

Первый Московский Государственный Медицинский Университет
имени И. М. Сеченова

На правах рукописи

Сиамак Сабер

**Интервенционное лечение и генетическое разнообразие
больных с синдромом Бругада**

14.01.26 «Сердечно-сосудистая хирургия»

03.02.07 «Генетика»

**Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских
наук**

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН
Гавриленко Александр Васильевич

Доктор медицинских наук Захлязьминская Елена Валерьевна

Москва
2015 год

Оглавление

	стр.
Список сокращений	5
Введение	7
Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1. Клинические проявления синдрома Бругада	12
1.1.1. Электрокардиологические особенности при синдроме Бругада, диагностические критерии	12
1.1.2. Другие причины Бругада-подобных изменений на ЭКГ	16
1.1.3. Эпидемиология.....	18
1.2. Патофизиология и генетическое разнообразие синдрома Бругада ...	19
1.2.1. Общая характеристика сердечных каналопатий	19
1.2.2. Натриевый канал (Nav1.5) как сложный молекулярный комплекс	21
1.2.3. Na ⁺ канал- ассоциированные белки в генезе аритмий	27
1.2.4. Клеточные механизмы развития синдрома Бругада.....	31
1.3. Лечение	36
1.3.1. Медикаментозное лечение	36
1.3.2. Хирургическое лечение.....	38
1.3.2.1. Имплантация кардиовертера-дефибриллятора	38
1.3.2.2. Радиочастотная абляция.....	52
1.3.3. Дополнительные рекомендации	53
1.4. Профилактика ВСС и прогноз у больных с СБ.....	53
Глава 2. Материалы и методы	55

2.1. Общая характеристика обследованной группы больных	55
2.2. Клиническое и инструментальное обследование	55
2.2.1. Общий осмотр и биохимический анализ крови	56
2.2.2. Электро-кардиографическое обследование.....	56
2.2.3. Фармакологические нагрузочные пробы (по показаниям).....	56
2.3. Медико-генетическое консультирование	56
2.4. Молекулярно-генетическое исследование	57
2.4.1. Выделение ДНК из крови.....	57
2.4.2. ПЦР - амплификация исследуемых фрагментов ДНК	57
2.4.3. Прямое двунаправленное секвенирование по Сенгеру.....	58
2.4.4. Биоинформатические методы	59
2.4.5. Анализ частот выявленных генетических изменений в контрольной группе	60
2.5. Функциональный анализ мутации р.Р1506S в гене <i>SCN5A</i>	60
2.6. Имплантация кардиовертера-дефибриллятора.....	61
2.6.1. Материально-техническое обеспечение медицинской технологии.....	61
2.6.2. Техника первичной имплантации кардиовертера- дефибриллятора.....	62
2.7. Статистический анализ полученных данных	66
Глава 3. Результаты и обсуждение	68
3.1. Анализ клинического полиморфизма синдрома Бругада.....	68
3.2. Молекулярно-генетическое исследование в группе больных с синдромом Бругада.....	76
3.2.1. Молекулярно-генетический анализ гена <i>SCN5A</i> в группе больных с синдромом Бругада.....	76
3.2.2. Молекулярно-генетический анализ гена <i>SNTA1</i> в группе больных с синдромом Бругада	90

3.2.3. Поиск мутаций в генах <i>MOG1</i> , <i>SCN1B</i> , <i>SCN2B</i> , <i>SCN3B</i> и <i>SCN4B</i>	96
3.2.4. Дополнительные генетические находки в группе больных с синдромом Бругада.....	97
3.3. Хирургическое лечение синдрома Бругада.....	103
3.4. Анализ гено-фенотипических корреляций.....	111
Выводы.....	119
Практические рекомендации.....	121
Список литературы	122
Приложения.....	136

Список сокращений

- ААП: Антиаритмические препараты
ААТ: Антиаритмическая терапия
АДПЖ: Аритмогенная дисплазия правого желудочка
АТС: Антитахикардитическая стимуляция
БПНПГ: Блокада правой ножки пучка Гиса
ВСС: Внезапная сердечная смерть
ВОЗ: Всемирная организация здравоохранения
ВТПЖ: Выходной тракт правого желудочка
Дж: Джоуль
ДКМП: Дилатационная кардиомиопатия
ДНК: Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДФ Дефибрилляция
ЖТ: Желудочковая тахикардия
ИКД: Имплантируемый кардиовертер-дефибриллятор
КВ: Кардиоверсия
мРНК: Матричная РНК
мс: Миллисекунда
ОС: Обморочные состояния
ПД: Потенциал действия
ПЖ: Правый желудочек
ПЖТ: Полиморфная желудочковая тахикардия
ПЦР: Полимеразная цепная реакция
РНК: Рибонуклеиновая кислота
РЧА: Радиочастотная абляция
СБ: Синдром Бругада
СССУ: Синдром слабости синусового узла

ТП: Трепетание предсердий

УЗИ: Ультразвуковое исследование

ФП: Фибрилляция предсердий

ФЖ: Фибрилляция желудочков

ЭКГ: Электрокардиограмма

ЭФИ: Электрофизиологическое исследование

I_{Ca} : Входящий деполяризующий кальциевый ток

I_{Kr} : Исходящий быстро активирующийся калиевый ток
задержанного выпрямления

I_{Ks} : Исходящий медленно активирующийся калиевый ток
задержанного выпрямления

I_{Na} : Входящий быстрый натриевый ток

I_{to} : Входящий калиевый ток

DFT-Test: тест порога дефибриляции

QTc: Корректированный интервал QT

Введение

Актуальность темы

Наследственные заболевания, сопровождающиеся высоким риском внезапной сердечной смерти (ВСС), являются важной проблемой современной медицины. Только в США ежегодно от сердечных причин внезапно умирают 300 - 400 тысяч лиц молодого трудоспособного возраста. Строгих эпидемиологических исследований этой проблемы в России и Иране до сих пор не проводилось. В ряде европейских стран, включая Россию, у значительной части таких больных диагноз устанавливается поздно, после перенесенных эпизодов остановки сердца или посмертно, зачастую в семьях, в которых несколько кровных родственников уже погибли при сходных обстоятельствах. По современным оценкам, на долю синдрома Бругада (СБ) приходится около 4 - 12% случаев ВСС лиц молодого возраста [В. Venito 2009].

СБ – клиничко-электрокардиографический синдром, характеризующийся блокадой правой ножки пучка Гиса (БПНПГ), подъемом сегмента ST в отведениях V₁- V₃, синкопальными состояниями и высоким риском ВСС вследствие развития приступов полиморфной желудочковой тахикардии (ПЖТ). Данная патология наследуется по аутосомно-доминантному типу, что заставляет ожидать высокой частоты случаев болезни среди кровных родственников пробанда. Около 20% больных бессимптомны [Р. Brugada 2005]. Кроме того, выраженный клинический полиморфизм заболеваний зачастую не позволяет точно выяснить статус членов семьи больного, что приводит к задержкам в постановке диагноза, хирургическом лечении, а в ряде случаев – накоплению случаев внезапной смерти в семье. Это заболевание стало известно относительно недавно. Впервые оно было описано П. и Р. Бругада в 1992 году. В первой статье сообщалось о 8 больных, перенесших

повторные ВСС, необъяснимые с точки зрения известных на тот момент заболеваний. При этом клинические и электрокардиографические особенности складывались в ярко выраженный синдром, отличающийся от идиопатической фибрилляции желудочков.

Единственным эффективным подходом лечения и профилактики внезапной смерти у пациентов, страдающих СБ, является имплантация кардиовертера-дефибриллятора (ИКД). Однако показания к имплантации, стратификация риска и предикторы ВСС, диагностическая эффективность эндокардиального ЭФИ всё ещё остаются дискуссионными [В. Venito 2009, Antzelevitch С 2005].

Имеются данные, что частота СБ в России составляет не менее 1/10000 (Дупляков и соавт., 2007 год), что позволяет предположить наличие не менее 15 тысяч больных СБ в России. Достоверной информации о распространенности СБ среди иранского населения нет. Существенная частота заболевания и серьезный прогноз делают изучение этого заболевания социально значимым.

Современные подходы к диагностике наследственных аритмий, оценке риска внезапной смерти у таких пациентов и к выработке тактики лечения в значительной степени базируются на информации о молекулярно-генетической природе заболевания. Однако до настоящего исследования систематического исследования генетического разнообразия причин СБ, спектра мутаций, изучения корреляции генотип-фенотип при этом заболевании не проводилось.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы явилось изучение клинических проявлений, эффективности хирургического лечения, а также спектра генетических причин у больных с СБ.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

- 1) Изучить спектр клинических проявлений и оценить факторы риска ВСС у пациентов с СБ.
- 2) Оценить эффективность хирургического лечения (имплантации кардиовертера-дефибриллятора) у больных с СБ.
- 3) Изучить спектр мутаций в генах *SCN5A*, *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B*, *SCN4B*, *SNTA1* и *MOG1* в исследуемой группе больных и предложить оптимальный алгоритм ДНК-диагностики.
- 4) Провести анализ корреляций между генетическими изменениями и клиническими особенностями у больных с выявленными мутациями.
- 5) Предложить оптимизированный алгоритм стратификации риска ВСС и уточнить показания к имплантации кардиовертера-дефибриллятора с учетом антропометрических, клинических и генетических данных.

Научная новизна

Так как заболевание стало известно относительно недавно, данная тема является новой и актуальной. Не имелось достаточных данных о клинико-генетическом полиморфизме СБ и предикторах ПЖТ; оценка риска ВСС требовала уточнения.

- 1) Изучен спектр и частота клинических проявлений у больных с СБ.
- 2) Идентифицированы новые мутации в генах *SCN5A* и *KCNH2*, приводящие к синдрому Бругада.
- 3) Показано, что выявление мутаций в гене *SCN5A* является прогностически неблагоприятным фактором.
- 4) Впервые показано, что ген *SNTA1* может рассматриваться как новый кандидатный ген для синдрома Бругада.

Практическая значимость

Создан регистр больных с СБ (клинические данные, семейные данные и биологический материал); создан биобанк образцов, ДНК пациентов из России и Ирана. Проведено обследование из 81 больной с СБ и члены их семей (225 человек), 60 из них проведено хирургическое лечение (имплантация ИКД).

Оценена целесообразность включения в протокол ДНК-диагностики 8 генов, ответственных за СБ.

Полученные результаты и алгоритмы могут быть использованы в практической работе специализированных кардиологических и кардиохирургических центров и отделений, при медико-генетическом консультировании, в лабораториях ДНК-диагностики при оценке риска СБ, для выборе тактики лечения, формировании системы мероприятий, направленных на первичную и вторичную профилактику кардиогенной внезапной смерти у лиц с СБ, а также в лекционном и практическом образовательном процессе.

Глава 1.

Обзор литературы

Введение

Впервые данный синдром был идентифицирован у трехлетнего мальчика, имевшей частые эпизоды потери сознания и впоследствии внезапно погибшего в 1986 году. Однако впервые синдром Бругада (СБ) был опубликован под таким названием в 1992 году и в этот доклад вошли 8 пациентов с синдромом Бругада [30]. Диагностическая ценность элевации ST и блокады правой ножки пучка Гиса (БПНПГ) на ЭКГ были отмечены Yan и Antzelevitch в 1996 году.

Испанские кардиологи, братья П. и Д. Бругада описали семейный синдром со специфическим электрокардиографическим паттерном (элевация ST в V_1 - V_3), синкопальными состояниями и высоким риском внезапной смерти вследствие полиморфной желудочковой тахикардии (ПЖТ) [30, 88]. Преимущественный возраст манифестации СБ 30 - 40 лет.

Клиническая картина синдрома характеризуется синкопальными состояниями на фоне приступов желудочковой тахикардии и внезапной смертью, преимущественно во сне, а также отсутствием признаков органического поражения миокарда на аутопсии. Наибольшее распространение синдром имеет в странах Юго-Восточной Азии. Долгое время считалось, что СБ в других этнических группах (в Европе и Америке) встречается исключительно редко. Однако в настоящее время его частота оценивается 1-5:10000 во всех этнических группах [8, 19, 30, 88]. Существуют также фенокопии, так называемый Бругада-паттерн может наблюдаться при некоторых клинических состояниях и при приёме лекарственных препаратов).

1.1. Клинические проявления синдрома Бругада.

1.1.1. Электрокардиологические особенности при синдроме Бругада, диагностические критерии.

В 1992 г. братья Р. Brugada и J. Brugada впервые описали клинко-электрокардиографический синдром, характеризующийся блокадой правой ножки пучка Гиса, стойкой элевацией сегмента ST в правых грудных отведениях, и внезапной сердечной смертью вследствие ПЖТ [30].

Как правило, СБ проявляется во взрослом возрасте, характеризуется элевацией сегмента ST в правых грудных отведениях (V_1 - V_3) на стандартной ЭКГ. Обычно признаки СБ отчетливее выражены в отведении V_2 , особенно в третьем межреберном промежутке (V_2Ic_3) (Рис. 1.1) [73].

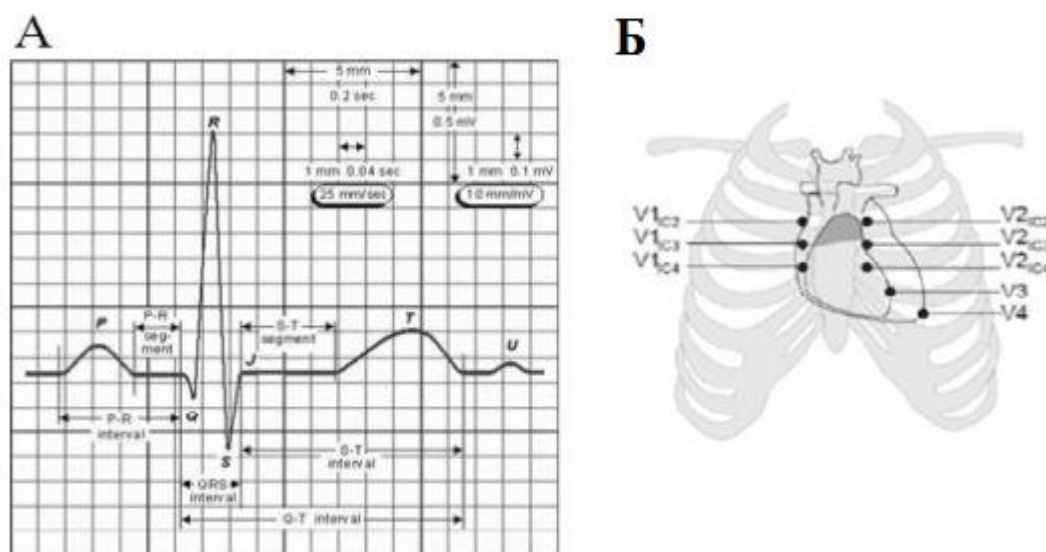


Рисунок 1.1. А) Параметры ЭКГ (Отведение I); Б) позиция электродов грудных отведений при стандартной ЭКГ в 12 отведениях.

