

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
Ю.Л. Горбич  
« 13 » 12 2024 г.  
Регистрационный № 056-0724



**МЕТОД ОЦЕНКИ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ  
ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ  
У ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ  
НОВООБРАЗОВАНИЯМИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования  
«Гродненский государственный медицинский университет», учреждение  
образования «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: Карпуть И.А., д.м.н., профессор, член-корр. НАН Беларуси  
Снежицкий В.А., канд. хим. наук, доцент Бабенко А.С., к.м.н.,  
доцент Курбат М.Н., к.м.н., доцент Горустович О.А.

Гродно, 2025

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод оценки вероятности развития дилатационной кардиомиопатии у пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы.

Метод предназначен для врачей онкологов-хирургов, врачей-онкологов, врачей-кардиологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам со злокачественными новообразованиями молочной железы в условиях медицинского стационара, и/или в амбулаторных условиях, и/или в условиях отделения дневного пребывания.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Злокачественное новообразование молочной железы (C50), пациенты групп среднего и низкого риска (HFA-ICOS).

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Злокачественное новообразование молочной железы (C50), пациенты групп высокого и очень высокого риска (HFA-ICOS).

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ**

1. Лабораторное оборудование и материалы:
  - 1.1. ПЦР-бокс;
  - 1.2. микроцентрифуга-вортекс не менее 500 × g;
  - 1.3. высокоскоростная центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл и 2,0 мл не менее 8000 × g;
  - 1.4. автоматический ДНК-анализатор;
  - 1.5. камера для горизонтального электрофореза;
  - 1.6. СВЧ-печь бытовая;
  - 1.7. трансиллюминатор или система документирования гелей;
  - 1.8. программируемый термоциклер для проведения ПЦР/ПЦР-РВ в комплекте с компьютером и программным обеспечением для управления прибором, хранения данных и анализа;
  - 1.9. твердотельный термостат для микропробирок вместимостью 1,5 мл и 2,0 мл с функцией охлаждения и нагрева (минус 10 °С ... +100 °С);
  - 1.10. холодильник бытовой +2...+8 °С с морозильной камерой минус 12...минус 22 °С;
  - 1.11. дозаторы переменного объема (0,5–10; 5–50; 20–200; 100– 1000 мкл);

- 1.12. штатив для пробирок вместимостью 0,2 мл;
  - 1.13. штатив для пробирок вместимостью 1,5 мл и 2,0 мл;
  - 1.14. емкость для сброса использованных наконечников;
  - 1.15. пробирки для взятия образцов крови, содержащие этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), фиолетовый цветовой код, предназначенные для взятия 2-5 мл крови или тампон-зонды для взятия буккального эпителия;
  - 1.16. пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл с оптическими крышками;
  - 1.17. пробирки вместимостью 1,5 и 2,0 мл;
  - 1.18. наконечники с фильтрами вместимостью до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл;
  - 1.19. неопудренные перчатки.
2. Наборы и реактивы:
    - 2.1. набор для выделения геномной ДНК;
    - 2.2. набор для проведения ПЦР;
    - 2.3. набор для проведения ПЦР-РВ;
    - 2.4. набор для очистки ДНК из агарозного геля;
    - 2.5. набор для секвенирования;
    - 2.6. агароза для электрофореза;
    - 2.7. буферный раствор для переноса продуктов ПЦР в агарозный гель;
    - 2.8. вода для молекулярной биологии (свободная от РНКаз/ДНКаз), вода для ПЦР;
    - 2.9. ДНК-маркер молекулярного веса 100-1000 пар оснований;
    - 2.10. изопропиловый спирт;
    - 2.11. трис-ацетатный буферный раствор для агарозного геле-электрофореза, рН 8,5;
    - 2.12. этиловый спирт ректифицированный.
    - 2.13. синтетические олигонуклеотиды в лиофилизированном виде, последовательности представлены в таблице 1.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА**

**Выполняется дважды: до и после окончания лечения доксорубицином.**

Этап 1 – провести трансторакальную эхокардиографию (далее ЭхоКГ) миокарда до начала химиотерапии доксорубицином с измерением GLS, % левого желудочка сердца.

