

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**



УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
Е.Л. Богдан  
28.12.2021  
2021 г.  
Регистрационный № 191.2–1220

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ  
РАКОВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ  
У ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ  
НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:** государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

**АВТОРЫ:** канд. биол. наук Дмитрук О.Г., Абашкин В.М., канд. мед. наук, доц. Гончаров А.Е., д-р. мед. наук, проф. Прохоров А.В., канд. мед. наук Тур Г.Е., д-р биол. наук, доц. Щербин Д.Г., канд. мед. наук, доц. Колобухов А.Э.

Минск, 2020

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения содержания циркулирующих раковых стволовых клеток (цРСК) периферической крови, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на прогнозирование исхода злокачественных новообразований эпителиального происхождения.

**Инструкция** предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам в амбулаторных и (или) стационарных условиях, и (или) условиях дневного стационара.

### **1 Показания к применению**

Злокачественное новообразование эпителиального происхождения.

### **2 Перечень необходимых медицинских изделий**

#### **2.1 Медицинская техника:**

1. проточный цитофлуориметр (минимум 5 каналов флуоресценции);
2. автоматические дозаторы;
3. центрифуга низкоскоростная;
4. шейкер орбитальный.

#### **2.2 Изделия медицинского назначения:**

1. наконечники пластиковые;
2. пробирки для цитофлуориметра;
3. вакутайнеры с ЭДТА;
4. пробирки полипропиленовые;
5. фильтр с диаметром пор 70 мкм для удаления клеточных агрегатов;
6. емкости для хранения и дезинфекции отработанного биологического материала;
7. лизирующий раствор на основе хлорида аммония;
8. фосфатный буферный раствор;

9. моноклональные антитела к CD24, CD44, CD45 и CD326, конъюгированные с флуорохромами;
10. интеркалирующий краситель (зонд) для идентификации мёртвых клеток – 7-AAD.

### **2.3 Средства индивидуальной защиты и дезинфектанты:**

1. лабораторный халат;
2. латексные или нитриловые перчатки;
3. дезинфицирующие растворы для инактивации биологического материала.

## **3 Технология использования метода**

### **3.1 Взятие биологического материала**

Взятие крови общим объемом 10 мл проводят утром натощак из локтевой вены в вакутайнеры с ЭДТА. Закрытые вакутайнеры с кровью несколько раз переворачивают для смешивания крови с антикоагулянтом.

### **3.2. Правила транспортировки и хранения материала**

Кровь транспортируют и хранят до использования не более 12 часов при температуре от +4 до +25°C.

### **3.3 Пробоподготовка**

Готовят 2 пробирки объемом 50 мл, содержащие 45 мл лизирующего раствора. В каждую пробирку вносят 5 мл образца крови, тщательно перемешивают содержимое пробирки. Инкубируют пробирки на протяжении 15 минут при комнатной температуре, затем осаждают клетки центрифугированием. Отбирают супернатант пипетированием, клетки ресуспендируют в 30 мл фосфатного буферного раствора, после чего суспензию пропускают через фильтр с диаметром пор 70 мкм. Осаждают клетки центрифугированием, удаляют супернатант, суспензию клеток со всех пробирок ресуспендируют в 0,5 мл фосфатного буферного раствора. Добавляют к клеткам моноклональные антитела, а также зонд для

идентификации мертвых клеток, инкубируют в течение 15 минут при температуре от +2 до +8°C в темноте. Клетки отмывают от антител и зондов и ресуспендируют в 3 мл в фосфатном буфере.

### 3.4 Учет и анализ данных

В процессе учета и анализа событий выполняют последовательное гейтирование одиночных клеток, жизнеспособных клеток, построение цитограммы в координатах CD45\CD326, выделение региона CD326<sup>hi</sup>CD45<sup>-</sup> событий. цРСК определяют как CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>CD326<sup>hi</sup>CD45<sup>-</sup> события. Рассчитывают содержание цРСК среди всех жизнеспособных ядродержащих клеток периферической крови и количество цРСК на 1 мл крови.

#### 4 Противопоказания к применению

Отсутствуют.

#### 5 Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

В таблице представлены проблемы и методические ошибки, которые могут возникнуть при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения (таблица).

Таблица – Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Чрезмерные потери клеток	Недостаточное время центрифугирования	Соблюдать время центрифугирования
	Некорректное удаление супернатанта	Правильно удалять супернатант
Недостаточный лизис эритроцитов	Неправильно приготовленный раствор	Правильно готовить и хранить раствор
	Некорректный температурный режим	Лизис при комнатной температуре
	Недостаточное перемешивание	Двухкратное перемешивание на шейкере