До 2012 года выделяли три варианта Бругада-паттерна, различающихся по морфологии сегмента ST и зубца T в правых грудных

отведениях. Бругада-паттерн 1-го типа характеризуется сводчатой элевацией сегмента ST ≥ 2 мм (0,2 мВ) и отрицательным зубцом Т. Бругада-паттерн 2-го типа имеет вид седла с высоким подъемом сегмента ST (Высота ≥ 2 мм), за которым следует «провал», где элевация ST составляет ≥ 1 мм, с положительным или двухфазным зубцом Т. Бругада-паттерн 3-го типа имеет седловидный характер с подъемом сегмента ST < 1 мм (Табл 1.1 и Рис. 1.2) [21, 23, 73].

Таблица 1.1.

Варианты Бругада-паттерна на ЭКГ [Wilde. А. А, 2012].

	Бругада-паттерна на ЭКГ		
	Тип 1	Тип 2	Тип 3
Элевация точки J	≥ 2 мм	≥ 2 мм	≥ 2 мм
Волна Т	Отрицательный (-)	+ или +/-	+
Тип ST–Т сегмента	Сводчатый	Седловидный	Седловидный
Конечная часть ST	Постоянно отрицательная	> 1 мм	Подъем < 1 мм

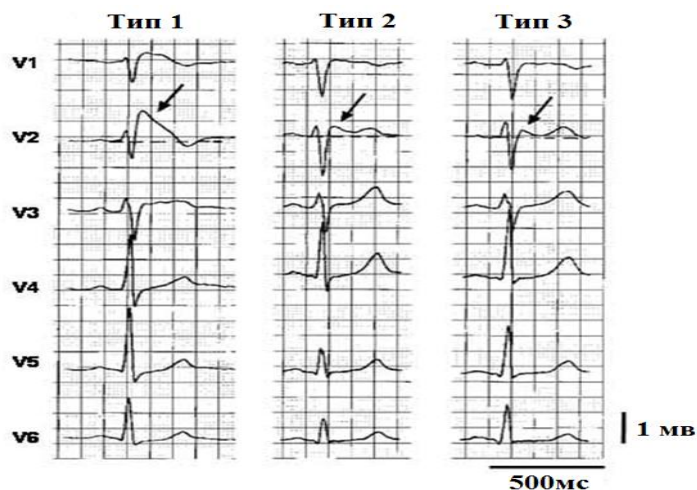


Рисунок 1.2. Возможные электрокардиографические паттерны у пациентов с СБ.

В 2012 году были опубликованы новые критерии диагностики СБ. По ним на ЭКГ выделяют два типа СБ: первая форма идентична описанию классического 1-го типа Бругада-паттерна. Вторая форма ЭКГ объединяет 2 и 3 варианты Бругада-паттерна. На самом деле, между 2 и 3 типом

существует только небольшая морфологическая разница, которая не меняет прогноз и стратификацию риска [25].

В настоящее время, СБ диагностируется, если у больного наблюдаются Бругада-паттерн 1-го или второго типов, а также есть один или несколько из следующих клинических признаков:

- (А) остановка сердца в анамнезе;
- (Б) наличие полиморфной желудочковой тахикардии (ЖТ);
- (В) кардиогенные обмороки в анамнезе;
- (Г) семейные случаи внезапной смерти у пациентов моложе 45 лет с неизменяемыми коронарными сосудами;
- (Д) Бругада-паттерн 1-го типа на ЭКГ у родственников.

Первый тип соответствует классическому 1 типу СБ, с элевацией сегмента ST с последующим симметричным негативным зубцом T в правых грудных отведениях [19, 21, 39]. Обычно, зубца r' не видно.

Важные характеристики этого варианта Бругада-паттерна:

- А) в конце комплекса QRS- быстрый подъем сегмента ST высотой ≥ 2 мм, с последующим вогнутым или прямым наклоном вниз;
- Б) сложно определить положение точки J (Рис. 1.3);



Corrado et al. Eu Heart J 2010; 31:243

Рисунок 1.3. Элевация QRS-ST совпадает с элевацией J-точки [10].

В) на 40 мс быстрого подъема сегмента ST амплитуда ST уменьшается до 4 мм. У спортсменов и пациентов с блокадой правой ножки пучка Гиса (БПНПГ) амплитуда может быть значительно больше, что не исключает наличие у них СБ;

Г) ST на высоте подъема $> ST_{40\text{мс}} > ST_{80\text{мс}}$ (Рис. 1.4);

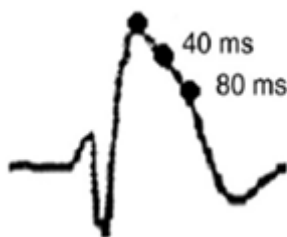


Рисунок 1.4. Элевация сегмента ST (на 40 мс и 80 мс).

Д) за сегментом ST следует негативный и симметричный зубец T;

Е) длительность интервала QRS больше в отведениях V_1-V_2 , чем в средних и левых перикардиальных отведениях (V_3-V_6). Длительность интервала QRS при СБ больше чем при БПНПГ [25].

Второй Бругада-паттерна тип характеризуется наличием в отведениях V_1 и V_2 концевое позитивного зубца r' .

Критерии:

А) высота зубца $r' \geq 2\text{мм}$;

Б) нисходящий отдел зубца r' совпадает с началом сегмента ST;

В) минимальный подъем сегмента ST $\geq 0.5\text{ мм}$;

Г) после сегмента ST следует позитивный зубец T в отведении V_2
($T > ST > 0$);

Д) при Бругада-паттерне 2-го типа продолжительность QRS интервала больше, чем в других случаях появления зубца r' ;

Е) в треугольнике, образуемом при опускании перпендикуляра на 5 мм от зубца r' , длина основания более 3.5 мм (Рис. 1.5) [25].

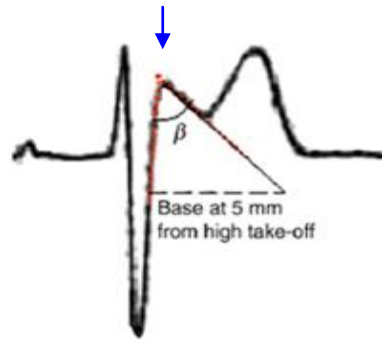


Рисунок 1.5. Тип 2 Бругада-паттерна, зубец r' указан стрелкой.

1.1.2. Другие причины Бругада-подобных изменений на ЭКГ.

Необходимо отметить, что схожие с СБ изменения ЭКГ могут быть выявлены при целом ряде других патологических состояний. Состояния, которые приводят к появлению паттернов ЭКГ, подобных СБ [25, 38]:

- 1) блокада правой ножки пучка Гиса (атипичная/неполная) [84];
- 2) ранняя или преждевременная реполяризация (у спортсменов) [39, 40];
- 3) деформация грудной клетки (грудь сапожника) [62];
- 4) аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка (АКПЖ) [69, 112];
- 5) острый инфаркт миокарда (правожелудочковой локализации) [50, 72, 93];
- 6) острый перикардит/миоперикардит, экссудативный перикардит;
- 7) тромбоэмболия легочной артерии;
- 8) расслаивающая аневризмы аорты;
- 9) расстройства центральной и вегетативной нервной системы;
- 10) мышечная дистрофия Дюшенна;
- 11) атаксия Фридрейха;
- 12) гипертрофия левого желудочка;
- 13) аритмогенная дисплазия правого желудочка;

- 14) механическое сдавление правого желудочка (тампонада);
- 15) опухоль средостения;
- 16) гипотермия;
- 17) состояние после электрической кардиоверсии;
- 18) гиперкалиемия;
- 19) гиперкальциемия;
- 20) алкогольная интоксикация;
- 21) наркотическая интоксикация (кокаин);
- 22) приём антиаритмических препаратов: блокаторов натриевых каналов (классы Ia, Ic), блокаторов кальциевых каналов, β -блокаторы;
- 23) антиангинальные препараты: блокаторы кальциевых каналов и нитраты;
- 24) психотропные препараты: трициклические и тетрациклические антидепрессанты, фенотиазины, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, литий (Рис. 1.6) [26].

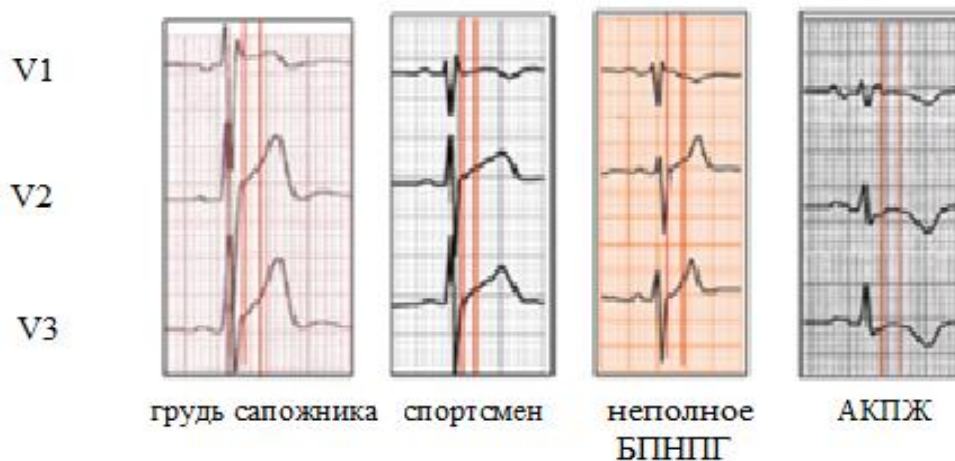


Рисунок 1.6. Примеры ЭКГ при заболеваниях (фенокопиях), требующих дифференциальной диагностики с СБ.

Подходы к классификации:

Общепринятой классификации СБ на сегодняшний день нет. Существует, по крайней мере, несколько попыток классифицировать этот синдром [29, 71], в основу которых положены различные принципы. На наш взгляд наиболее удовлетворяет клиническим требованиям следующая классификация.

1. По клиническим проявлениям:

- симптомный (синкопальный) – при наличии синкопальных эпизодов или ВСС в анамнезе;
- бессимптомный (бессинкопальный) – наличие только ЭКГ феномена, характерного для СБ, без клинических проявлений (может спонтанно трансформироваться в симптомный).

2. По характеру изменений на ЭКГ:

- классический (явный) – признаки СБ на ЭКГ присутствуют постоянно;
- интермиттирующий – ЭКГ проявления периодически появляются и исчезают спонтанно;
- скрытый – типичные изменения на ЭКГ возникают только после медикаментозной или другой стимуляции (асимптомный).

1.1.3. Эпидемиология.

Распространенность СБ оценивается в 1-5 на 10000 жителей по всему миру. Частота заболевания несколько ниже в западных странах, и выше (≥ 5 в 10000) в Юго-Восточной Азии, особенно в Таиланде и на Филиппинах, где СБ считается основной причиной внезапной смерти у молодых людей [43, 105]. В России это заболевание встречается также с частотой около 1:10000 [4]. Частота СБ в Иране точно не определена.

Средний возраст на момент первоначального диагноза СБ составляет 40 ± 22 года. Самому молодому пациенту на момент постановки диагноза было 2 дня, а самому пожилому – 84 года [69, 81]. Поскольку картина

изменений на ЭКГ очень динамична и зачастую неявна, трудно оценить истинную распространенность заболевания среди населения в целом [81].

Хотя количество генных мутаций, ответственных за СБ, равномерно распределено между полами, клинический фенотип проявляется у мужчин в 8-10 раз чаще, чем у женщин [106].

1.2. Патофизиология и генетическое разнообразие синдрома Бругада

1.2.1. Общая характеристика сердечных каналопатий.

Ионные каналы – это интегральные белки (гликопротеины), пронизывающие липидный бислой мембраны, и способные при адекватных внешних воздействиях (изменение потенциала на мембране) избирательно менять проницаемость мембраны для определенных ионов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-). В основе многих физиологических процессов (передача электрических и химических сигналов, сокращение, секреция) лежит работа ионных каналов биологических мембран. Фармакологические агенты и яды изменяют характеристики ионных каналов. Патология сердечно-сосудистой часто обусловлена нарушениями функционирования ионных каналов мембран.

Нормальная амплитуда и продолжительность сердечного потенциала действия обеспечивается согласованной работой ионных каналов и регуляторов их активности. На рисунке 1.7 показана схема нормального потенциала действия кардиомиоцита желудочков.

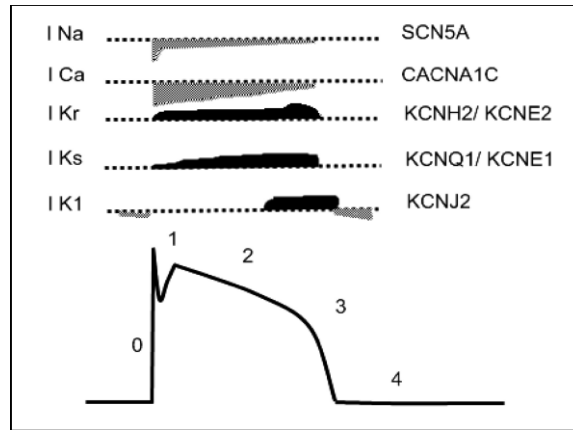


Рисунок 1.7. Схема нормального потенциал действия кардиомиоцита желудочков: фаза 0 - деполяризация, фаза 1 - ранняя реполяризация, фаза 2 - плато, фаза 3 - окончательная реполяризация, фаза 4 - восстановление ионных концентраций. Гены, кодирующие белки соответствующих ионных каналов, перечисленные справа; слева - обозначения следующих ионных токов: I_{Ca} -входящий кальциевый ток, I_{K1} – входящий кальциевый ток, I_{Kr} – быстро активируемый калиевый ток, I_{Ks} – медленно активируемый калиевый ток; I_{Na} – входящий натриевый ток.

