

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневиц

29.11.2013

Регистрационный № 143-1113

**МЕТОД ИНДИВИДУАЛИЗИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ
БЛОКАТОРАМИ РЕЦЕПТОРОВ АНГИОТЕНЗИНА II 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, М.Е. Петровская

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 блокаторов рецепторов ангиотензина II (БРА) (лозартан) с учетом полиморфизма генов (*ACE*, *AGTR1*), кодирующих белки РААС, и выявить группу пациентов, у которых терапия лозартаном 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°C , медицинская центрифуга, спектрофотометр, усилитель (термоциклер), камера для горизонтального электрофореза, трансиллюминатор, автоматические пипетки переменного объема;
- 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;
- назначаемые лекарственные средства (ЛС): БРА (лозартан) в таблетках, покрытых оболочкой 50 мг или 100 мг;
- ЛС базовой терапии: β -адреноблокаторы, 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 гипотонии (систолическое АД ниже 110 мм рт.ст).

ТЕХНОЛОГИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА

В инструкции предлагается метод индивидуализации лечения БРА на основе оценки клинических и гемодинамических проявлений заболевания, а также структурных особенностей генов *ACE* и *AGTR1*, кодирующих ангиотензин-превращающий фермент и рецептор ангиотензина II типа 1, соответственно.

Назначение БРА (лозартан) проводится путем медленного титрования дозы ЛС с интервалом 7-10 дней между последующими дозами 25 – 50 – 100 мг/сут с учетом уровня артериального давления (АД) и клинической симптоматики (одышка, синкопальные состояния, кардиалгия). Критериями остановки повышения дозы является: снижение систолического артериального давления (САД) менее 90 мм рт.ст. При появлении побочных реакций в ходе титрования дозы (появление гипотензии, синкопальных или пресинкопальных состояний), «оттитрованная» доза лозартана должна быть в 2 раза ниже среднетерапевтической (например, 25 мг/сут). В ходе проводимого лечения проводят оценку эффективности проводимой терапии.

Клинические критерии эффективности терапии

Критериями эффективности проводимой терапии являются:

1. Улучшение клинических показателей: уменьшение одышки, кардиалгии и частоты аритмий; отсутствие синкопальных и пресинкопальных состояний.
2. Снижение уровня САД и ДАД на 10-15% от исходного.
3. По результатам эхокардиографического исследования уменьшение показателей ГЛЖ: толщины межжелудочковой перегородки (ТМЖП), толщины задней стенки (ТЗС), индекса массы миокарда (ИММ); нормализация диастолической дисфункции или ее улучшение, снижение градиента давления в выносящем тракте ЛЖ (ГД ВТЛЖ).
4. По результатам суточного мониторирования ЭКГ: уменьшение частоты желудочковых аритмий, пароксизмов фибрилляции предсердий, уменьшение скорректированного интервала QT (QTc) и дисперсии интервала QT (QTd), количества и продолжительности эпизодов депрессии сегмента ST, нормализация вегетосимпатического баланса по данным вариабельности сердечного ритма.
5. Отсутствие побочных явлений, обусловленных развитием гипотонии – общей слабости, головокружений, обмороков.
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 *I/D* полиморфизма в гене *ACE* и полиморфизма A1166C в гене *AGTR1* с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) после выделения ДНК из цельной периферической крови, и устанавливаются варианты генотипов *ACE* и *AGTR1*.

Молекулярно-генетические критерии эффективности терапии

Если пациент является носителем комбинации генотипов *AC(AGTR1)/ID(ACE)* или *AA(AGTR1)/DD(ACE)*, у которых БРА особенно эффективны в плане регресса ГЛЖ, показано назначение в составе комплексной терапии БРА (лозартан) на длительный срок.

В случае выявления пациента с комбинацией генотипов *AA(AGTR1)/II(ACE)*, у которого выявляется резистентная к терапии ГЛЖ, необходимо отказаться от назначения данного ЛС и подключить другие ЛС из группы БРА (например, валсартан), которые могут быть более эффективными для данных пациентов.

Пошаговое описание проведения анализа полиморфизмов генов *ACE* и *AGTR1*

Для определения полиморфизма генов *ACE*, *AGTR1* у пациентов с ГКМП предлагаются следующие методы молекулярно-генетического анализа:

- метод инсерционно-делеционного анализа для выявления *I/D* полиморфизма в гене *ACE*;
- метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для накопления фрагментов гена *AGTR1*;
- метод анализа полиморфизма длин рестриктных фрагментов (ПДРФ-анализ) для обнаружения замены одного нуклеотида на другой в последовательности ДНК гена *AGTR1*.

Определение полиморфизма гена *ACE* с помощью метода инсерционно-делеционного анализа включает три этапа:

- Выделение ДНК из цельной крови.
- ПЦР для амплификации *ACE*.
- Визуализация продуктов амплификации (электрофорез) и интерпретация результатов.

Определение полиморфизма гена *AGTR1* с использованием ПЦР-ПДРФ анализа включает четыре этапа:

- Выделение ДНК из цельной крови.
- ПЦР для амплификации фрагмента гена *AGTR1*.
- Рестрикция амплифицированного фрагмента.
- Визуализация продуктов рестрикции (электрофорез) и интерпретация результатов.

I. Выделение тотальной ДНК из цельной 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- HCl pH 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 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 $+37^{\circ}C$ 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 количество ДНК на спектрофотометре.

Рекомендуемое количество ДНК для проведения полимеразной цепной реакции генов *ACE* и *AGTR1* – не более 100 мкг/мл.