Этап 2 – провести трансторакальную ЭхоКГ миокарда после окончания всех курсов химиотерапии доксорубицином (в течение трех недель) с измерением GLS, % левого желудочка сердца. Оценить

изменение GLS, %, до и после окончания химиотерапии доксорубицином. Если относительное снижение GLS составляет более 12%, то вероятность развития дилатационной кардиомиопатии – высокая. Если относительное снижение GLS составляет менее 12%, то вероятность развития дилатационной кардиомиопатии – низкая.

**Выполняется однократно до начала лечения доксорубицином.**

Все этапы работы – выделение ДНК из образцов биологического материала и проведение ПЦР-РВ, проводятся в отдельных помещениях согласно правилам организации ПЦР-лаборатории – инструкция по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13 ноября 2008 г. № 090-1008 «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)».

Взятие биологического материала проводится в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 10.11.2015 № 1123 «Об утверждении Инструкции о порядке организации преаналитического этапа лабораторных исследований». При работе с образцами биологического материала необходимо соблюдать меры безопасности как при работе с потенциально инфицированным материалом. Взятие крови осуществляется в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт (ЭДТА). Взятие буккального эпителия осуществляется тампон-зондами.

Технология применения метода включает три этапа:

Этап 3 – выделение геномной ДНК из биологического материала (цельная кровь или буккальный эпителий). Выделение геномной ДНК осуществляется согласно инструкции производителя набора реагентов. Допускается хранение полученных образцов ДНК при температуре +2...+8 °С в течение 30 суток. Для длительного хранения (более 30 суток) допускается использование бытовых морозильных камер минус 12...минус 20°С.

Этап 4 – определение генотипа rs2232228 (ген *HAS3*), rs1056892 (ген *CBR3*), rs1695 (ген *GSTP1*), rs243865 (ген *MMP-2*), rs35068180 (ген *MMP-3*). Проводится посредством молекулярно-генетического исследования образцов ДНК.

Каждый образец ДНК пациентов анализируют методом аллельной дискриминации однонуклеотидных замен с использованием ПЦР-РВ или секвенированием по методу Сэнгера.

Для определения генотипов rs2232228 (ген *HAS3*), rs1056892 (ген *CBR3*), rs1695 (ген *GSTP1*), rs35068180 (ген *MMP-3*), используют олигонуклеотиды приведенные в таблице 1.

Таблица 1 – Олигонуклеотидные последовательности праймеров и зондов, используемые для генотипирования rs2232228 (ген *HAS3*), rs1056892 (ген *CBR3*), rs1695 (ген *GSTP1*), rs35068180 (ген *MMP-3*)

Код	Последовательность	Мод.5'	Мод.3'
rs2228_F	TCGGTGGCACTGTGCAT		
rs2228_R	TGAGGTCAGGGAAGGAGATG		
rs2228_Ref	TGCCGCATACCAGGAGGACC	FAM	BHQ1
rs2228_Alt	TGCCCGGTACCAGGAGGAC	HEX	BHQ1
rs6892_F	GACAGACATGGATGGGAAAGA		
rs6892_R	GCAAGAGGGCCAAGTAGACA		
rs6892_Ref	AGCATCAGGACTGTGGAGGAG	FAM	BHQ1
rs6892_Alt	GACAGCATCAGGACTATGGAGGAG	HEX	BHQ1
rs1695_F	TGGTGGACATGGTGAATGAC		
rs1695_R	TGCAGATGCTCACATAGTTGG		
rs1695_Ref	GCTGCAAATACATCTCCCTCATCTACA	FAM	BHQ1
rs1695_Alt	GCTGCAAATACGTCTCCCTCATCTAC	HEX	BHQ1
rs8180_F	АСТАГАТТСТАТГГТТСТССТАТТССТТГА		
rs8180_R	ТСААТГТГГССАААТАТТТСССТГТА		
rs8180_Ref	A[LNA+C][LNA+A][LNA+T][LNA+G][LNA+G]TTTTTCCCC	FAM	BHQ1
rs8180_Alt	A[LNA+C][LNA+A][LNA+T][LNA+G][LNA+G]TTTTTTCCC C	HEX	BHQ1

Олигонуклеотиды должны поставляться в лиофилизированном виде в защищенной от света упаковке. Каждый олигонуклеотид и зонд растворяют отдельно в воде для ПЦР до конечной концентрации 100 пикомоль/мкл.

