

# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц

29.11.2013

Регистрационный № 144-1113

## **МЕТОД ИНДИВИДУАЛИЗИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ БЕТА- АДРЕНОБЛОКАТОРАМИ ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ**

инструкция по применению

Учреждения-разработчики:

ГУ «Республиканский научно-практический центр «Кардиология»

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Авторы:

Канд. мед. наук С.М. Комиссарова, канд. биол. наук Н.Н. Чакова,

канд. биол. наук Э.В. Крупнова, канд. биол. наук Е.П. Михаленко,

С.С. Ниязова, Н.В. Чеботарева

Минск 2013

Инструкция по применению (далее – инструкция) предназначена для врачей-кардиологов и врачей-терапевтов, а также для врачей лабораторной диагностики учреждений здравоохранения при выборе лечебной тактики пациентам с гипертрофической кардиомиопатией (ГКМП).

Применение метода, излагаемого в данной инструкции, позволит повысить эффективность лечения пациентов с ГКМП за счет индивидуализированного подхода к назначению  $\beta$ -адреноблокаторов (БАБ) (бисопролол) с учетом полиморфизма гена (*ADRB1*), кодирующего  $\beta$ 1-адренорецепторы, и выявить группу пациентов, у которых терапия бисопрололом будет наиболее оптимальна.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И МАТЕРИАЛОВ**

- эхокардиограф с возможностью выполнять исследования в режимах одномерного (МЭхоКГ), двухмерного (ВЭхоКГ), импульсного и непрерывного доплеровского;
- электрокардиограф;
- аппарат для проведения суточного мониторинга ЭКГ с анализом нарушений сердечного ритма, ишемических изменений миокарда, скорректированного интервала QT, дисперсии интервала QT, суточной и пятиминутной вариабельности сердечного ритма;
- велоэргометрический комплекс или тредмил для проведения нагрузочной пробы, при наличии портативного эхокардиографического аппарата – проведение нагрузочной стресс-эхокардиографии;
- оборудование для генетических исследований: термостат, морозильная камера на  $-20^{\circ}\text{C}$ , медицинская центрифуга, спектрофотометр, амплификатор (термоциклер), камера для горизонтального электрофореза, трансиллюминатор, автоматические пипетки переменного объема;
- материалы для проведения генетических исследований: Tris HCl, NaCl,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , HCl, конц., NaOH, Triton X-100,  $\text{MgCl}_2$ , сахароза, раствор SDS, протеиназа K, смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт, хлороформ, этиловый спирт, деионизированная вода, Quick-Load Taq 2X Master Mix, праймеры, рестриктазы, агароза, борная кислота, бромистый этидий, краситель для нанесения продукта на гель;
- назначаемые лекарственные средства (ЛС):  $\beta$ -адреноблокатор (бисопролол) в таблетках, покрытых оболочкой 5 мг или 10 мг;
- препараты базовой терапии: антиагреганты, по показаниям – статины, спиронолактон, диуретики;
- Миннесотский опросник «Качества жизни больных с сердечной недостаточностью».

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Гипертрофическая кардиомиопатия, установленная согласно критериям Международного комитета экспертов по ГКМП (2003 г.).

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Гипертрофическая кардиомиопатия с наличием атриовентрикулярной или синоатриальной блокады II-III степени или с синдромом слабости синусового узла или с выраженной брадикардией с частотой сердечных сокращений менее 50 ударов в минуту.

## **ТЕХНОЛОГИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА**

В инструкции предлагается метод индивидуализации лечения  $\beta$ -адреноблокаторами на основе оценки клинических и гемодинамических проявлений заболевания, а также генетических особенностей  $\beta$ -адренорецептора пациента.

Назначение  $\beta$ -адреноблокатора (бисопролол) проводится путем медленного титрования дозы ЛС с интервалом 7-10 дней между последующими дозами 1,25 – 2,5 – 5 – 7,5 – 10 мг/сут с учетом частоты сердечных сокращений (ЧСС), уровня артериального давления (АД) и клинической симптоматики (одышка, кардиалгия, сердцебиения). Критериями остановки повышения дозы являются: урежение ЧСС менее 55 ударов в минуту и снижение систолического артериального давления (САД) менее 90 мм рт.ст. При появлении побочных реакций в ходе титрования дозы (урежение ЧСС менее 60 ударов в минуту, появление атриовентрикулярных и синоатриальных блокады I степени, гипотензии), «оттитрованная» доза бисопролола должна быть в 2-4 раза ниже среднетерапевтической (например, 1,25 мг/сут). В ходе лечения проводят оценку эффективности проводимой терапии.