В настоящее время известно несколько сотен наследственных моногенных каналопатий (группа наследственных заболеваний, связанных с нарушением структуры и функций ионных каналов).

К другим нарушениям ритма, развивающимся при структурно сохранном миокарде, относятся синдромы удлиненного и укороченного интервала QT, СБ и Лева-Ленегра, идиопатическая и катехоламинергическая желудочковые тахикардии, семейные формы фибрилляции предсердий и синдрома слабости синусового узла (СССУ), синдром детской внезапной смерти. Данная группа заболеваний проявляется преимущественно электрофизиологическими нарушениями в

миокарде и сопровождается высоким риском развития внезапной смерти в результате развития жизнеугрожающих нарушений ритма и/или проводимости. По данным некоторых исследований, на долю первичных аритмий приходится не менее 20-30% всех случаев внезапной смерти [19, 99].

1.2.2. Натриевый канал (Nav1.5) как сложный молекулярный комплекс.

Сердечная изоформа натриевого канала (Nav1.5) обеспечивает быстрый скачок потенциала при генерации потенциала действия в сердце и играет основную роль в распространении возбуждения по миокарду. Потенциал-зависимые натриевые каналы – трансмембранные белки в возбудимых клетках, селективно проводящие ионы натрия. Каналы представляют собой крупные молекулярные комплексы, содержащие порообразующую α -субъединицу, вспомогательные β -субъединицы и регуляторные белки (Рис. 1.8 и Табл 1.2) [33, 83, 85].

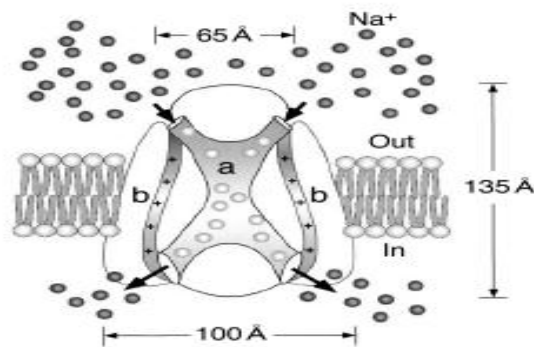


Рисунок 1.8. Схема строения потенциал - зависимого натриевого канала.

Таблица 1.2.

Альфа и бета-субъединицы, входящие в состав канала Nav1.5.

Ген	Белок
SCN5A	Потенциал-зависимые натриевые каналы, тип V, α -субъединицы
SCN1B	Потенциал-зависимые натриевые каналы, Тип I, β -субъединицы
SCN2B	Потенциал-зависимые натриевые каналы, Тип II, β -субъединицы

<u>SCN3B</u>	Потенциал-зависимые натриевые каналы, Тип III, β -субъединицы
<u>SCN4B</u>	Потенциал-зависимые натриевые каналы, Тип IV, β -субъединицы

На рисунке 1.9 представлена молекулярная организация α -субъединицы натриевого канала Nav1.5. Каждая α -субъединица состоит из четырех крупных доменов (DI-DIV), соединенных между собой цитоплазматическими линкерами. Каждый домен состоит из шести трансмембранных сегментов (S1-S6), соединенных между собой внеклеточными и цитоплазматическими петлями. Четыре домена формируют проводящую ионы пору, ограниченную внеклеточными петлями (P-петли) между сегментами S5 и S6.

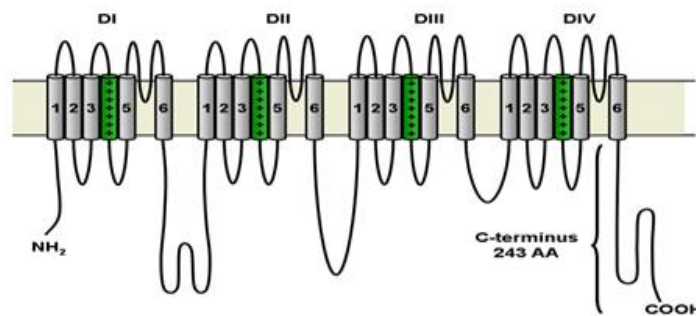


Рисунок 1.9. Схематическое изображение структуры α -субъединицы сердечной изоформы Nav1.5, содержащей 4 гомологичных домена (DI-DIV).

Аминокислоты, входящие в состав петель, определяют селективную проницаемость для ионов натрия. Сегмент S4 выполняет функцию сенсора потенциала и обеспечивает активацию канала. С-концевой домен Nav1.5 является важной областью канала, т.к. регулирует его инактивацию и содержит участки связывания для белков-функциональных партнеров Nav1.5 [17, 83].

Важная роль Nav1.5 в норме и патологии подтверждается наличием нескольких сотен генетических вариантов *SCN5A*, приводящих к развитию

синдрома удлинённого интервала QT, как врождённого, так и индуцированного лекарственными средствами, СБ, различными нарушениями проводимости, синдрому внезапной детской смерти, фибрилляции предсердий и дилатационной кардиомиопатии. Таким образом, различные функциональные эффекты мутаций в одном гене могут приводить к различным заболеваниям и клиническим проявлениям, формирующим аллельную серию. Рассмотрим аллельную серию заболеваний для гена *SCN5A*, кодирующего сердечную изоформу α натриевого канала Nav1.5 (Рис. 1.10) [75].

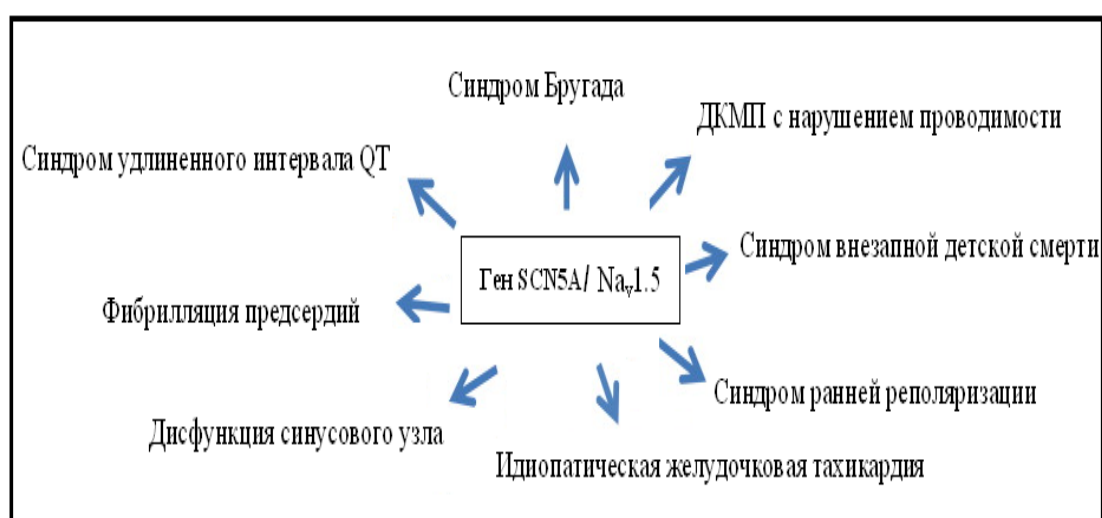


Рисунок 1.10. Аллельная серия заболеваний, развивающихся в результате мутаций в гене *SCN5A*.

Основная α -субъединица натриевого канала носит название Nav1.5 и кодируется геном *SCN5A* (OMIM: 600163) (Рис. 1.11).

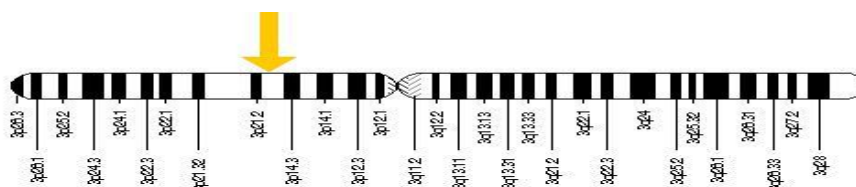


Рисунок 1.11. Ген *SCN5A*- Ген *SCN5A* расположен на коротком плече хромосомы 3p. Геномные координаты гена *SCN5A* :

[38589552 – 38691163] на хромосоме 3.

Стоит отметить, что мутации в генах, кодирующих β -субъединицы и регуляторные белки, обнаруживаются у пациентов с клинической картиной, сходной с таковой при аритмиях, вызванных нарушениями функций альфа-субъединицы (кодируемой геном *SCN5A*). Это отражает важность этих вспомогательных белков для правильного функционирования натриевого канала. Канал Nav1.5 вовлечен в обширную сеть белок-белковых взаимодействий (Рис. 1.12). На рисунке 1.13 представлена топология Nav1.5, схематическое изображение С-концевой области и взаимодействующих с каналом белков.

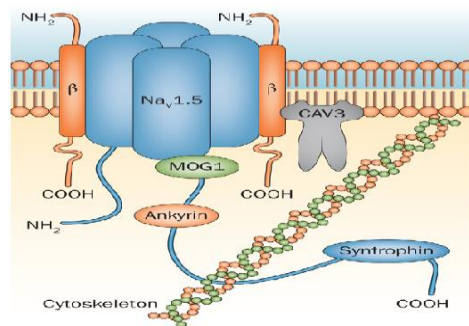


Рисунок 1.12. Белки, которые взаимодействуют с каналом Nav1.5 [Man Liu, 2014г.].

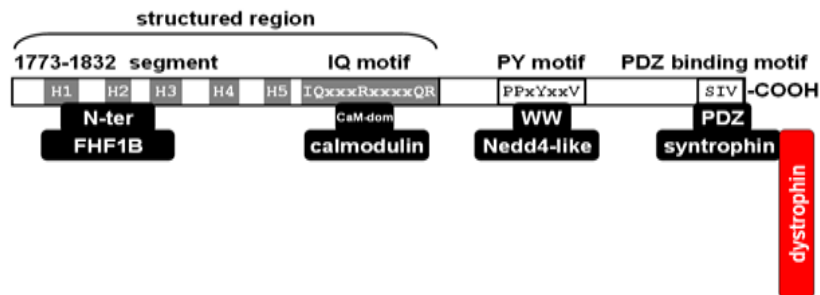


Рисунок 1.13. Схематическое изображение С-концевой части Nav1.5, включающей в себя несколько важных областей: проксимальная часть (слева) структурирована и содержит область, взаимодействующую с фактором роста фибробластов 121b26 (FHF1B). В дистальной части расположены три мотива, обеспечивающие белок-белковые взаимодействия:

IQ мотив, взаимодействующий с кальмодулином, PY-мотив, взаимодействующий с WW-доменами некоторых белков, и PDZ-домен связывающий мотив (-SIV-COOH), взаимодействующий с PDZ-доменами синтрофинов, которые являются адаптерными белками, регулирующими взаимодействие с дистрофином (обозначен красным).

Роль взаимодействующих с каналом Nav1.5 белков в генезе аритмий в последнее время активно изучается [11]. Биоинформатические программы (<http://string-db.org>) позволяют предсказать некоторые функциональные партнёры-регуляторы активности Nav1.5 (Рис 1.14).

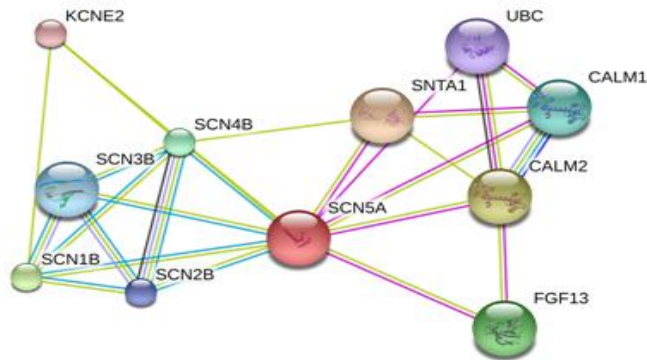


Рисунок 1.14. Функциональные партнёры белка Nav1.5, регулирующие его активность (<http://string-db.org>).

На сегодняшний день известны 4 β -субъединицы, натриевого канала, каждую из которых кодирует отдельный ген (*SCN1B-SCN4B*). Все β -субъединицы экспрессируются в кардиомиоцитах. Их роль активно изучается, но данные о функциональной роли этих β -субъединиц противоречивы.

Структурно β -субъединицы представляют собой белки с единственным трансмембранным доменом. Они влияют на экспрессию Nav1.5 в сарколемме, увеличивают амплитуду натриевого тока, модулируют открытие канала и играют важную роль во взаимодействии α -

субъединицы Nav1.5 с молекулами экстрацеллюлярного матрикса и цитоскелетом [39].

Бета-1 субъединица экспрессируется в скелетной мускулатуре и в головном мозге. Бета-2 субъединица также экспрессируется дополнительно в головном мозге. Удаление бета-1 субъединицы приводит к потере функциональных свойств Na-канала, тогда как удаление $\beta 2$ -субъединицы не оказывает существенного влияния на работу канала. По-видимому, β -субъединицы Na-каналов выполняют двойную функцию:

1) модуляция воротного запирающего механизма канала и 2) фиксация канала в определенном месте клеточной мембраны. $\beta 1$ -субъединица оказывает влияние на величину ионного тока через канал, регулируя процессы активации и инактивации. По структуре $\beta 1$ и $\beta 2$ субъединицы близки к большому классу молекул клеточной адгезии, которые опосредуют связь между клетками кардиомиоцитов, в нервной системе и в других тканях. Оказалось, что Na-каналы через $\beta 2$ -субъединицу связываются с белками внеклеточного матрикса, что обеспечивает формирование специализированных зон с высокой плотностью Na-каналов в перехватах Ранвье, начальном сегменте аксона и в кардиомиоцитах (Табл 1.3).

Таблица 1.3.

Гены, кодирующие бета-субъединицы натриевых каналов.