II. Проведение ПЦР (амплификации) и рестрикции

А) Проведение амплификации фрагмента гена *ACE* (для детекции *I/D* полиморфизма).

Последовательность праймеров, необходимых для проведения ПЦР, указана в таблице 1.

Таблица 1. Последовательность праймеров и характеристика аллелей анализируемых полиморфизмов

Ген	Последовательность праймеров	Длина фрагментов, п.н.
<i>ACE</i>	<i>F</i> : 5`ctggagaccactcccatccttct3`	487 (аллель <i>I</i>)
	<i>R</i> : 5`gatgtggccatcacattcgtcagat3`	200 (аллель <i>D</i>)

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

а. 0,15 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 100 мкг (1 мкл).

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

1-й шаг – 1 цикл (94° – 4')

2-й шаг – 30 циклов (94° – 30'', 58° – 35'', 72° – 1')

3-й шаг – 1 цикл (72° – 7')

4-й шаг – (4° – ∞)

Б) Проведение амплификации фрагмента гена *AGTR1* с полиморфизмом *A1166C* и его рестрикция.

Для детекции полиморфизма *A1166C* гена *AGTR1* осуществляется ПЦР (амплификация) с последующей рестрикцией эндонуклеазой *DdeI*.

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

Таблица 2. Последовательность праймеров

Ген	Последовательность праймеров	Размер продукта
<i>AGTR1</i>	<i>F: 5`tccccaaaagccaatcccac3`</i> <i>R: 5`caggctaggagattgcatttctgtcag3`</i>	428 п.н.

1. Приготовить реакционную смесь в эппендорфе в количестве, соответствующем числу исследуемых образцов, для амплификации фрагмента гена *AGTR1*:

- a. 0,15 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 100 мкг (1 мкл).

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

1-й шаг – 1 цикл (94° – 7')

2-й шаг – 35 циклов (94° – 40'', 64° – 60'', 72° – 1')

3-й шаг – 1 цикл (72° – 5')

4-й шаг – (4° – ∞)

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

III. Визуализация продуктов амплификации (электрофорез) и интерпретация результатов

Электрофорез фрагмента гена *ACE*

1. Продукты амплификации гена *ACE* нанести на 1,5% агарозный гель с бромистым этидием.

2. Результаты электрофоретического разделения фрагментов визуализировать в UV-свете (рисунок 1).

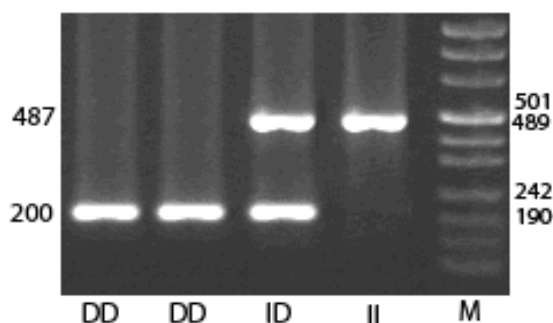


Рисунок 1 – Электрофореграмма фрагментов амплификации гена *ACE* (слева указаны размеры фрагментов амплификации (п.н.), справа – маркер длин фрагментов (п.н.), снизу – генотипы)

Интерпретация изображения

Пациент является:

- гомозиготным носителем инсерции (*II*) при наличии одного фрагмента амплификации размером 487 п.н.
- гомозиготным носителем делеции (*DD*) при наличии одного фрагмента амплификации размером 200 п.н.
- носителем гетерозиготного генотипа *ID* при наличии двух фрагментов гена *ACE* размером 487 и 200 п.н.

Электрофорез фрагмента рестрикции гена *AGTR1*

1. Продукты рестрикции гена *AGTR1* эндонуклеазой *DdeI* нанести на 1,5% агарозный гель с бромистым этидием.

2. Результаты электрофоретического разделения фрагментов визуализировать в UV-свете (рисунок 2).

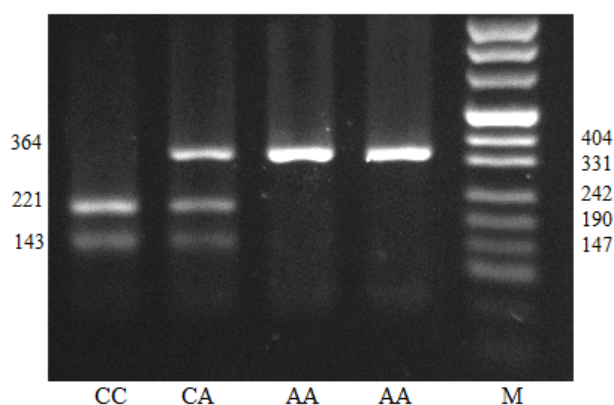


Рисунок 2. Электрофореграмма фрагментов рестрикции гена *AGTR1* (слева указаны размеры фрагментов рестрикции (п.н.), справа – маркер длин фрагментов (п.н.), снизу – генотипы)

Интерпретация изображения

Соответствие определенного генотипа варианту рестриктных фрагментов после обработки рестриктазой *DdeI* представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Идентификация генотипов *AGTR1* по длине рестриктных фрагментов

Генотип	Длина рестриктных фрагментов, п.н.
AA	364+64
AC	364+221+143+64
CC	221+143+64

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	<p>1. Загрязнение исследуемых образцов инородным биологическим материалом.</p> <p>2. Снижение активности рестриктаз.</p>	<p>Соблюдение принципов зонирования лаборатории для проведения молекулярно-генетических исследований.</p> <p>Использование стерильной одноразовой посуды, расходных материалов и растворов.</p> <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>