### **Клинические критерии эффективности терапии**

Критериями эффективности проводимой терапии являются:

1. Улучшение клинических показателей: уменьшение одышки, кардиалгии и сердцебиений; отсутствие синкопальных и пресинкопальных состояний.
2. Снижение уровня САД и ДАД на 10-15% от исходного.
3. По результатам эхокардиографического исследования уменьшение показателей гипертрофии левого желудочка (ЛЖ); нормализация диастолической дисфункции или ее улучшение, снижение градиента давления в выносящем тракте ЛЖ (ГД ВТЛЖ).
4. По результатам суточного мониторирования ЭКГ: урежение ЧСС в покое до 60-50 уд./мин. уменьшение числа суправентрикулярных и желудочковых аритмий, пароксизмов фибрилляции предсердий, уменьшение количества и продолжительности эпизодов депрессии сегмента ST, нормализация вегетосимпатического баланса по данным вариабельности сердечного ритма.
5. Отсутствие побочных явлений, обусловленных развитием брадикардии – одышки, общей слабости, головокружений при физической нагрузке.

6. Улучшение качества жизни, оцениваемого методом анкетирования по шкале периодичности и выраженности клинической симптоматики.

В дополнение к клинико-гемодинамической оценке проявлений заболевания пациентам с ГКМП проводится молекулярно-генетический анализ полиморфизмов *A145G (Ser49Gly)* и *C1165G (Arg389Gly)* в гене *ADRB1* с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) после выделения ДНК из цельной периферической крови и устанавливается генотип *ADRB1*.

#### **Молекулярно-генетические критерии эффективности терапии**

При выявлении носителей гомозиготных полиморфизмов *Arg389Arg* и *Ser49Ser* гена *ADRB1*, у которых наблюдается благоприятный терапевтический эффект, ЛС назначается на более длительный срок (пожизненно).

При выявлении носителей других генотипов (*Ser49Gly*, *Gly49Gly*, *Arg389Gly*, *Gly389Gly*), у которых наблюдается недостаточный терапевтический эффект, необходимо либо отказаться от назначения данного ЛС и подключить другие, более эффективно воздействующие на прогрессирование симптомов заболевания, либо продолжать лечение в минимальных дозах (а не среднетерапевтических) с более тщательным контролем клинико-гемодинамических показателей в ходе лечения. При отсутствии эффекта от лечения данным ЛС (бисопролол) назначают другие ЛС из группы  $\beta$ -адреноблокаторов (например, метопролол или бетаксолол).

#### **Пошаговое описание проведения анализа генетического полиморфизма $\beta$ 1-адренорецепторов**

Для определения генетического полиморфизма  $\beta$ 1-адренорецепторов у пациентов с ГКМП предлагаются следующие методы молекулярно-генетического анализа:

- метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для накопления фрагмента гена *ADRB1*;
- метод анализа полиморфизма длин рестриктных фрагментов (ПДРФ-анализ) для обнаружения замены одного нуклеотида на другой в последовательности ДНК гена *ADRB1*.

Определение полиморфизма гена *ADRB1* с использованием ПЦР-ПДРФ анализа включает четыре этапа:

- Выделение ДНК из цельной периферической крови.
- ПЦР для амплификации *ADRB1*.
- Рестрикция амплифицированного фрагмента.
- Визуализация продуктов амплификации (электрофорез) и интерпретация результатов.