Ген	OMIM	Локус	Аллельная серия заболеваний
<i>SCN1B</i>	600235	19q13.1	1) СБ тип 5 2) Семейная фибрилляция предсердий тип 13 3) Нарушения сердечной проводимости, неспецифические 4) Эпилепсия генерализованная, с фебрильными судорогами, тип 1

SCN2B	601327	11q23.3	1) Семейная фибрилляция предсердий тип 14 2) СБ тип 17
SCN3B	608214	11q24.1	1) СБ тип 7
SCN4B	608256	11q23.3	1) Синдром удлиненного интервала QT 10 2) Возможна ассоциация с СБ

1.2.3. Na⁺ канал-ассоциированные белки в генезе аритмий.

В последнее время появляются данные о мутациях в генах, кодирующих не сами ионные каналы, а белки-регуляторы их активности. Клинические проявления при этом сходны с таковыми, вызванными мутациями в гене ионного канала. Белки семейства синтрофинов - адаптерные цитоплазматические белки, экспрессирующиеся в скелетных мышцах и кардиомиоцитах. Синтрофины являются белками-регуляторами, они тесно связаны с каналом Nav1.5 топологически и функционально. Известно 5 изоформ синтрофинов: $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ и $\gamma 2$. Синтрофины $\beta 1$ и $\beta 2$ были выявлены в кардиомиоцитах; синтрофин- $\gamma 1$ экспрессируется исключительно в мозге; РНК синтрофина- $\gamma 2$ была детектирована в кардиомиоцитах человека (Табл 1.4).

Таблица 1.4.

Гены семейства синтрофинов: краткая информация.

Ген	Белок	Локус	Профиль экспрессии
<i>SNTA1</i>	Синтрофин α -1	20q11.2	Большинство органов
<i>SNTB1</i>	Синтрофин β -1	8q23-q24	Большинство органов
<i>SNTB2</i>	Синтрофин β -2	16q22-q23	Большинство органов
<i>SNTG1</i>	Синтрофин γ -1	8q11.21	Большинство органов
<i>SNTG2</i>	Синтрофин γ -2	2p25	сердце, скелетная мускулатура

Все белки семейства синтрофинов содержат 4 центральных домена, PDZ-домен, два PH-домена и SU (syntrophin unique)-домен. Второй PH-домен (PH2) в сочетании с SU-доменом обеспечивает связывание с белками дистрофинового комплекса. Таким образом, домены PH1 и PDZ могут связываться с другими молекулами. Так, PDZ-домен синтрофинов связывается с ионными каналами, киназами и ассоциированными белками, с нейрональной NO-синтазой.

Основываясь на данных опубликованных исследований, можно предположить, что все гены, кодирующие белки, взаимодействующие с PDZ-доменом канала Nav1.5, могут являться генами-кандидатами в генезе аритмий. В таблице 5 представлена краткая информация о генах, кодирующих белки семейства синтрофинов:

Белок *SNTA1* консервативен, отмечается высокая степень гомологии у шимпанзе, собаки, коровы, мыши и крысы. Белок α -синтрофин состоит из 505 аминокислот, молекулярная масса составляет 53 kDa (Рис. 1.15).

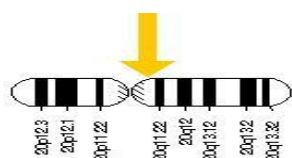


Рисунок 1.15. Локализация гена *SNTA1* на длинном (q) плече хромосомы 20 в локусе 11.2.

Он включает в себя два PH-домена, один PDZ-домен и один SU (syntrophin unique) – домен. Высокий уровень экспрессии отмечается в скелетной мускулатуре и в сердце, низкий – в мозге, поджелудочной железе, печени, почках и легких. Белок *SNTA1*, а именно - PDZ-домен, связывает нейрональную NO-синтазу (nNOS) и Nav1.5. Также в комплекс с nNOS входит сердечная изоформа кальциевой АТФ-азы, PMCA4b, ингибирующая синтез NO в сердце. Стоит отметить, что NO в сердце

обладает множеством эффектов, включая влияние на сократимость, однако один из основных эффектов – увеличение амплитуды позднего натриевого тока. Тот факт, что внутри дистрофинового комплекса существует 4 сайта связывания белка *SNTA1*, говорит о том, что белок *SNTA1*, скорее всего, связывает несколько сигнальных молекул в единый сигнальный комплекс. Взаимное расположение частей комплекса нейрональной NO-синтазы и Nav1.5 показано на (Рис. 1.16) [12, 37, 92, 108].

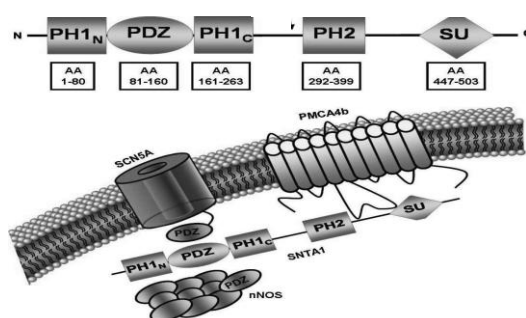


Рисунок 1.16. Структура белка $\alpha 1$ -синтрофина, его расположение относительно Nav1.5 и регуляторных белков.

Все синтрофины – периферические мембранные белки с высокой степенью гомологии в консервативных областях, особенно PH-домена и PDZ-домена. Основная функция белков семейства синтрофинов в кардиомиоцитах – обеспечение взаимодействия с дистрофином.

Роль многокомпонентного дистрофинового комплекса в кардиомиоцитах и его вовлеченность в патогенез аритмий сейчас активно изучается. Так, было показано, что в сердцах мышей с дефицитом дистрофина существенно снижен уровень белка Nav1.5 и отмечается снижение натриевого тока. Кроме того, при отсутствии дистрофина существенно (<50%) снижается уровень экспрессии $\alpha 1$ -синтрофина. В недавних исследованиях у пациентов с наследственным синдромом

удлиненного интервала QT были обнаружены мутации p.A390V и p.A257G в гене *SNTA1*, кодирующем α 1-синтрофин. При совместной экспрессии мутантных вариантов α -синтрофина и белка Nav1.5 в клетках линии НЕК293 наблюдалось усиление натриевого тока, что может объяснить удлинение интервала QT. Эти находки послужили основанием для выделения двенадцатого типа синдрома удлиненного интервала QT, обусловленного мутациями в гене *SNTA1*. До настоящего времени роль этого гена в патогенезе синдрома Бругада не изучалась.

Белок *MOG1* кодируется геном *RANGRF* 17p13.1. Описано существование нескольких изоформ белка *MOG1* с разным аминокислотным составом и различной молекулярной массой. Изоформа *MOG1a* содержит 187 аминокислот с расчетной молекулярной массой около 20 кДа; изоформа *MOG1b* содержит 146 аминокислот с расчетной молекулярной массой около 16 кДа. Функциональное значение различных изоформ белка *MOG1* в настоящее время изучено не достаточно. Взаимодействие белка *MOG1* с Nav1.5 были впервые показано на гибридной дрожжевой модели, впоследствии подтверждено на клетках НЕК293 и кардиомиоцитах. Белок *MOG1* взаимодействует с II цитоплазматической петлей Nav1.5, расположенной между доменами II и III. Было показано, что в присутствии белка *MOG1* экспрессия Nav1.5 увеличивается. Можно предположить, что белок *MOG1* регулирует поверхностную экспрессию Nav1.5 [110].

Сообщалось о возможном выделении 11 типа синдрома Бругада, связанного с мутациями в этом гене [64].

Генетический полиморфизм гена *MOG1* изучен недостаточно. *MOG1* увеличивает плазматической мембраны выражение Nav1.5 и плотность натриевого тока (I_{Na}), таким образом, мы предполагаем, что *MOG1* может служить терапевтической мишенью при каналопатиях, связанных с

нарушением проницаемости натрия. О возможной роли мутаций в *MOG1* в патогенезе СБ можно судить всего лишь по нескольким исследованиям.

1.2.4. Клеточные механизмы развития синдрома Бругада.

На сегодняшний день СБ считается первичной «электрической» болезнью сердца [97], развивающейся вследствие аномальной электрофизиологической активности эпикарда правого желудочка (ПЖ) в области выносящего тракта [34].

Первый ген - *SCN5A* - был открыт в 1998 г. [Chen Q. et al.]. Патофизиологическим механизмом развития СБ при мутациях в гене *SCN5A* является уменьшение количества или ускоренная инактивация натриевых каналов в клетках эпикарда правого желудочка, приводящие к снижению плотности потока натрия и преждевременной реполяризации эпикарда [1]. Кроме того, при этом синдроме было обнаружено снижение плотности субъединиц натриевых каналов на поверхности клеток с повышенным их содержанием в эндоплазматическом ретикулуме [47]. Увеличение калиевого тока (I_{to} - Преходящий компонент исходящего калиевого тока) мог бы приводить к сходному эффекту, однако этот механизм до настоящего времени не был описан у больных СБ. Снижение амплитуды потенциала действия (ПД) в некоторых участках эпикарда при его нормальной величине в эндокарде создает дисперсию реполяризации стенки желудочка, приводящую к трансмуральному градиенту напряжения, который проявляется на ЭКГ элевацией сегмента ST. Вероятно, вследствие вышеуказанных процессов появляется «уязвимое окно», во время которого может возникать механизм, запускающий желудочковую тахикардию (ЖТ) и фибрилляцию желудочков (ФЖ). Таким образом, некоторые мутации в гене *SCN5A* приводит к потере функции каналов, что создает гетерогенность рефрактерных периодов - идеальный

субстрат для запуска желудочковых аритмий. Возникновению ЖТ и ФЖ у таких больных, как правило, предшествует преждевременное сокращение желудочков с интервалом сцепления 388 ± 28 мс [5, 24, 60].

При записи электрокардиограммы непосредственно от эпи- и эндокарда ПЖ у больных с так называемым «сводчатым» подъемом сегмента ST, потенциал эпикардиальных клеток имеет «седловидную» форму (Рис. 1.17. В, С). При этом ПД клеток эндокарда не отличался от полученного в контрольной группе, что свидетельствовало о наличии трансмурального градиента напряжения у больных с СБ. Конфигурация «пик и купол» (spike and dome) также может удлинять ПД эпикарда и способствовать быстрой реверсии трансмуральных градиентов, что приводит к появлению на электрокардиограмме инвертированного зубца Т [3].

Другие авторы считают, что причиной подъема сегмента ST служит парадоксальное снижение реполяризации в эпикарде в выводном тракте правого желудочка (ВТПЖ) (Рис. 1.17) [18, 34].

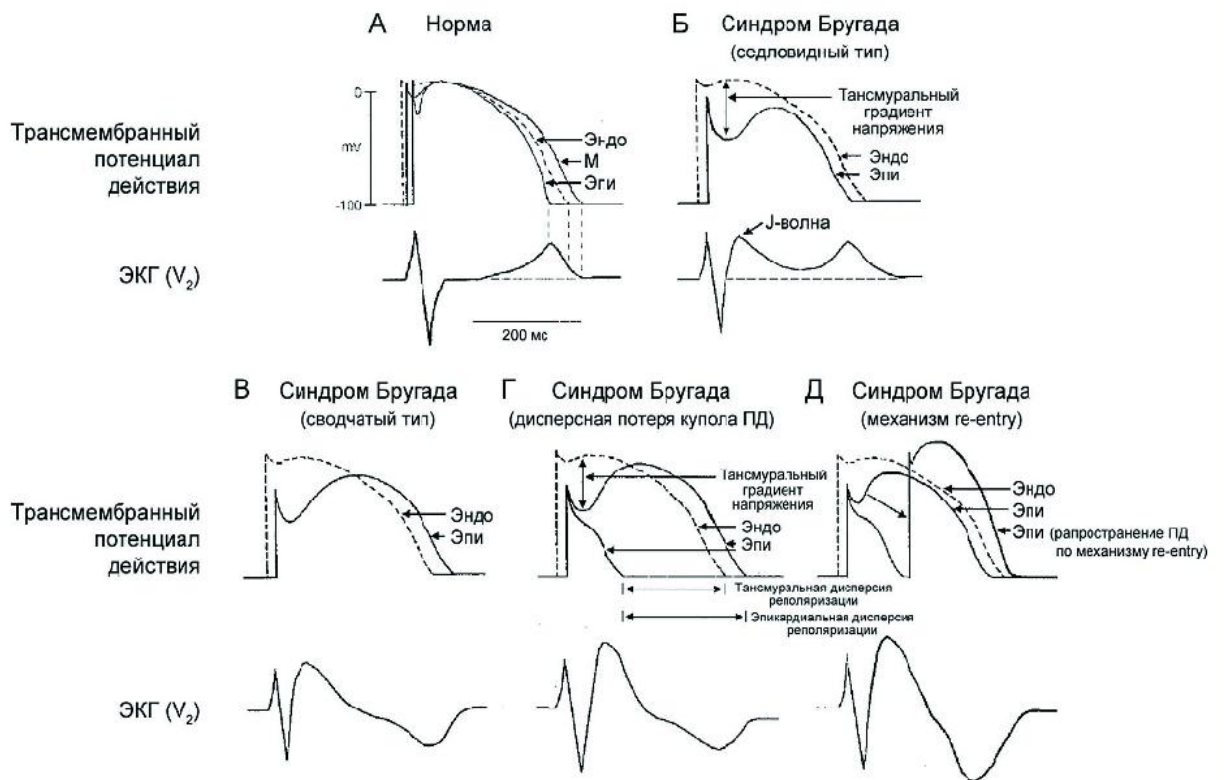


Рисунок 1.17. Механизм появления элевации сегмента ST. Дисбаланс между внутренним деполяризующим током (I_{Na}) и внешним реполяризующим током (I_{to}) является причиной ЭКГ проявлений СБ.

Генетически детерминированное угнетение входящего натриевого тока ведет к изменениям во 2-й фазе трансмембранного ПД в клетках эпикарда ВТПЖ. Это, в свою очередь, приводит к асинхронной реполяризации и электрической нестабильности в этом отделе сердца (Рис. 1.18).