Генотипирование rs2232228 (ген *HAS3*), rs1056892 (ген *CBR3*), rs1695 (ген *GSTP1*), rs35068180 (ген *MMP-3*) проводят методом ПЦР-РВ с использованием готовой смеси для ПЦР-РВ или отдельных компонентов с соблюдением следующих требований: конечный объем реакционной смеси (в пробирке), включающей все компоненты для проведения ПЦР-РВ, а также ДНК-матрицу – 25 мкл; концентрация ионов магния в реакционной смеси 2 мМ (2 миллимоль/литр); концентрация дНТФ (дезоксинуклеотидтрифосфатов) в реакционной смеси 0,2 мМ (миллимоль/литр) каждого (дА, дТ, дЦ и дГ); количество термостабильной Таq ДНК-полимеразы 1,25 единицы активности (1,25 ед.); количество ДНК-

матрицы 50-500 нг; количество каждого олигонуклеотида, включая зонды для ПЦР-РВ, 10 пикомоль (концентрация 400 наномоль/литр). При использовании растворов олигонуклеотидов с концентрацией 100 пикомоль/мкл требуется использовать 0,1 мкл раствора каждого олигонуклеотида. Рекомендуется готовить общую смесь всех 4 олигонуклеотидов и вносить по 0,4 мкл такого раствора для проведения единичного исследования (реакции).

Пример составления протокола постановки анализа методом ПЦР-РВ приводится в таблицах 2 и 3 с использованием готовой смеси для ПЦР-РВ и отдельных компонентов для проведения ПЦР-РВ соответственно.

Таблица 2 – Протокол постановки ПЦР-РВ с использованием готовой смеси

№	Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
1	Вода для ПЦР	7,1
2	Готовая смесь для проведения ПЦР-РВ	12,5
3	Смесь олигонуклеотидов	0,4
4	ДНК-матрица	5

Таблица 3 – Протокол постановки ПЦР-РВ с использованием отдельных компонентов

№	Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
1	Вода для ПЦР	15,6
2	Раствор хлорида магния (50 мМ)	1
3	Смесь дНТФ (10 мМ)	0,25
4	Смесь олигонуклеотидов	0,4
5	Буферный раствор 10х	2,5
6	Раствор ДНК-полимеразы (5 ед/мкл)	0,25
7	ДНК-матрица	5

Программа термоциклирования представлена в таблице 4

Таблица 4 – Программа термоциклирования

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация первичная	95	5 мин	1
Денатурация	95	5 сек	50
*Отжиг	см. ниже	10 сек	
Элонгация	72	20 сек	

\* rs2232228 (ген *HAS3*): отжиг при +64°C; rs1056892 (ген *CBR3*): отжиг при +64 °С; rs1695 (ген *GSTP1*): отжиг при +66 °С; rs35068180 (ген *MMP-3*): отжиг при +58 °С.

Детекция осуществляется по каналу FAM и по каналу HEX в конце каждого цикла на этапе элонгации. При высоких концентрациях ДНК количество циклов может быть уменьшено до 40.

Генотипирование rs243865 (ген *MMP-2*) проводят с помощью метода секвенирования по Сэнгеру с использованием олигонуклеотидных праймеров представленных в таблице 5.

