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
20 \_\_\_\_\_ Ответственные за внедрение

\_\_\_\_\_  
Должность

\_\_\_\_\_  
подпись

\_\_\_\_\_  
И.О.Фамилия

Примечание:

акт о внедрении направлять по адресу:

кафедра онкологии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

ул.Горького, 80, 230009, г.Гродно