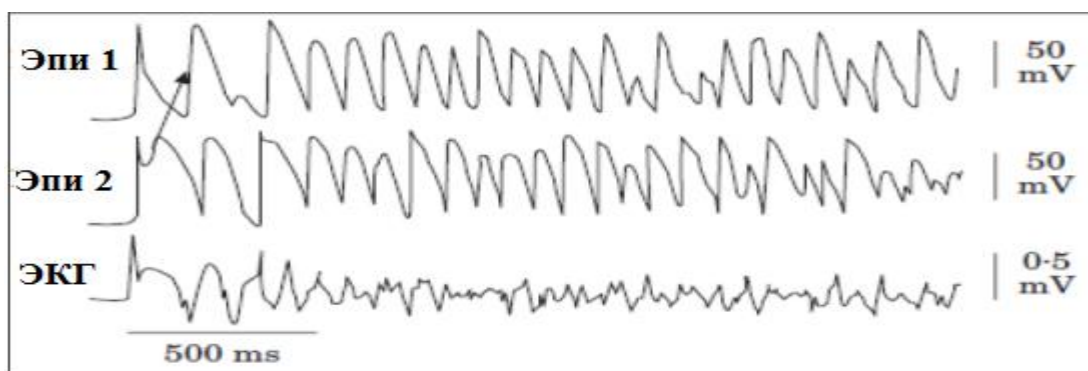


Рисунок 1.18. Желудочковая экстрасистолия, провоцирующая полиморфную желудочковую тахикардию.

Основными экзогенными факторами аритмической «уязвимости» миокарда являются: парасимпатические влияния (сон, погружение в холодную воду, ныряние, прием пищи), повышение температуры тела, блокада натриевых и кальциевых каналов, ишемия миокарда и др. В этих условиях могут возникать условия для раннего повторного возбуждения во 2-й фазе ПД с последующим возникновением желудочковой аритмии. В то же время у пациентов с СБ наблюдается нормализация сегмента ST после введения ингибиторов фосфодиэстеразы III [5].

Кроме того, возможно, что в патогенезе СБ играет роль дисбаланс между альфа- и бета-адренергической стимуляцией. Так при введении пациентам альфа-адреномиметиков или бета-адреноблокаторов

наблюдалось увеличение элевации сегмента ST, а при введении альфа-адреноблокаторов и бета-адреномиметиков - ее уменьшение [36, 76].

Основным молекулярным механизмом возникновения аритмии при СБ считается укорочение потенциала действия за счет недостаточности натриевого тока [18].

При этом в эпикарде правого желудочка, где существенное влияние оказывает транзиторный выходящий ток I_{to} , формируется сдвиг в сторону выходящих токов, что еще больше увеличивает разницу в продолжительности потенциала действия в эндокарде и в эпикарде. Укорочение продолжительности потенциала действия способствует неравномерному распределению рефрактерности и возбуждения, запуская тем самым механизм ре-ентри. СБ характеризуется выраженной генетической гетерогенностью и на сегодняшний день известно 17 генов, мутации в которых ответственны за развитие СБ (Табл 1.5) [78].

Таблица 1.5.

Молекулярно-генетические типы СБ.

Канал и Канал-ассоциированные регуляторные белки (Na^+) - 7 генов

+ Канал и Канал-ассоциированные регуляторные белки (K^+) - 6 генов

* Канал и Канал-ассоциированные регуляторные белки (Ca^{2+}) - 4 гена

синдрома Бругада тип	Ген	Кодируемый белок	Частота обнаружения мутаций
СБ 1	<i>SCN5A</i> [#]	Потенциал-зависимые натриевые каналы, Тип V, α -субъединицы	11-28%
СБ 2	<i>GPD1-L</i> [#]	Глицерин-3-фосфат дегидрогеназа-подобный фермент, взаимодействующий с натриевыми каналами и регулирующий их функцию	< 1%
СБ 3	<i>CACNA1c</i> [*]	α -субъединица кальциевого канала L-типа Cav1.2	3-4%

СБ 4	<i>CACNB2b</i> [*]	β- субъединица кальциевого канала L- типа	2-3%
СБ 5	<i>SCN1B</i> [#]	Потенциал-зависимые натриевые каналы, Тип 1, β-субъединицы	< 1%
СБ 6	<i>KCNE3</i> ⁺	<i>MiRP2</i> - β-субъединица калиевого канала	< 1%
СБ 7	<i>SCN3B</i> [#]	Потенциал-зависимые натриевые каналы, Тип 3, β-субъединицы	< 1%
СБ 8	<i>KCNH2</i> ⁺	hERG- α- субъединица калиевого канала Kv11.1	< 1%
СБ 9	<i>KCNJ8</i> ⁺	α-субъединица АТФ-зависимых калиевых каналов Kir6.1	< 1%
СБ 10	<i>CACNA2D1</i> [*]	α2/δ1- субъединица кальциевого канала L-типа	< 1%
СБ 11	<i>MOG1</i> [#]	Белок клеточного ядра, регулирующий биосинтез и транспортировку α-субъединиц натриевых каналов канала	< 1%
СБ 12	<i>KCNE5</i> ⁺	Потенциал- зависимый калиевый канал, относящийся к семейству I _{ks} .	< 1%
СБ 13	<i>KCND3</i> ⁺	α-субъединица калиевых каналов Kv4.3	< 1%
СБ 14	<i>HCN4</i> ⁺	Активируемый гиперполяризацией, Гиперполяризация активирована циклических нуклеотидов закрытого калиевых каналов 4	< 1%
СБ 15	<i>SLMAP</i> [#]	Белок, связанный с саркоплазматической мембраной кардиомиоцитов, регулирующий функцию натриевых каналов	< 1%
СБ 16	<i>TRPM4</i> [*]	Неселективный катионный канал	< 6%
СБ 17	<i>SCN2B</i> [#]	Потенциал-зависимые натриевые каналы, Тип 2, β-субъединицы	< 1%

Генетический анализ может помочь определить скрытых носителей мутаций, относящихся к СБ, для клинического мониторинга и выявления ранних признаков данного синдрома. Более того, после их выявления скрытые носители мутации должны получить генетическое консультирование для определения риска передачи заболевания потомству. Однако в настоящее время недостаточно данных для корректного использования результатов ДНК-диагностики в стратификацию риска ВСС [36,78, 85].

В настоящее время даже при скрининге всех известных генов, у 65-70% больных СБ генетический анализ не позволяет выявить мутации. Поэтому поиск новых генов, ответственных за заболевание, остаётся актуальной задачей.

1.3. Лечение.

1.3.2. Медикаментозное лечение.

До настоящего времени медикаментозная терапия при СБ не нашла широкого применения в связи с отсутствием общепризнанных препаратов, достоверно снижающих смертность у таких больных [86]. Имеются единичные указания на эффективность предупреждения желудочковых нарушений ритма при назначении пропранолола и дизопирамида [3], хотя они и могут приводить к еще более выраженному подъему сегмента ST [36].

Есть наблюдение предотвращения рецидивирования ФЖ при внутривенном введении изопротеренола [102]. Предпринимались попытки назначения таким пациентам амиодарона, однако по мнению П. и Р. Бругада [31], прием амиодарона и бета-блокаторов не предупреждает внезапную смерть у таких больных (летальность 26% в течение 3 лет при назначении амиодарона, что достоверно не отличается от 31% смертности в год у нелеченых больных).

В настоящее время ведется поиск антиаритмических препаратов, которые могли бы эффективно применяться для лечения СБ. Однако существуют только единичные описания эффективного использования препаратов. Например, описан случай предотвращения регулярных эпизодов фибрилляции желудочков при оральном применении цилостазола (ингибитора фосфодиэстеразы), что было подтверждено тестом периодической отмены [103]. Уменьшают элевацию сегмента ST (без указания эффективности предотвращения аритмий) катехоламины, бета-адреномиметики и альфа-адреноблокаторы. Однако лекарственная терапия имеет ограниченную эффективность (Табл 1.6) [20].

Таблица 1.6.

Эффективность использования антиаритмических препаратов для предупреждения ФЖ у больных с СБ.

Группа антиаритмических препаратов	Название	Эффективность
Класс I.(блокаторы натриевых каналов)	прокаинамид дизопирамид противопоказан противопоказан пропафенон флекаинид	противопоказан
Класс I, III (блокатор натриевых и калиевых каналов)	флекаинид	противопоказан
Класс II (β -блокаторы)	меторал	не эффективен
Класс III. (блокатор калиевых каналов)	амиодарон	не эффективен

Единственным достоверно эффективным подходом к предотвращению эпизодов ВСС является хирургическое лечение, а именно имплантация кардиовертера-дефибриллятора [63, 71]. По некоторым данным [59], назначение амиодарона на фоне больным с уже имплантированным кардиовертером-дефибриллятором может снизить частоту разрядов (хотя эффективность амиодарона для предотвращения аритмий, как было уже

сказано выше, не доказана). Вопрос об имплантации кардиовертера–дефибриллятора пациентам с бессимптомным вариантом СБ в настоящее время подвергается всестороннему обсуждению [61, 35].

Стратификация риска ВСС и вопрос о показаниях к имплантации кардиовертера–дефибриллятора у бессимптомных больных с СБ остается спорным и активно обсуждается.

1.3.2. Хирургическое лечение

1.3.2.1. Имплантация кардиовертера-дефибриллятора.

Внезапная сердечная смерть (ВСС) является необратимым исходом заболевания сердца, которой предшествовала внезапная потеря сознания в течение часа после возникновения острой симптоматики, при этом о предшествующем заболевании сердца может быть известно, но наступление смерти является неожиданным [61].

Эффективным методом профилактики и лечения ВСС является ИКД терапия, которая показала свою эффективность в ряде крупных рандомизированных исследованиях, таких, как MADIT (Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial) и CIDS (Canadian Implantable Defibrillator Study). Наглядным примером является исследование MADIT II которое продемонстрировало возможность уменьшения общей летальности на 31% благодаря применению ИКД-терапии (Рис. 1.19) [51, 79].

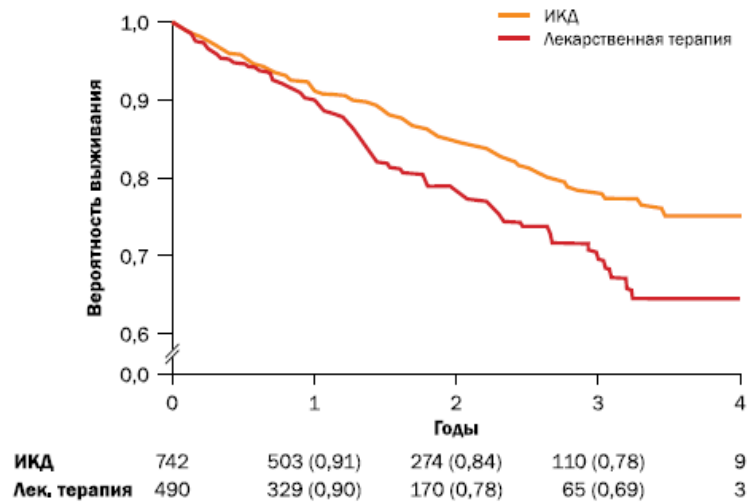


Рисунок 1.19. Результаты исследования MADIT II. Кривые выживаемости по Каплану-Мейеру, демонстрируют вероятность выживания в группе пациентов с ИКД и в группе, получающих только лекарственную терапию ($P=0.007$).

Современный ИКД представляет собой сложную электрическую систему заключенную в титановый корпус. Аппарат состоит из батареи, конденсатора и микропроцессора (Рис. 1.20).

Различают однокамерный (VR), двухкамерный (DR) и трехкамерный ИКД (CRT-D).

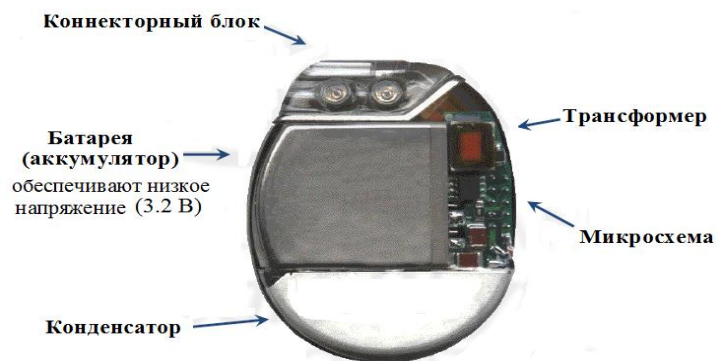


Рисунок 1.20. Однокамерный ИКД.

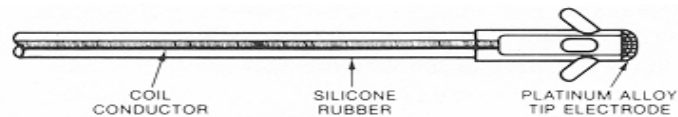
Одним из важных факторов в продвижении ИКД-терапии явилась значительная миниатюризация приборов и эндокардиальная имплантации электродов. Уменьшение размеров ИКД стало возможным благодаря прогрессу в области электроники и создания компактной батареи, имеющей большую электрическую емкость. Размеры большинства производимых на сегодняшний день устройств не превышают 35 - 40 см³, а их масса не превышает 60 - 70 г, что существенно упрощает оперативное вмешательство, уменьшает количество осложнений и повышает комфортность пациента. Немаловажным моментом в развитии ИКД-терапии, явилось появление модульной терапии, когда для определенного вида аритмии можно запрограммировать соответствующую последовательность терапевтических воздействий с применением анти-тахикардитической стимуляции (АТС), кардиоверсии (КВ), и дефибрилляции (ДФ). Высокая надежность современных устройств позволяет в подавляющем большинстве случаев использовать в качестве лечебного воздействия АТС. Использование анти-тахикардитической стимуляции (технология Smart Shock) для купирования видов ЖТ, в т.ч. «быстрых» ЖТ/ФЖ, с частотой более 180 - 250 в мин., позволяет избежать нанесения немотивированных электрических разрядов в 75% случаев, что существенно повышает качество жизни пациентов и увеличивает срок службы устройства [2, 79, 100, 108].

Заявленные производителями сроки службы современных устройств составляют от 6 до 8 лет, с учетом ограниченного количества электрических разрядов: от 2 до 4 в год и приемлемыми выходными параметрами электрокардиостимуляции [23].