Таблица 5 – Олигонуклеотидные праймеры для проведения секвенирования по Сэнгеру rs243865 (ген *MMP-2*)

Код	Направление	Последовательность
Rs3865_F	Прямой	GTCTGAAGCCCACTGAGACC
Rs3865_R	Обратный	CCTGTGACAACCGTCTCTGA

Первую ПЦР проводят с использованием готовой смеси для ПЦР или отдельных компонентов с соблюдением следующих требований: конечный объем реакционной смеси (в пробирке), включающей все компоненты для проведения ПЦР, а также ДНК-матрицу – 25 мкл; концентрация ионов магния в реакционной смеси 2 мМ (2 миллимоль/литр); концентрация дНТФ в реакционной смеси 0,2 мМ (миллимоль/литр) каждого (дА, дТ, дЦ и дГ); количество термостабильной Taq ДНК-полимеразы 1 единица активности (1 ед.); количество ДНК-матрицы 100-500 нг; количество каждого олигонуклеотида, включая зонды для ПЦР-РВ, 10 пикомоль (концентрация 400 наномоль/литр). При использовании растворов олигонуклеотидов с концентрацией 100 пикомоль/мкл требуется использовать 0,1 мкл раствора каждого олигонуклеотида. Рекомендуется готовить общую смесь всех 4 олигонуклеотидов и вносить по 0,2 мкл такого раствора для проведения единичного исследования (реакции).

Пример составления протокола постановки ПЦР приводится в таблицах 6 и 7 с использованием готовой смеси для ПЦР и отдельных компонентов для проведения ПЦР соответственно.

Таблица 6 – Протокол постановки ПЦР с использованием готовой смеси

№	Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
1	Вода для ПЦР	7,3
2	Готовая смесь для проведения ПЦР	12,5
3	Смесь олигонуклеотидов	0,2
4	ДНК-матрица	5

Таблица 7 – Протокол постановки ПЦР с использованием отдельных компонентов

№	Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
1	Вода для ПЦР	15,85
2	Раствор хлорида магния (50 мМ)	1
3	Смесь дНТФ (10 мМ)	0,25
4	Смесь олигонуклеотидов	0,2
5	Буферный раствор 10х	2,5
6	Раствор ДНК-полимеразы (5 ед/мкл)	0,2
7	ДНК-матрица	5

Программа термоциклирования представлена в таблице 8.

Таблица 8 – Программа термоциклирования

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация первичная	95	2 мин	1
Денатурация	95	5 сек	33
Отжиг	58	10 сек	
Элонгация	72	40 сек	
Элонгация 2	72	5 мин	



Контроль наличия продуктов ПЦР выполняют методом электрофореза в 1,5% агарозном геле при 115В в течение 30 минут. Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора по сравнению с ДНК-маркером. Размер целевого ПЦР-продукта составляет 525 п.н. При наличии в дорожках геля соответствующей полосы ее вырезают и помещают в стерильную пробирку для последующей очистки.

Очистка целевого фрагмента ДНК осуществляется согласно инструкции, предоставляемой производителем соответствующего набора реагентов. Постановка термоциклического секвенирования проводится согласно инструкции производителя соответствующего набора реагентов. Для каждой пробы проводят реакцию с прямым олигонуклеотидом, используемым для постановки ПЦР (таблица 5). В каждую пробирку с реакционной смесью вносят только один олигонуклеотидный праймер.

Очистка продуктов реакции термоциклического секвенирования осуществляется методом преципитации этанолом. Протокол очистки с помощью преципитации этанолом изложен в инструкции к набору для секвенирования. Распознавание последовательности ДНК проводится в автоматическом режиме с использованием генетического анализатора согласно инструкции к прибору, с использованием соответствующего программного обеспечения.

Этап 5 – интерпретация результатов генотипирования.

Генотипирование rs2232228 (ген *HAS3*). Возможные варианты генотипов: гомозигота AA либо GG, гетерозигота AG. Канал FAM – аллель А. Канал HEX – аллель G.

Генотипирование rs1056892 (ген *CBR3*). Возможные варианты генотипов: гомозигота GG либо AA, гетерозигота GA. Канал FAM – аллель G. Канал HEX – аллель А.