I. Выделение тотальной ДНК из цельной периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции.

1. Образцы крови смешать с охлажденным лизирующим буфером для эритроцитов (109,4 г сахарозы, 25 мл 0,2 М  $MgCl_2$ , 10 мл трито на X-100, 1М трис-НСl рН 7,6).
2. Центрифугировать в течение 20 мин при скорости 4000 об/мин при температуре  $+4^{\circ}C$ .
3. Слить супернатант, пробирку осторожно (чтобы не потерять осадок) перевернуть на салфетку для полного удаления жидкости.
4. Добавить к осадку 400 мкл охлажденного лизирующего буфера, разбить осадок, снова добавить 10 мл лизирующего буфера, перемешать.
5. Центрифугировать повторно 10 мин на скорости 4000 об/мин. при температуре  $+4^{\circ}C$ .
6. Супернатант слить, пробирку осторожно (чтобы не потерять осадок) перевернуть на салфетку для полного удаления жидкости.
7. Суспензировать осадок в 400 мкл буфера для протеиназы К (25 мМ EDTA рН=8; 75 мМ NaCl).
8. Перенести осадок с буфером в эппендорф, добавить 40 мкл 10% SDS и 20 мкл протеиназы К в концентрации 10 мг/мл.
9. Тщательно перемешать на вортексе.
10. Инкубировать при  $+37^{\circ}C$  в течение 12-24 часов.
11. К раствору добавить 500 мкл фенол-хлороформ-изоамиловый спирт, перемешивать 5 мин.
12. Центрифугировать 10 мин при 12000 об/мин.
13. Перенести верхнюю водную фазу в новую пробирку, добавить 500 мкл фенол-хлороформ-изоамиловый спирт, перемешивать 5 мин.
14. Центрифугировать 8 мин при 12000 об/мин.
15. Перенести верхнюю водную фазу в новую пробирку, добавить 500 мкл фенол-хлороформ-изоамиловый спирт, перемешивать 5 мин.
16. Центрифугировать 6 мин при 12000 об/мин.
17. Перенести верхнюю водную фазу в новую пробирку, добавить 40мкл NaCl и 1 мл холодного 96% спирта, осторожно перемешать до появления осадка.
18. Центрифугировать 10 мин при 12000 об/мин. Осторожно удалить спирт.
19. К осадку добавить 70% спирт, сбить осадок от стенки покачиванием (50 раз).
20. Центрифугировать 2 мин при 12000 об/мин.
21. Осторожно удалить спирт.
22. К осадку добавить 80% спирт, сбить осадок от стенки покачиванием.
23. Центрифугировать 2 мин при 12000 об/мин.
24. Осторожно удалить спирт.
25. К осадку добавить 96% спирт, сбить осадок от стенки покачиванием.
26. Центрифугировать 2 мин при 12000 об/мин.
27. Осторожно удалить спирт.

28. Осадок сушить при комнатной температуре 30-60 мин.
29. Растворить осадок в 100-400мкл деионизированной воды.
30. Измерить кол-во ДНК на спектрофотометре.

Рекомендуемое количество ДНК для проведения полимеразной цепной реакции генов *ADRB1* – не более 100 мкг/мл.

## II. Проведение ПЦР (амплификации) и рестрикции

А) Проведение амплификации фрагмента гена *ADRB1* с полиморфизмом *A145G (Ser49Gly)* и его рестрикция.

Последовательность праймеров, необходимых для проведения ПЦР, указана в таблице 2.

Таблица 2. Последовательность праймеров и характеристика аллелей анализируемых полиморфизмов

Полиморфизм	Последовательность праймеров	Размер продукта	Эндонуклеаза	Длина рестриктных фрагментов
<i>A145G (Ser49Gly)</i>	<i>F: 5'ccgggcttctgggggtgtcc 3'</i> <i>R: 5'ggcgaggtgatggcgaggtagc 3'</i>	564п.н.	<i>Eco0109I</i>	564 (аллель <i>A</i> ) 345+219 (аллель <i>G</i> )
<i>C1165G (Arg389Gly)</i>	<i>F: 5'ccgcctcttcgtcttctcaactg 3'</i> <i>R: 5'tgggcttcgagttcacctgctatc 3'</i>	462п.н.	<i>BsmFI</i>	462 (аллель <i>C</i> ) 351+111(аллель <i>G</i> )

Для детекции полиморфизма *A145G (Ser49Gly)* гена *ADRB1* осуществляется ПЦР (амплификация) с последующей рестрикцией эндонуклеазой *Eco0109I*.

1. Приготовить реакционную смесь в эппендорфе в количестве, соответствующем числу исследуемых образцов, для амплификации фрагмента гена *ADRB1*:

- a. 0,25 мкМ прямого и обратного праймеров.
- b. 1x «Quick-Load Taq 2x Master Mix»

2. Разлить реакционную смесь в ПЦР-пробирки по 14 мкл.

3. В каждую ПЦР-пробирку (0,2 мкл) с реакционной смесью добавить ДНК в количестве 50 нг (1 мкл).

4. Поместить ПЦР-пробирки в термоциклер для проведения амплификации по следующему протоколу:

1-й шаг – 1 цикл (94° – 2')

2-й шаг – 35 циклов (94° – 1', 63° – 1', 72° – 1')

3-й шаг – 1 цикл (72° – 4')

4-й шаг – (4° – ∞)

5. Достать ПЦР-пробирки из амплификатора и добавить эндонуклеазу *Eco0109I*. Рестрикцию проводить согласно инструкции фирмы-производителя.

Б) Проведение амплификации фрагмента гена *ADRB1* с полиморфизмом *C1165G (Arg389Gly)* и его рестрикция.

Для детекции полиморфизма *C1165G (Arg389Gly)* гена *ADRB1* осуществляется ПЦР (амплификация) с последующей рестрикцией эндонуклеазой *BsmFI*.

Последовательность праймеров, необходимых для проведения ПЦР, указана в таблице 2.