ИКД с помощью эндокардиальных или эпикардиальных электродов осуществляет связь с сердечной мышцей. Электроды фиксируются в полости правого предсердия/желудочка. В зависимости от вида ИКД (однокамерный, двухкамерный, трехкамерный) каждый электрод имеет

свои конструктивные особенности и предназначен для стимуляции одной из камер сердца. Электрод представляет собой специальный спиральный проводник, обладающий достаточной гибкостью, чтобы выдерживать кручение и сгибание, вызываемые движениями тела и сокращениями сердца. Контакт электрода с сердцем осуществляется через платиновый кончик расположенный на дистальном его конце. Электрод передает сердцу электрический импульс, вырабатываемый ИКД, и несет обратно информацию об электрической активности миокарда (Рис. 1.21).

А)



Б)

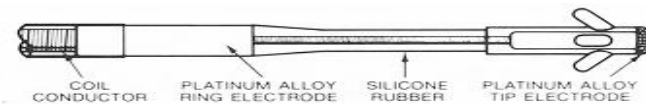


Рисунок 1.21. Электроды А) Однополярный Б) Биполярный.

Повышение надежности электродов за последние годы привело к сокращению общего числа осложнений (перелом электрода, перфорация сердца) с 1.8% до 0.8 – 1 по данным исследования MADIT-II [7].

ИКД как правило имплантируется в левую или правую подключичную область. Для фиксации используется шоковый правожелудочковые одно/двух-катушечный и предсердный электроды с пассивной или активной фиксацией. В ходе операции после установки ИКД производится определение порога дефибриляции (DFT-Test), который особенно необходимо проводить у детей (Рис. 1.22).



Рисунок 1.22. Двухкамерный кардиовертер-дефибриллятор (ИКД).

В основе детекции аритмий лежит анализ: частоты собственного ритма морфология желудочкового комплекса; амплитуда сигнала; стабильности RR-интервала, соотношение характеристик предсердной и желудочковой активности (в двухкамерных системах). Указанные характеристики позволяют устройству дифференцировать желудочковые и наджелудочковые тахикардии.

В ИКД существуют настраиваемые зоны детекции медленных и быстрых ЖТ и ФЖ.

- 1) Зона медленных ЖТ – 140-170 уд/мин
- 2) Зона быстрых ЖТ – 170- 190 уд/мин
- 3) Зона ФЖ > 200 уд/мин

В современных ИКД присутствует алгоритм АТС который является начальным этапом терапии ЖТ/ФЖ.

Параметры детекции и алгоритмы терапии для каждой зоны определяются в зависимости от характеристик ЖТ/ФЖ и устанавливаются индивидуально для каждого пациента. При последующем наблюдении, в зависимости от клинической ситуации и проводимой медикаментозной терапии, эти значения могут корректироваться.

При гемодинамически незначимой, относительно медленной ЖТ могут быть эффективны такие виды антитахикардийной стимуляции как Burst (стимуляция короткими пачками импульсов с частотой на 10-30% превышающей частоту тахикардии) или Ramp (стимуляция импульсами с постепенно увеличивающейся частотой при которой каждый импульс укорачивает цикл стимуляции по сравнению с предыдущим), а при их неэффективности используется режим кардиоверсий. При развитии ФЖ или быстрой ЖТ первым шагом в терапии раньше применялась дефибрилляция. Однако в связи с современным развитием ИКД появился новый алгоритм (технология Smart Shock), который позволяет снизить количество немотивированных шоков с помощью АТС. Данный алгоритм является неотъемлемым программным компонентом современных ИКД и служит начальным этапом терапии не только медленных ЖТ, но быстрых ЖТ и ФЖ. Дефибрилляция является конечным этапом терапии быстрых ЖТ и ФЖ при условии неэффективности АТС.

При этом необходимо отметить, что мощность наносимого разряда должна на 10 Дж превышать интра-операционный порог дефибрилляции с последующим пошаговым увеличением агрессивности терапии в виде нарастания мощности разряда до максимальных значений (41 Дж), а также изменением полярности в цепи дефибрилляции от корпуса ИКД к шоковому электроду и наоборот [2, 6, 7, 104].

Одномоментно может быть произведено от 1 до 6 дефибрилляций с максимальным уровнем разряда.

Возможные осложнения лечения ИКД

1. Дислокация электрода. Встречается редко (1:100–150 имплантаций). Возможны дислокации любых электродов: правопредсердного, правожелудочкового.

Макродислокация – это смещение электрода в другую сердечную камеру или полую вену. При микродислокации происходит смещение электрода в пределах данной камеры. Фактором риска дислокаций являются активные резкие движения пациента после операции, кашель, чихание, имплантация электрода с пассивной фиксацией.

Клиническая картина зависит от степени смещения электрода и вида смещённого электрода (предсердный, желудочковый) и проявляется: нарушением предсердной детекции и/или электростимуляции, что приводит к предсердно-желудочковой диссинхронии; нарушением желудочковой детекции и/или электростимуляции; электростимуляцией диафрагмы; немотивированными срабатываниями ИКД.

Лечение подразумевает коррекцию дислоцированного электрода, либо имплантацию электрода с активной фиксацией или миокардиальный способ имплантации.

Профилактикой данного осложнения является осторожность при имплантации электродов у пациентов с измененной анатомией сердца, при трикуспидальной регургитации 2–3 ст., широкое использование электродов с активной фиксацией.

2. Гнойные осложнения. Встречается редко (1:150 имплантаций).

Включают нагноение ложа ИКД, тромбофлебит подключичной (вены, электродный эндокардит, электродный сепсис. Вышеуказанные состояния можно рассматривать как последовательные стадии единого нагноительного процесса. Возникают в результате несоблюдения всех правил асептики и антисептики, имплантации инфицированного кардиовертера-дефибриллятора. Данные состояния могут вызываться любой микрофлорой, включая грибковую и анаэробную. Фактором риска является сахарный диабет, нахождение в непосредственной близости от ложа очага гнойной инфекции.

Клиническая картина определяется локальными и системными проявлениями. К локальным проявлениям относятся: отёк, покраснение в области ИКД, локальное повышение температуры, гнойные выделения. Системные проявления включают в себя лихорадку, интоксикацию, тромбоэмболический синдром, воспалительные изменения крови. При развитии сепсиса развиваются множественные гнойные метастазы, кахексия, анемия, иммунодефицит и др.

В соответствии с клиническими проявлениями лечение включает несколько направлений:

- местное (промывание ложа антисептиками и антибиотиками, ирригация, ведение раны открытым способом), системное (антибиотикотерапия не менее 2-х недель, нестероидные противовоспалительные препараты, симптоматическая терапия), реимплантация ИКД на контр-латеральную сторону. При системных проявлениях рекомендована эксплантация ИКД с сохранением временной электростимуляции или реимплантация ИКД миокардиальным доступом,
- кардиохирургическое лечение: удаление внутрисердечных электродов, санация полости сердца, протезирование трикуспидального клапана и реимплантация ИКД в миокардиальном варианте.

Профилактикой данного осложнения является тщательное соблюдение правил асептики и антисептики, сроков имплантации, рекомендованных заводом-изготовителем.

3. Пролежень ложа ИКД. Встречается редко (1:150 имплантаций).

Возникает в результате давления корпуса ИКД или петель электрода на мягкие ткани. В соответствии с этим выделяется пролежень ИКД или пролежень электрода. Фактором риска является сахарный диабет,

старческий возраст, склеродермия. Сформированный пролежень является «входными воротами» для инфицирования ложа ИКД и распространения гнойной инфекции. Клиника определяется локальными симптомами: покраснение, истончение, дистрофия кожи над областью ИКД. Впоследствии в этом месте возникает дефект, через который пролабируют части ИКД и возникает инфицирование раны. Лечение заключается в реимплантации ИКД в новое ложе, в случае инфицирования – в контрлатеральную подключичную область.

Профилактикой данного осложнения является тщательный выбор места имплантации у пациентов с факторами риска, регулярное наблюдение после операции, перевод больных с сахарным диабетом на инсулин перед процедурой, соблюдение правил асептики и антисептики.

4. Пневмоторакс. Встречается редко (1:150–200 имплантаций). Возникает в момент пункции подключичной вены, когда пункционная игла повреждает плевру и ткань лёгкого. В зависимости от степени повреждения, клиника варьирует от асимптомной (выявляется при рентгенографии), до острой дыхательной недостаточности. В соответствии с этим, лечение данного состояния варьирует: выжидательная тактика с регулярным рентгенографическим контролем в динамике, плевральная пункция с оставлением дренажа плевральной полости.

Профилактикой данного осложнения является осторожность во время пункции подключичной вены. При анатомических трудностях рекомендуется производить пункцию под рентгеноскопическим контролем.

5. Гемоторакс. Встречается редко (1:150–200 имплантаций). Возникает в момент пункции подключичной вены, когда пункционная игла повреждает плевру и подключичную артерию. Фактором риска является антикоагулянтная терапия. В зависимости от степени повреждения и вида повреждённого сосуда (вена или артерия) клиника варьирует в

соответствии со скоростью кровопотери: асимптомная (выявляется при рентгенографии, аускультации); клинические проявления острой дыхательной недостаточности; клинические проявления острой кровопотери вплоть до геморрагического шока.

В соответствии с клиническими проявлениями, лечение данного состояния варьирует: плевральная пункция; плевральная пункция с оставлением дренажа плевральной полости; выполнение торакотомии и ушивание повреждения плевры и подключичной артерии. Профилактикой данного осложнения является осторожность во время пункции подключичной вены. При анатомических трудностях следует производить пункцию под рентгеноскопическим контролем.

6. Гемоперикард. Встречается крайне редко (1:300–400 имплантаций). Возникает при манипуляции стилетами и жёсткими электродами, при активной фиксации предсердного электрода к свободной стенке. Происходит при перфорации сердечной стенки (правого предсердия или правого желудочка), венозной стенки (подключичная вена, верхняя полая вена). Фактором риска является дистрофия миокарда. В зависимости от топки перфорации, размера образовавшегося дефекта и скорости накопления крови в перикарде клиника варьирует от асимптомной (выявляется при эхокардиографии) до клинической смерти.

В соответствии с этим, лечение данного состояния варьирует: выжидательная тактика с назначением нестероидных противовоспалительных препаратов; пункция перикарда по Марфану с эвакуацией содержимого перикардальной полости; немедленная сердечно-лёгочная реанимация, пункция перикарда, подготовка к торакотомии и ушиванию перфорированного отверстия.

Профилактикой данного осложнения является осторожное использование стилетов и жёстких электродов, непрерывное

рентгеноскопическое наблюдение в момент проведения электродов и их активной фиксации.

7. Венозный тромбоз. Встречается редко (1:200 имплантаций). Возникает в результате тромбирования верхней поллой вены или подключичной вены. Причиной, запускающей каскад тромбо-образования, обычно является повреждённая изоляция электрода. Факторами риска данного осложнения являются: возраст пациента младше 7 лет, венозные аномалии, склонность к тромбообразованию и количество электродов, проведённых через одну вену.

В зависимости от уровня тромбоза наблюдается различная клиника: «синдром верхней поллой вены»; венозный застой в руке на стороне имплантации; церебральный синдром при нарушении венозного оттока от соответствующей половины головного мозга. В соответствии с этим, лечение данного состояния варьирует: консервативная антикоагулянтная и антиагрегантная терапия; симптоматическое и патогенетическое лечение в области венозного застоя; тромбэктомия с решением вопроса об удалении электродов и реимплантации ИКД в миокардиальном варианте.

Профилактикой данного осложнения является анализ системы гемостаза перед операцией, предварительная антикоагулянтная подготовка больных с факторами риска тромбообразования, преимущественная имплантация однокамерных ИКД или использование миокардиального доступа у детей раннего возраста [16, 44, 46, 48, 49].

Показания к имплантации ИКД при синдроме Бругада.

Принятие решения о хирургическом лечении пациентов, имеющих только один фактор риска, представляет сложность, так как асимптомные больные с СБ, без отягощенного семейного анамнеза могут тем не менее иметь высокий риск ВСС. Базируясь на результатах проведенных многоцентровых исследований, объединенная рабочая группа - Северо-

Американское Общество Электрофизиологов/ Американский колледж Кардиологии/ Американская кардиологическая Ассоциация (NASPE/ACC/АНА) в 2002 году выработала показания к имплантации и рекомендации по клиническому ведению больных с кардиовертерами-дефибрилляторами, было принято 2 новых протокола.

Существуют два подхода к оценке показаний к имплантации ИКД у больных с СБ. Основное различие касается прогностического значения эндокардиального ЭФИ (Рис. 1.23 и Табл 1.7) [14, 26].

