

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



**МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА РЕЦИДИВА  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ  
ГОЛОВНОГО МОЗГА**

инструкция по применению

Учреждения-разработчики: государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии»; государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»

Авторы: к.б.н., доцент Николаевич Л.Н., к.м.н. Талабаев М.В., к.б.н., доцент Пархач Л.П., д.м.н., член-корр. НАН Беларуси Залуцкий И.В., Черныш Е.Ю.

Минск, 2016

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
28.10.2016  
Регистрационный № 054-0916

**МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА РЕЦИДИВА  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии», ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Л.Н. Николаевич, канд. мед. наук М.В. Талабаев, канд. биол. наук, доц. Л.П. Пархач, д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси И.В. Залуцкий, Е.Ю. Черныш

Минск 2016

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод оценки риска рецидива злокачественного новообразования головного мозга путем определения клональной гетерогенности опухолевых клеток, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на вторичную медицинскую профилактику рецидива злокачественного новообразования головного мозга.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-нейрохирургов, химиотерапевтов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам со злокачественными новообразованиями головного мозга.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

### **Оборудование:**

1. Ламинарный бокс (не ниже II класса).
2. CO<sub>2</sub>-инкубатор.
3. Инвертированный микроскоп.
4. Автоматический счетчик клеток.
5. Холодильник (температурный режим +4°C).
6. Морозильная камера (температурный режим -20°C).
7. Набор автоматических дозаторов переменного объема 2–1000 мкл.
8. Бинокулярный микроскоп.

### **Материалы:**

1. Стерильные флаконы на 25 см<sup>2</sup> для культивирования клеток.
2. Стерильные пипетки серологические на 5; 10 и 25 мл.
3. Стерильные наконечники для дозаторов.
4. Стерильные чашки Петри.
5. Стерильные флаконы 10; 20; 50 мл.

### **Реактивы:**

1. Среды для клонирования клеток (DMEM/F12, F10).
2. Фетальная бычья сыворотка (FBS).
3. Трипсин/ЭДТА.
4. Раствор Хенкса, фосфатный буфер (PBS).
5. Пенициллин/стрептомицин/гентамицин.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Злокачественные новообразования головного мозга.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Метод оценки риска рецидива злокачественного новообразования головного мозга является способом оценки агрессивности клоногенных (стволовых) опухолевых клеток и вероятности их прогрессирования на основании

определения клональной гетерогенности опухолей и эффективности клонирования (далее — ЭК) опухолевых клеток у пациентов со злокачественными новообразованиями головного мозга. Метод используется при медуллобластоме, эпендимоме, пилоцитарной астроцитоме, анапластической астроцитоме, глиобластоме.

Технология использования метода основана на выделении клеточных популяций из опухолей и разделении гетерогенной популяции клеток методом клонирования *in vitro* на единичные клоны опухолевых клеток, которые формируют колонии: малоклеточные с низким потенциалом пролиферации — неклоногенные (далее — ЭК<sub>нк</sub>) и многоклеточные с высоким потенциалом деления — клоногенные (далее — ЭК<sub>кл</sub>). Соотношение много- и малоклеточных колоний — индекс клональной гетерогенности опухоли (далее — И<sub>кг</sub>) и эффективность их клонирования — является прогностическим критерием агрессивности злокачественного новообразования головного мозга.

Метод диагностики клональной гетерогенности опухолей головного мозга включает:

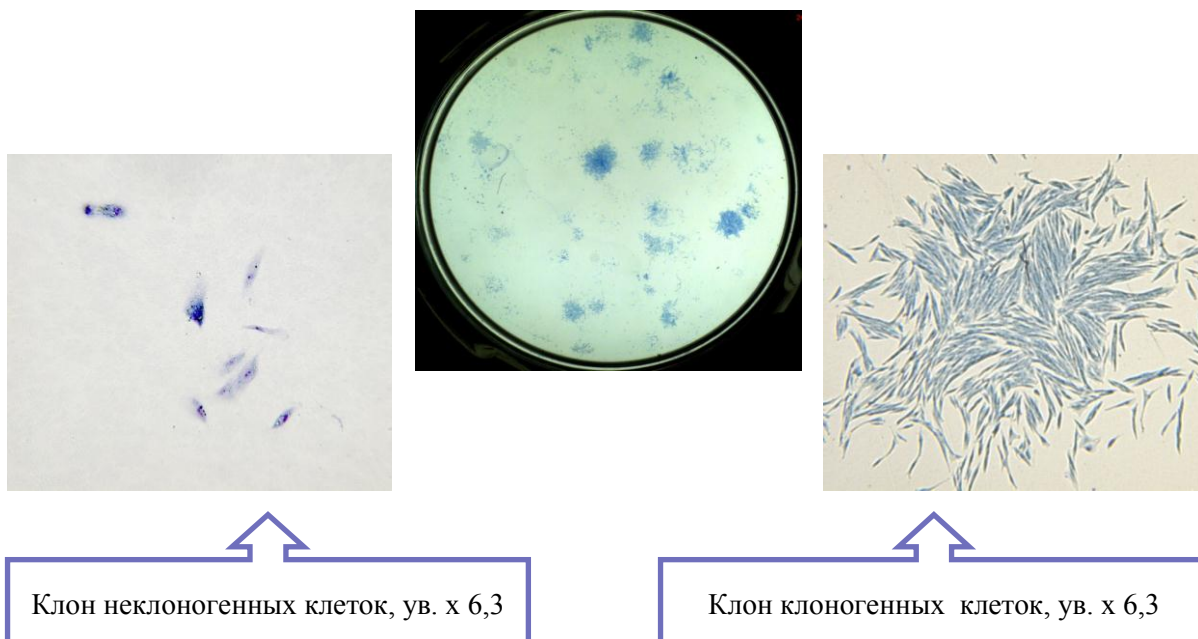
I этап — выделение опухолевых клеток

Производят забор образца ткани опухоли после операции в сухую стерильную пробирку (по возможности несколько образцов ткани объемом 1 см<sup>3</sup>, взятых из середины опухоли); транспортировку образца в лабораторию (не позже 4 ч после забора); в стерильных условиях послеоперационный образец опухоли диспергируют на клеточные составляющие путем механического воздействия в сочетании с ферментативной обработкой трипсином (0,2 %) и ЭДТА (0,05 %); подсчитывают концентрацию живых клеток в суспензии клеток. Суспензию опухолевых клеток очищают от клеток стромы путем выращивания первичной культуры с неоднократной сменой среды.

II этап — клонирование опухолевых клеток *in vitro*

Единичные клетки помещают в клональные условия в чашки Петри для формирования колоний; спустя 7 сут после инкубации в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> и 95% влажности воздуха колонии единичных клеток фиксируют 70° этанолом и окрашивают по Романовскому–Гимза в течение 10 мин.

III этап — анализ эффективности клонирования клоногенных клеток и клональный анализ клоно- и неклоногенных клеток в опухоли: под бинокулярным микроскопом подсчитывают число многоклеточных (более 50 клеток) и малоклеточных (менее 50 клеток) колоний (рисунок 1).



**Рисунок 1. — Выделение клоногенных и неклоногенных клеток методом клонирования *in vitro***

Эффективность клонирования клоногенных и неклоногенных опухолевых клеток осуществляют по формуле (1):

$$\text{ЭК}_{\text{кл}} (\text{ЭК}_{\text{нк}}) = (\text{K}_{\text{кол}} / \text{K}_{\text{ек}}) \times 100 \%, \quad (1)$$

где  $\text{ЭК}_{\text{кл}}$  ( $\text{ЭК}_{\text{нк}}$ ) — эффективность клонирования клоногенных (неклоногенных) опухолевых клеток, выраженная в процентах;

$\text{K}_{\text{кол}}$  — количество колоний, выросших на чашке Петри;

$\text{K}_{\text{ек}}$  — количество единичных клеток, посеянных на чашке Петри.