Генотипирование rs1695 (ген *GSTP1*). Возможные варианты генотипов: гомозигота AA либо GG, гетерозигота AG. Канал FAM – аллель А. Канал HEX – аллель G.

Генотипирование rs35068180 (ген *MMP-3*). Возможные варианты генотипов: гомозигота 5A (AAAAA) либо 6A (AAAAAA), гетерозигота 5A/6A.

Генотипирование rs243865 (ген *MMP-2*) Возможные варианты генотипов: гомозигота TT либо CC, гетерозигота TC. Наличие аллелей T и C определяется путем сравнения результатов секвенирования по Сэнгеру с референсными последовательностями: CCCCACCCAGCACTCC – наличие аллели C; CCCCACCCAGCACTCT – наличие аллели T.

Этап 6 – оценка вероятности развития дилатационной кардиомиопатии у пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы.

На основании результатов генотипирования и проведения расчетов согласно формулам 1 и 2 у пациентов может быть выявлена высокая или низкая вероятность развития дилатационной кардиомиопатии.

Расчет проводится согласно следующим шагам:

А) расчет значения линейного предиктора согласно формуле (1):

$$z = -0,23 - 2,22 * x1 - 2,27 * x2 + 1,53 * x3 + 3,02 * x4 - 2,24 * x5 \quad (1)$$

$z$  – линейный предиктор в уравнении логистической регрессии

$x1$  – полиморфный статус rs2232228 (ген *HAS3*),

A – значение 0, G – значение 1

$x2$  – полиморфный статус rs243865 (ген *MMP-2*),

T – значение 1, C – значение 0

$x3$  – полиморфный статус rs35068180 (ген *MMP-3*),

5A – значение 0, 6A – значение 1

$x4$  – полиморфный статус rs1056892 (ген *CBR3*),

G – значение 1, A – значение 0

$x5$  – полиморфный статус rs1695 (ген *GSTP1*),

A – значение 1, G – значение 0

Б) расчет значения обратного логит-преобразования  $z$  в вероятность  $P$  согласно формуле (2):

$$P = \frac{1}{[1+\text{EXP}(-z)]} \quad (2)$$

В) Принятие решения о вероятности развития дилатационной кардиомиопатии. В качестве порогового уровня принимается значение  $P_0 = 0,621$ . Если рассчитанное значение  $P$  (2) превышает пороговое значение  $P_0$  вероятность развития дилатационной кардиомиопатии – высокая. Если рассчитанное значение  $P$  (2) не превышает пороговое значение  $P_0$  вероятность развития дилатационной кардиомиопатии – низкая.

Этап 7 – заключение выдается с учетом вероятности развития дилатационной кардиомиопатии, рассчитанной в двух контрольных точках: этап 2, этап 6 – пункт В. Если хотя бы в одной из контрольных точек показатель вероятности определен как «высокий», то вероятность развития дилатационной кардиомиопатии у пациента считается высокой.

## **ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МЕТОДА И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

При точном соблюдении правил взятия, хранения и транспортировки образцов, выполнения процедур выделения ДНК и постановки ПЦР-РВ, а также выполнении инструкций руководства пользователя к аппарату УЗИ, ошибки маловероятны.

Научное издание

**Карпуть Ирина Александровна**  
**Снежицкий Виктор Александрович**  
**Бабенко Андрей Сергеевич и др.**

**МЕТОД ОЦЕНКИ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ  
ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ  
У ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ  
НОВООБРАЗОВАНИЯМИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Инструкция по применению

Ответственный за выпуск М. Н. Курбат

Компьютерная верстка С. В. Петрушиной

Подписано в печать 18.02.2025.  
Формат 60x84/16. Бумага офсетная.  
Гарнитура Таймс. Ризография.  
Усл. печ. л. 0,70. Уч.-изд. л. 0,41. Тираж 25 экз. Заказ 23.

Издатель и полиграфическое исполнение  
учреждение образования «Гродненский государственный  
медицинский университет».  
ЛП № 02330/445 от 18.12.2013. Ул. Горького, 80, 230009,