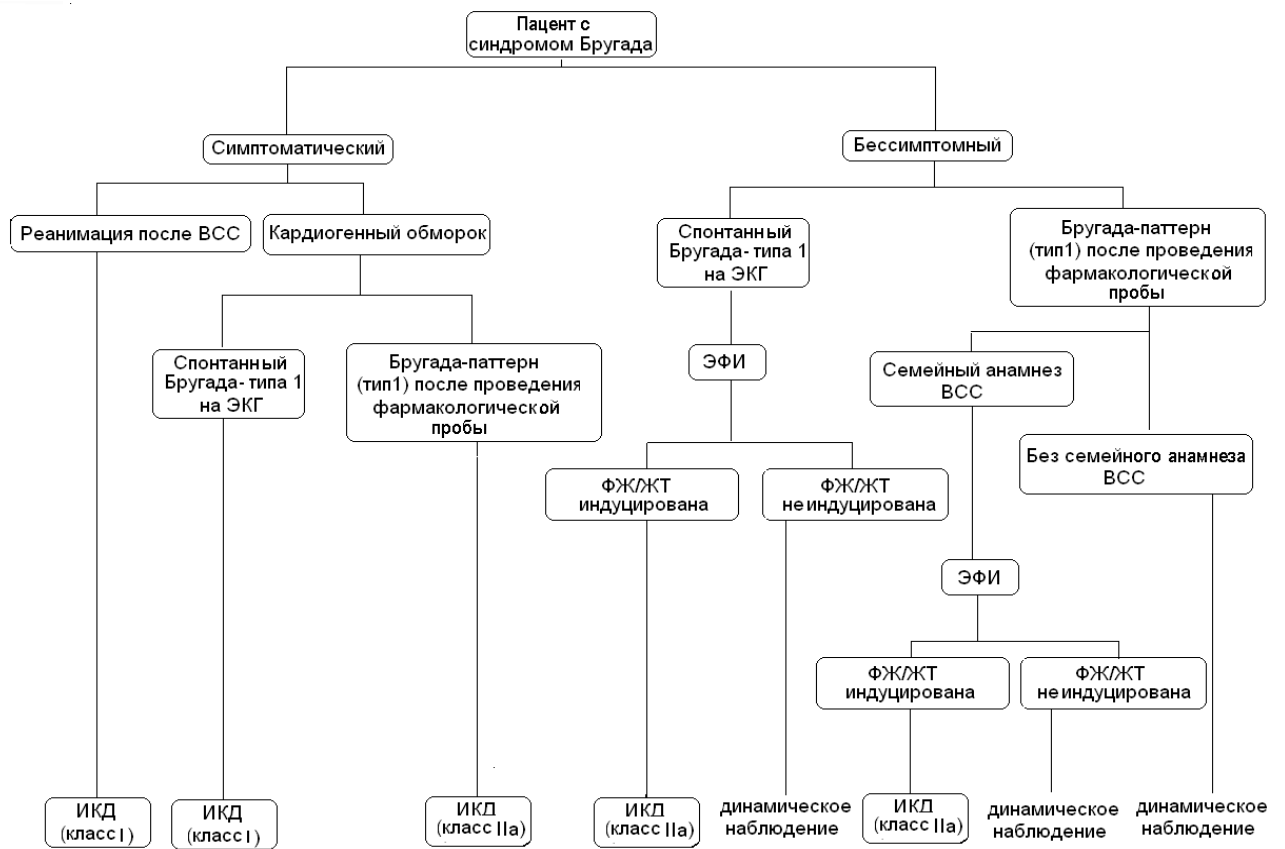


Рисунок 1.23. Алгоритм принятия решения об имплантации ИКД у больных с СБ.

Показания к имплантации ИКД у больных с СБ.

<p>Имплантация кардиовертера-дефибриллятора показана:</p> <p>Класс I: пациентам с СБ, 1) Имеющим в анамнезе ВСС 2) С документированной спонтанной фибрилляцией желудочков/полиморфной желудочковой тахикардией.</p> <p>Класс IIa: пациентам с СБ, имеющим два или более следующих трех факторов риска: 1) Синкопе в анамнезе. 2) Семейный анамнез внезапной сердечной смерти. 3) Фибрилляция желудочков ФЖ, индуцируемая при электрофизиологическом исследовании.</p> <p>Класс IIb: Пациенты с (СБ), имеющие только один из трех перечисленных факторов риска (ВСС).</p> <p>Класс III: нет</p>

Классы показаний и уровни доказательств.***Классы показаний.***

I. Положения, признанные абсолютно доказанными и/или в отношении которых существует единодушие о пользе и эффективности (той или иной диагностической процедуры или метода лечения).

II. Положения, в отношении которых имеются противоречивые свидетельства и/или нет единодушия относительно их пользы и эффективности (диагностической процедуры или метода лечения).

- IIa. Преобладают доказательства или мнения в пользу той или иной диагностической процедуры или метода лечения.
- IIb. Польза и эффективность диагностической процедуры или метода лечения менее обоснованы доказательствами и мнением экспертов

III. Положения, в отношении которых признано абсолютно доказанным и/или имеется общее единодушие, что данная диагностическая процедура или метод лечения не являются полезным и эффективным, а в некоторых случаях может принести вред.

Уровни доказательности.

A. При наличии данных большого количества рандомизированных клинических исследований.

B. При ограниченном количестве рандомизированных и нерандомизированных исследований или данных публикаций в медицинской литературе.

C. Относится к рекомендациям, основанием для которых служило мнение отдельных экспертов.

По хирургическому лечению для пациентов с синдромом Бругада (уровень доказательности: C).

Класс I.

ИКД-терапия проводится пациентам с СБ, имеющим в анамнезе перенесенный эпизод остановки сердца, которые получают длительную оптимальную лекарственную терапию, с хорошим функциональным статусом и благоприятным прогнозом выживания в течение года и более.

Класс IIa.

1. ИКД-терапия показана пациентам с СБ со спонтанным подъемом сегмента ST в отведениях V₁, V₂, V₃, имеющим указания в анамнезе на эпизоды синкопе, с хорошим функциональным статусом и благоприятным прогнозом выживания в течение года и более.

2. ИКД-терапия показана пациентам с СБ и верифицированной ЖТ, которая не привела к остановке сердца, с хорошим функциональным статусом и благоприятным прогнозом выживания в течение года и более.

Класс Ib.

1. Проведение эндокардиального ЭФИ может обсуждаться для стратификации риска у пациентов с СБ со спонтанным подъемом сегмента ST, без мутации в гене *SCN5A* и клинических проявлений .

2. Хинидин может применяться для лечения «аритмического шторма» у пациентов с СБ. Хинидин и изопротеренол могут использоваться у пациентов с «аритмическим штормом» даже при наличии имплантированного ИКД [14, 20, 26].

1.3.2.2. Радиочастотная абляция (РЧА)

Катетерная РЧА является одной из интервенционных методик, способной эффективно устранить или модифицировать субстрат одного из главных факторов риска, а именно стабильную ЖТ. Целесообразность ее применения определяется этиологией аритмического синдрома, вариантом его течения. Проведение РЧА оправдано у пациентов с частыми шоковыми разрядами ИКД при развитии т.н. «электрического шторма» (более 3 оправданных шоковых разрядов ИКД в течение 24 часов), обусловленного устойчивой рецидивирующей ЖТ или, в том числе, из ВТПЖ, рефрактерной к множественным антиаритмической терапии (ААТ). Тем не менее, на сегодняшний день, данные об эффективности РЧА в отношении профилактики ВСС при синдроме Бругада ограничены, во многом из-за того, что группа пациентов с ЖТ является неоднородной и проведение рандомизации у этой категории пациентов затруднено [14, 91, 101].

Результаты мета-анализа показали, что РЧА желудочковой аритмии достоверно приводит к снижению количества эпизодов ЖТ, количества эпизодов срабатывания ИКД. Тем не менее, проведение РЧА не сопровождается уменьшением смертности (в т.ч. и внезапной) [42].

РЧА показана пациентам без структурной патологии сердца с устойчивой или непрерывно рецидивирующей желудочковая тахикардия

(основной фактор риска ВСС). РЧА в этих случаях рассматривается как альтернативам антиаритмической терапии при предпочтении пациентом интервенционного вида лечения [67].

РЧА может быть рекомендован для лечения фибрилляции предсердий и желудочковой аритмии у пациентов с СБ [41].

1.3.3. Дополнительные рекомендации.

Все больные СБ должны получить подробную информацию о своём заболевании, его наследственном характере, и комплекс общих рекомендаций, направленных на минимизацию риска ВСС. Поскольку лихорадочные состояния способствуют возникновению опасных для жизни нарушений ритма сердца, всем больным СБ рекомендовано незамедлительное применение жаропонижающих средств при повышении температуры. Также не рекомендуется пребывание в местах с высокой температурой, что может вызвать перегрев, посещение стран с особенно жарким климатом, ситуативной экзогенной гипертермии (например, посещения парных).

Пациентам с СБ следует избегать приёма потенциально аритмогенных лекарственных препаратов, представленных в таблице 1 в приложение. Постоянно обновляемый перечень этих препаратов также представлен на сайте <http://brugadadrugs.org>

1.4. Профилактика ВСС и прогноз у больных с СБ.

Профилактические мероприятия, рекомендуемые больным синдромом Бругада, полностью исключают прием противопоказанных им лекарственных препаратов (Таблица 1.6). Рекомендуется незамедлительный приём жаропонижающих лекарственных препаратов

при повышении температуры, а также отказ от посещения бани, сауны и других парных.

Поскольку СБ - наследственное заболевание СБ, первым и единственным проявлением которого может быть ВСС, необходимо обследование всех близких родственников больного, а также проведение селективного молекулярно-генетического скрининга [26].

Были получены противоречивые данные о прогнозе для I и II типа СБ [79].

Серьезный прогноз при СБ обусловлен риском развития приступов ФЖ, которые могут привести к внезапной сердечной смерти. Частота внезапной смерти при отсутствии адекватного лечения по данным разных авторов колеблется от 10% до 40% в год [61, 63], причем риск для больных с постоянными и периодическими изменениями ЭКГ одинаковый [35].

Глава 2.

Материалы и методы

2.1. Общая характеристика обследованной группы больных.

Исследование было проведено в соответствии с протоколом, утвержденным Этическим комитетом РНЦХ имени академика Б.В. Петровского, Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова и с нормами Хельсинской декларации. Первый обратившийся член семьи с диагнозом СБ здесь и далее называется «пробанд». Его кровные родственники здесь и далее называются «родственники пробанда».

В исследование вошли клинические, инструментальные, молекулярно-генетические данные 31 российских и 50 иранских неродственных семей, в которых хотя бы одному больному был поставлен диагноз «синдром Бругада» согласно общепринятым диагностическим критериям. Таким образом, в обследованную группу вошли 81 пробанд и 144 их родственников. Среди пробандов было 9 женщин (средний возраст: 41 ± 10 лет), 72 мужчины (средний возраст: 37 ± 13 лет). Среди родственников с СБ соотношение по полу (М: Ж) составило 7 1.

2.2. Клиническое и инструментальное обследование.

Все пробанды были обследованы по единому протоколу который включал обязательные и факультативные исследования. Обязательные, исследования были выполнены всем пациентам, факультативные исследования были выполнены при наличии специальных показаний и при согласии на них со стороны больного.

2.2.1. Общий осмотр и биохимический анализ крови.

2.2.2. Электро-кардиографическое обследование.

- Разовые ЭКГ
- 24-часовое Холтеровское Мониторирование ЭКГ
- Трансторакальная эхокардиография (ЭхоКГ)
- Эндокардиальное электрофизиологическое исследование (ЭФИ) (по показаниям) [26]

2.2.3. Фармакологические нагрузочные пробы (по показаниям).

Фармакологические нагрузочные пробы проводились согласно стандартному протоколу обследования больных с подозрением на СБ. Использовались следующие антиаритмические препараты класса Ia и Ic: новокаинамид (прокаинамид) в дозе 10 мг/кг или флекаинид в дозе 2 мг/кг. Эффективность нагрузочной пробы оценивалась при помощи 12-канальной ЭКГ до появления Бругада-паттерна или каждые 10 минут до 30 минуты после введения препарата. Параллельно проводился мониторинг артериального давления [68].

2.3. Медико-генетическое консультирование

Медико-генетическое консультирование включало сбор и анализ родословных, объяснение семьям целей ДНК-диагностики, получение письменного информированного согласия на проведение генетического тестирования от каждого обследуемого члена семьи, объяснение членам семей особенностей аутосомно-доминантного типа наследования и риска передачи заболевания.

2.4. Молекулярно-генетическое исследование

2.4.1. Выделение ДНК из крови

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводилось методом фенол-хлороформной экстракции (Isolation of High-molecular-weight DNA from mammalian cells using Proteinase K and phenol, Ch.6, Protocol 6.1, Sambrook & Russel, CSHL Press 2006) и стандартных наборов реагентов (Изоген, Россия) и (Промега, США) согласно протоколу фирмы - производителя.

Образцы выделенных ДНК хранятся в Биобанке лаборатории медицинской генетики ФГБУ «РНЦХ им. Б.В. Петровского» РАМН при температуре -20°C.

2.4.2. ПЦР - амплификация исследуемых фрагментов ДНК

Для избирательной амплификации кодирующих последовательностей и прилегающих интронных областей генов *SCN5A*, *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B*, *SCN4B*, *SNTA1*, *MOG1* и *KCNH2* был проведен дизайн и синтез оригинальных олигопраймеров. Последовательности выбранных праймеров представлены в приложении (Приложение таблицы 1-7).

Подбор праймеров осуществлялся с использованием программы PerlPrimer v.1.1.18, а также с помощью интернет-ресурсов PrimerQuest и NCBI\Primer Blast. Предварительный расчет температур плавления осуществлялся с помощью программ PerlPrimer и PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/PrimerQuest>). Специфичность выбранных пар праймеров оценивалась с помощью Интернет-ресурса NCBI\Primer Blast. Условия амплификации впоследствии подбирались экспериментально.

Последовательности олигопраймеров и условия ПЦР (температура отжига, число циклов ПЦР, длина амплифицируемого фрагмента) представлены в приложении (Приложение таблицы 2-8).

Визуализация результатов ПЦР проводилась методом электрофореза нуклеиновых кислот в гелях различной плотности. Мы использовали полиакриламидные гели 8% (ПААГ) и агарозные гели 2%. Метод основан на различной подвижности в геле молекул нуклеиновых кислот с разной молекулярной массой под действием электрического поля.

Для амплификации использовался автоматический амплификатор «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) и «Veriti» (Applied biosystem, США). Очистка проб перед секвенированием проводилась с использованием смеси ферментов Echo-SAPIt согласно протоколу фирмы-производителя.

2.4.3. Прямое двунаправленное секвенирование по Сенгеру.

Анализ последовательности амплифицированных фрагментов проводился методом автоматического секвенирования по Сенгеру на приборе Applied Biosystems ABI3730 XL, согласно протоколу фирмы-производителя [9].

Результаты прямого секвенирования анализировались при помощи программы «Chromas 2» (<http://www.technelysium.com.au>). В качестве последовательности сравнения использовались референсные последовательности базы данных NCBI RefSeq (hg19) (Табл 2.1).

Таблица 2.1.

Номера референсных последовательностей (NCBI RefSeq) генов *SCN5A*, *SNTA1*, *MOG1*, *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B*, *SCN4B* и *KCNH2*, которые использовались при анализе результатов.