$0 \% \leq \text{ЭК}_{\text{кл}} (\text{ЭК}_{\text{нк}}) \leq 9 \%$  — низкая эффективность клонирования клоногенных (неклоногенных) опухолевых клеток;

$10 \% \leq \text{ЭК}_{\text{кл}} (\text{ЭК}_{\text{нк}}) \leq 49 \%$  — средняя эффективность клонирования клоногенных (неклоногенных) опухолевых клеток;

$50 \% \leq \text{ЭК}_{\text{кл}} (\text{ЭК}_{\text{нк}}) \leq 100 \%$  — высокая эффективность клонирования клоногенных (неклоногенных) опухолевых клеток.

Клоногенную гетерогенность опухоли оценивают по соотношению клоногенных (формирующих многоклеточные колонии более 50 клеток) и неклоногенных (формирующие малоклеточные колонии менее 50 клеток) клеток. Индекс клональной гетерогенности опухоли определяют по формуле (2):

$$\text{И}_{\text{кг}} = (\text{K}_{\text{кл}} / \text{K}_{\text{нк}}) \times 100 \%, \quad (2)$$

где  $\text{И}_{\text{кг}}$  — индекс клональной гетерогенности, соотношение доли клоно- и неклоногенных клеток, выраженное в процентах;

$K_{кл}$  — количество клоногенных клеток, формирующих многоклеточные колонии (более 50 клеток) на чашке Петри;

$K_{нк}$  — количество неклоногенных клеток, формирующих малоклеточные (абортивные) колонии (менее 50 клеток) на чашке Петри.

$0 \% \leq I_{кг} \leq 9 \%$  — низкая степень клоногенности опухолевых клеток;

$10 \% \leq I_{кг} \leq 49 \%$  — средняя степень клоногенности опухолевых клеток;

$50 \% \leq I_{кг} \leq 100 \%$  — высокая степень клоногенности опухолевых клеток.

Выделяют группы благоприятного, стандартного и высокого риска рецидива злокачественного новообразования головного мозга (рисунок 2):

1) группу благоприятного риска составляют лица с опухолями головного мозга при низкой эффективности клонирования клоногенных клеток ( $0 \% \leq \mathcal{E}K_{кл} (\mathcal{E}K_{нк}) \leq 9 \%$ ) и низком индексе клональной гетерогенности опухоли ( $0 \% \leq I_{кг} \leq 9 \%$ );

2) группа стандартного риска — это пациенты с опухолями головного мозга, у которых выявлена средняя эффективность клонирования опухолевых клеток ( $10 \% \leq \mathcal{E}K_{кл} (\mathcal{E}K_{нк}) \leq 49 \%$ ) и средний индекс клональной гетерогенности опухоли ( $10 \% \leq I_{кг} \leq 49 \%$ );

3) в группу высокого риска включают пациентов с опухолями головного мозга, у которых высокая эффективность клонирования опухолевых клеток ( $50 \% \leq \mathcal{E}K_{кл} (\mathcal{E}K_{нк}) \leq 100 \%$ ) и высокий индекс клональной гетерогенности опухоли ( $50 \% \leq I_{кг} \leq 100 \%$  и более).



**Рисунок 2. — Определение группы риска по значениям индекса клональной гетерогенности опухоли и эффективности клонирования клоногенных клеток**

В случае расхождения показателей индекса клональной гетерогенности и эффективности клонирования опухолевых клеток для определения группы риска рецидива злокачественного новообразования основополагающим является показатель индекса клональной гетерогенности опухоли —  $I_{кг}$ .

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

Выполнение метода определения клональной гетерогенности опухоли не требует специальных мер предосторожности.

### **Возможные ошибки и осложнения:**

1. Нарушение асептических условий при заборе послеоперационного материала, выделении и клонировании опухолевых клеток в условиях *in vitro*.
2. Нарушение правил приготовления и хранения реагентов.
3. Недостаточное количество клеток, выделенных из ткани опухоли.
4. Низкая эффективность клонирования клеток.
5. Нарушения в работе медицинских изделий.