

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич

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 β -адреноблокаторов (БАБ) (бисопролол) с учетом полиморфизма гена (*ADRB1*), кодирующего β_1 -адренорецепторы, и выявить группу пациентов, у которых терапия бисопрололом будет наиболее оптимальна.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Эхокардиограф с возможностью выполнять исследования в режимах одномерного (МЭхоКГ), двухмерного (ВЭхоКГ), импульсного и непрерывного доплеровского.

2. Электрокардиограф.

3. 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.

4. Велоэргометрический комплекс или тредмил для нагрузочной пробы, при наличии портативного эхокардиографического аппарата — нагрузочной стресс-эхокардиографии.

5. Оборудование для генетических исследований: термостат, морозильная камера на -20°C , медицинская центрифуга, спектрофотометр, амплификатор (термоциклер), камера для горизонтального электрофореза, трансиллюминатор, автоматические пипетки переменного объема.

6. Материалы для проведения генетических исследований: Tris HCl, NaCl, Na_2EDTA , HCl, конц., NaOH, Triton X-100, 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.

7. Назначаемые лекарственные средства (ЛС): β -адреноблокатор (бисопролол) в таблетках, покрытых оболочкой, 5 или 10 мг.

8. Препараты базовой терапии: антиагреганты, по показаниям — статины, спиронолактон, диуретики.

9. Миннесотский опросник «Качества жизни больных с сердечной недостаточностью».

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

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

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

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 уд./мин.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

В инструкции предлагается метод индивидуализации лечения β -адреноблокаторами на основе оценки клинических и гемодинамических проявлений заболевания, а также генетических особенностей β 1-адренорецептора пациента.

Назначение β -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

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 β -адреноблокаторов (например, метопролол или бетаксолол).

Пошаговое описание проведения анализа генетического полиморфизма β 1-адренорецепторов

Для определения генетического полиморфизма β -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.

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 тритона X-100, 1М трис-НСl pH 7,6).

2. Центрифугировать в течение 20 мин при скорости 4000 об/мин при температуре +4°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°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 pH = 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°C в течение 12–24 ч.

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 40 мкл 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 100–400 мкл деионизированной воды.

30. Измерить кол-во ДНК на спектрофотометре.

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

ПЦР (амплификация) и рестрикция

а) амплификация фрагмента гена *ADRB1* с полиморфизмом *A145G (Ser49Gly)* и его рестрикция: последовательность праймеров, необходимых для ПЦР, указана в таблице 1.

Таблица 1 — Последовательность праймеров и характеристика аллелей анализируемых полиморфизмов

Полиморфизм	Последовательность праймеров	Размер продукта	Эндо-нуклеаза	Длина рестриктных фрагментов
<i>A145G (Ser49Gly)</i>	<i>F: 5'ccgggcttctgggggtgtcc 3'</i> <i>R: 5'ggcgaggtgatggcgaggtagc3'</i>	564 п.н.	<i>Eco010 9I</i>	564 (аллель <i>A</i>) 345+219 (аллель <i>G</i>)

<i>C1165G</i> (<i>Arg389Gly</i>)	<i>F: 5'ccgcctcttcgtcttcttcaactg3'</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*:

а. 0,25 мкМ прямого и обратного праймеров.

б. 1х «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) амплификация 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 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. 1х «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.

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.

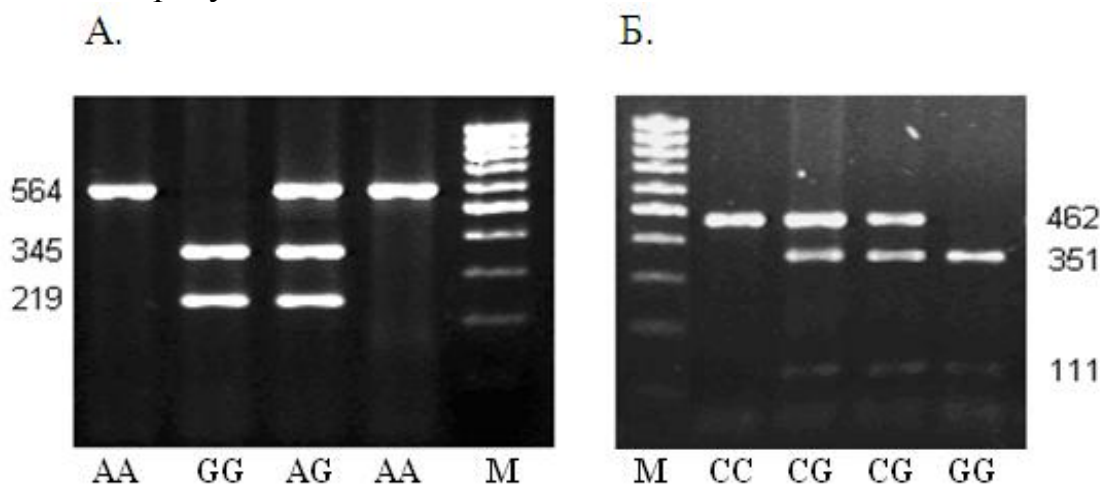


Рисунок 1 — Электрофореграмма фрагментов рестрикции гена $\beta 1$ -АР:
А) электрофореграмма гидролиза эндонуклеазой *Eco0109I*;
Б) электрофореграмма гидролиза эндонуклеазой *BsmFI*.

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

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

	2. Снижение активности рестриктаз	Отрицательный контроль (пробы, не содержащие ДНК) в каждой серии исследований Повторный анализ положительных проб Использование контрольных образцов ДНК (с известной последовательностью нуклеотидов)
--	-----------------------------------	--