1. Приготовить реакционную смесь в эппендорфе в количестве, соответствующем числу исследуемых образцов, для амплификации фрагмента гена *ADRB1*:

а. 0,25 мкМ прямого и обратного праймеров.

б. 1x «Quick-Load Taq 2x Master Mix»

2. Разлить реакционную смесь в ПЦР-пробирки по 14 мкл.

3. В каждую ПЦР-пробирку (0,2 мкл) с реакционной смесью добавить ДНК в количестве 50 нг (1 мкл).

4. Поместить ПЦР-пробирки в термоциклер для проведения амплификации по следующему протоколу:

1-й шаг – 1 цикл (94° – 5')

2-й шаг – 35 циклов (94° – 45'', 60° – 45'', 72° – 45')

3-й шаг – 1 цикл (72° – 7')

4-й шаг – (4° – ∞)

5. Достать ПЦР-пробирки из амплификатора и добавить эндонуклеазу *BsmFI*. Рестрикцию проводить согласно инструкции фирмы-производителя.

Ш. Визуализация продуктов амплификации (электрофорез) и интерпретация результатов

Электрофорез продуктов рестрикции гена *ADRB1*:

1. Продукты рестрикции гена *ADRB1* нанести на 1,8% агарозный гель с бромистым этидием.

2. Результаты электрофоретического разделения фрагментов визуализировать в UV-свете.

Интерпретация изображения

Соответствие определенного генотипа варианту рестриктных фрагментов после обработки соответствующими рестриктазами представлены на рисунке 1 и в таблице 3.

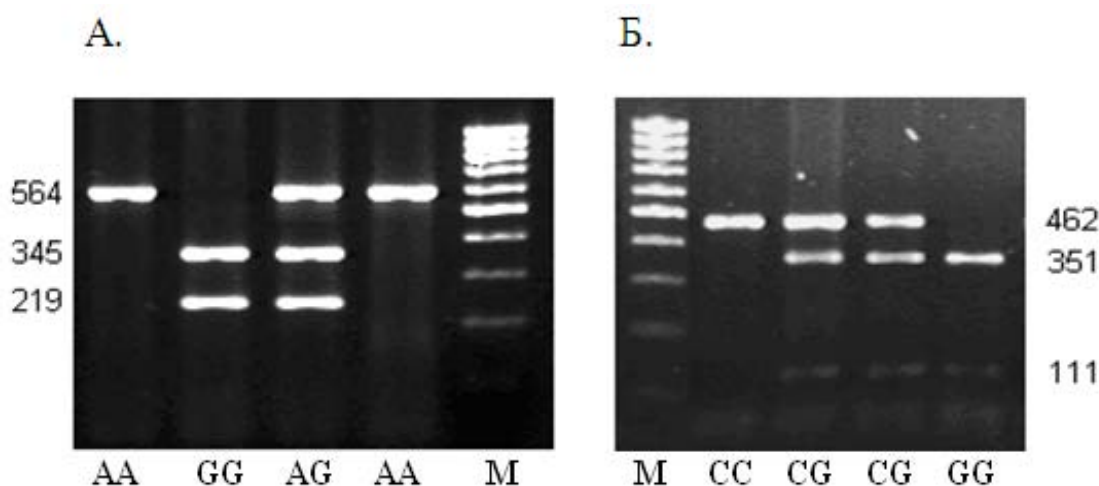


Рисунок 1 – Электрофореграмма фрагментов рестрикции гена  $\beta 1$ -AP:  
 А) электрофореграмма гидролиза эндонуклеазой *Eco0109I*;  
 Б) электрофореграмма гидролиза эндонуклеазой *BsmFI*.

Таблица 3 – Характеристика аллелей гена *ADRB1*

Полиморфизм	<i>A145G (Ser49Gly)</i>			<i>C1165G (Arg389Gly)</i>		
	AA	GG	AG	CC	GG	CG
Длины фрагментов (п.н.)	564	345 219	564 345 219	462	351 111	462 351 111

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

Перечень представлен в таблице 4.

Таблица 4 – Возможные ошибки и затруднения при применении молекулярно-генетических методов

Ошибки	Причины	Пути устранения
Ложноположительные/ложноотрицательные	1. Загрязнение исследуемых образцов инородным биологическим материалом.	Соблюдение принципов зонирования лаборатории для проведения молекулярно-генетических исследований. Использование одноразовой посуды, стерильной расходных материалов и растворов.



	2. Снижение активности рестриктаз.	<p>Отрицательный контроль (пробы, не содержащие ДНК) в каждой серии исследований.</p> <p>Проведение повторного анализа положительных проб.</p> <p>Использование контрольных образцов ДНК (с известной последовательностью нуклеотидов).</p>
--	------------------------------------	---