Ген	NCBI RefSeq
<i>SCN5A</i>	NM_198056.2
<i>SNTA1</i>	NM_003098.2
<i>MOG1</i>	NM_001177802.1
<i>SCN1B</i>	NM_001037.4
<i>SCN2B</i>	NM_004588.4
<i>SCN3B</i>	NM_018400.3
<i>SCN4B</i>	NM_174934.3
<i>KCNH2</i>	NM-053949.1

Выявленные у пробандов генетические изменения были подтверждены альтернативным методом (ПЦР-ПДРФ). Поиск мутаций у родственников проводился методами автоматического секвенирования по Сенгеру или ПЦР-ПДРФ анализа.

2.4.4. Биоинформатические методы.

Предварительная оценка функциональной значимости выявленных нуклеотидных замен осуществлялась с помощью биоинформатических Интернет-ресурсов:

NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

Inherited Arrhythmias Databased (<http://www.fsm.it/cardmoc/>)

Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)

CHIP Bioinformatics Tools (<http://snpper.chip.org/>)

NetGene2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>)

POLYPHEN-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>)

Restriction Mapper V3 (<http://www.restrictionmapper.org/>)

2.4.5. Анализ частот выявленных генетических изменений в контрольной группе.

Анализ частот выявленных генетических изменений проводился методом ПЦР-ПДРФ на образцах ДНК, полученных от 200 здоровых взрослых неродственных добровольцев (100 добровольцев иранского происхождения, 100 добровольцев российского происхождения).

2.5. Функциональный анализ мутации p.P1506S в гене SCN5A.

Плазмидный вектор (Delta Q1077) с мутантным белком Nav_v1.5 трансфецировался в клетки HEK293. Для проведения функционального анализа использовалась изоформа Delta Q1077, кодирующая 2015 аминокислот. Таким образом, мутации p.P1506S в модельной клеточной системе соответствовал вариант p.P1505S.

- ПЦР-опосредованный сайт-направленный мутагенез

Сайт-направленный мутагенез был выполнен на pCDN3.1- hSCN5A с помощью стандартного набора реагентов Quick-Change II XL ("Stratagene", La Jolla, Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя. В результате была получена сплайс-форма белка Nav1.5, в которой пролин в позиции 1505 заменен на серин.

- Трансфекция культур клеток

Культура человеческие эмбриональные клеток почки 293 (HEK293) культивировали при температуре 37°C на питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) с добавлением 10% FBS (Фетальной сыворотки крупного рогатого скота), 4 mM глутамина и смеси стрептомицин-пенициллиновые антибиотики в увлажненной атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха. Все клеточные компоненты сред, за исключением глутамина (Sigma-Aldrich), были приобретены у Gibco.

- Клеточная электрофизиология

Клетки HEK293 трансфецировались ДНК в комплексе с JetPEI (Polyplus-трансфекция) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрация ДНК составила 1 мкг pCDN3.1- Nav1.5 дикого типа (WT), p.P1505S и 1 мкг pIRES-h β 1-CD8. Через 6-8 часов после трансфекции клетки были изолированы и с низкой плотностью засеяны на пластиковые чашки Петри. Через 24 часа после трансфекции результирующий ток натрия (I_{Na}) был зарегистрирован при комнатной температуре (23-25°C) методом локальной фиксации потенциала в конфигурации «» с использованием усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments, Inc) и программного обеспечения PClamp 10 (Molecular Devices Corporation). Утечка и емкостные токи были погашены с помощью P/4 протокола. Клетки находились во внеклеточном растворе, содержащем (в ммоль/л): NaCl 50, НМДГ-Cl 80, CsCl₅, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2, HEPES 10, глюкозы 5. pH был скорректирован CsOH до 7,4. Стеклопипетки (сопротивление кончика пипетки от 1,3 до 2,5 М Ω) были наполнены внутриклеточной средой, содержащей (в ммоль/л): CsCl₅ 60, аспарагиновая кислота 50, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, HEPES 10, EGTA 11, Na₂ATP 5. pH был скорректирован CsOH до 7.2. Фирма-производитель реагентов Sigma. Биофизические параметры ионных токов анализировались с использованием программного обеспечения Clampfit (Axon Instruments, Inc). Полученные данные были проанализированы с помощью набора программ pClamp10, Excel (Microsoft) и Prism (GraphPad).

2.6. Имплантация кардиовертера-дефибриллятора.

2.6.1. Материально-техническое обеспечение медицинской технологии

- Техническое обеспечение операции имплантации кардиовертера-дефибриллятора

1. Установка ангиографическая например Innova 4100 (General Electric, Франция); Innova 2100 (General Electric, Франция); Infinix (Toshiba Medical Systems, Япония)
2. Мониторинг пациентов например SOLAR 8000i (General Electric, Франция);
3. Аппарат для гемостатической диатермокоагуляции (FORSE);
4. Программатор к имплантируемому кардиовертеру-дефибриллятору. (Medtronic, Boston Scientific, Biotronik, St. Jude)
5. Имплантируемый кардиовертер-дефибриллятор с набором электродов. (Medtronic, Boston Scientific, Biotronik, St. Jude)

На сегодняшний день используются одно- или двух-камерные системы (Рис. 2.1).

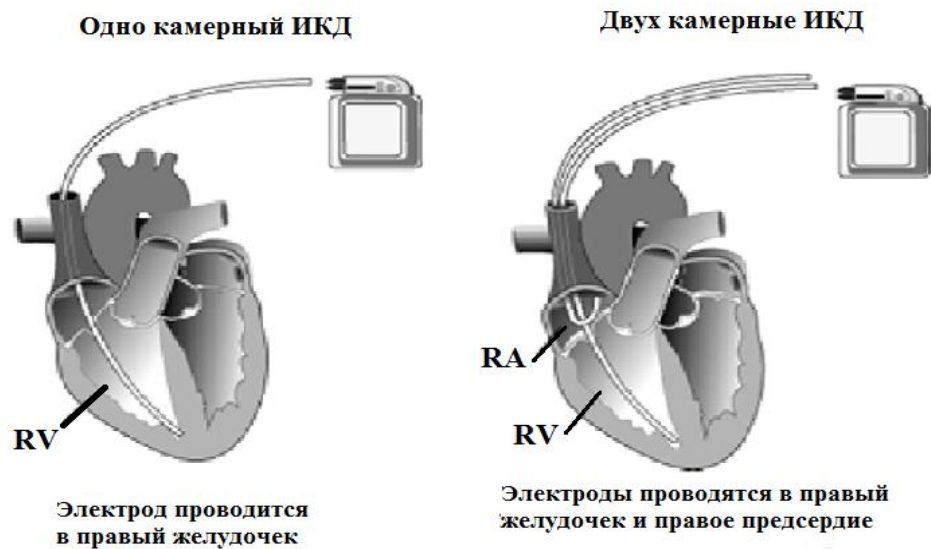


Рисунок 2.1. Виды ИКД

2.6.2. Техника первичной имплантации кардиовертера-дефибриллятора

Процедура имплантации ИКД:

Процедура имплантации ИКД включала пять последовательных этапов: подготовительный (пункция подключичной вены, формирование

ложа для ИКД), имплантация электрода (или электродов), имплантация ИКД, заключительный хирургический этап, внутрисердечное ЭФИ (электрофизиологическое исследование сердца).

Пациент в операционной находится в сознании. Анестезиологическое обеспечение: местная анестезия (р-р лидокаина 1% или р-р новокаина 0.5%) + наркотические или ненаркотические анальгетики. Перед операцией аппарат ИКД программируется с установкой необходимых параметров. Операция начинается с инфильтрации мягких тканей местными анестетиками в подключичной области на стороне предполагаемой имплантации. Далее проводится пункция подключичной вены (одно-, двух- или трёхкратно – в зависимости от количества имплантируемых электродов – в данном случае два) с установкой струн-проводников. Убедившись в том, что вены, через которые будут установлены эндокардиальные электроды, проходимы – в подключичной области делается разрез кожи и подкожной жировой клетчатки параллельно ключице до поверхностной фасции большой грудной мышцы для формирования ложа. При этом размеры ложа должны соответствовать внешним параметрам ИКД. Через специальный интродьюсер по венозной системе под визуальным и рентгеноскопическим контролем устанавливается и ввинчивается эндокардиальный биполярный одно/двухкатушечный шоковый электрод в эндокард правого желудочка в области его верхушки или межжелудочковой перегородки. Дистальная катушка должна располагаться непосредственно в правом желудочке сердца, проксимальная – в верхней полой вене/правом предсердии. Следующим этапом проводится тестирование основных параметров электрода: чувствительность, порог стимуляции и сопротивление на контактной части электрода и шоковых катушках. При получении удовлетворительных параметров электрод фиксируется шовным материалом в операционной ране в месте внедрения. Следующим этапом

через второй интродьюсер проводится и устанавливается в ушко правого предсердия биполярный J-образный эндокардиальный электрод с пассивной или активной фиксацией. Если до этого пациент перенёс операцию на открытом сердце в условиях искусственного кровообращения с лигированием ушка правого предсердия - используется только электрод с активной фиксацией, который ввинчивается в свободную стенку правого предсердия или культю ушка правого предсердия. Следующим этапом проводится тестирование основных параметров электрода: чувствительность, порог стимуляции и сопротивление. При получении удовлетворительных параметров электрод фиксируется шовным материалом в месте внедрения. Проксимальные коннекторные части имплантируемых электродов обрабатываются спиртовым раствором и сухой салфеткой. В первую очередь к аппарату ИКД подключается право - желудочковый шоковый электрод и фиксируется в коннекторной части специальными винтами. Во вторую очередь – предсердный электрод по такому же принципу.

ИКД со свободными частями электродов помещается в заранее сформированное ложе. Послойное ушивание ложа, мягких тканей. Используется асептическая наклейка. По окончании операции на место проекции ИКД накладывается магнитная головка программатора и повторно тестируются основные параметры: электродов, порог стимуляции, сопротивление и чувствительность. Выставляются: режим стимуляции в зависимости от необходимости, параметры на детекцию и терапию желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков [95].

После имплантации ИКД для подтверждения эффективности функционирования устройства, используется индукция фибрилляции желудочков с последующими тестовыми электрическими разрядами тест на определение порога дефибрилляции (DFT-Test). Существует спорные мнения о том, стоит ли всем пациентам проводить DFT-тест.

По данным недавно опубликованного регистра Европейской ассоциации сердечного ритма, в подготовке которого приняли участие 57 лечебных учреждений, определение порога дефибрилляции непосредственно после имплантации устройства или перед выпиской из стационара выполнялось каждым третьим, а индукция нескольких эпизодов фибрилляции желудочков - только каждым восьмым опрошенным. В канадском исследовании индукция фибрилляции желудочков с целью определения порога дефибрилляции проводилась приблизительно в 2/3 случаев как первичных, так и повторных вмешательств [54, 80]. Вне зависимости от порога дефибрилляции, применение алгоритмов лечения, заложенных в современных устройствах, в большинстве случаев позволяет устранить устойчивые желудочковые нарушения ритма сердца, в связи с чем неэффективность шокового разряда при определении порога дефибрилляции во многих случаях может приводить к необоснованной ревизии устройства. Два протокола были использованы при определении порога дефибрилляции (step-down и step-up). Четыре разряда должны быть достаточными для определения энергетического порога дефибрилляции (первый, второй и третий разряды поставляются в 20 Дж, 15 Дж и 10 Дж, и все будут успешными).

Перед имплантацией всем пациентам проводилось исключение факторов, являющихся абсолютным противопоказанием к имплантации.

Противопоказания для имплантации ИКД:

Абсолютные противопоказания:

- риск тромбоз
 - тромбоз левого предсердия
 - тромбоз желудочка (неорганизованный тромб)
 - фибрилляция предсердий (без антикоагулянтной терапии)
- недостаточная анестезия
- наличие наружного дефибриллятора

- тяжелый аортальный стеноз
- гемодинамическая нестабильность пациента

2.7. Статистический анализ полученных данных.

Для статистического анализа полученных результатов использовался программный пакет SPSS-18.

Все показатели представлены в виде среднего \pm одно стандартное отклонение ($M \pm \sigma$).

При оценке значимости различий между двумя группами количественных показателей применяли критерий Стьюдента или дисперсионный анализ.

При сравнении более двух исследуемых групп применяли однофакторный дисперсионный анализ.

При использовании более одного последовательного сравнения использовали критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони для равных дисперсий и Ньюмена-Кейлса для теста с неравными дисперсиями.

Для сравнения двух групп по качественным признакам использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса или критерий Z.

Для всех тестов различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Учитывая, что критерий Стьюдента не может служить показателем диагностической эффективности теста, так как на его величину оказывает влияние величина исследуемой выборки, то при оценке результатов применения диагностического критерия определяли операционные характеристики теста, позволяющие оценить вероятность ошибок I (ложноположительные) и II (ложноотрицательные) типов.

Для определения эффективности теста рассчитывали его чувствительность и специфичность. Чувствительность теста рассчитывалась как доля больных определенной группы, обладающих признаком (положительным

результатом теста). Специфичность теста определялась как доля лиц, не принадлежащих определенной группе больных, не обладающих признаком (отрицательным результатом теста).

Выживаемость оценивали при помощи процедуры Каплана-Мейера или процедура выживания. Важным преимуществом процедуры Каплана-Мейера, является то, что этот метод может использоваться при работе с цензурированными данными, т.е. учитывается, что пациенты могут выбывать в ходе лечения.

Индекс диагностической эффективности представляет долю истинных результатов теста в общем количестве проведенных исследований.

Глава 3.

Результаты и обсуждение

3.1. Анализ клинического полиморфизма синдрома Бругада.

Синдром Бругада (BrS, OMIM: #601144) - наследственное нарушение сердечного ритма, характеризующееся подъемом сегмента ST в правых грудных отведениях (V_1 - V_3) и высоким риском кардиогенной внезапной смерти вследствие развития полиморфной желудочковой тахикардии. СБ проявляется спонтанным специфическим паттерном (т.н. «Бругада-паттерном») на ЭКГ, который обычно выявляется случайно. Заболевание может сопровождаться синкопальными состояниями, а внезапная смерть может наступить во время первого в жизни синкопе.

Первоначально считалось, что это заболевание встречается только в странах Юго-Восточной Азии. Однако в настоящее время его частота оценивается в 1-5:10000 во всех этнических группах [105]. Имеются данные, что это заболевание является ответственным не менее, чем за 10% всех случаев внезапной смерти, и не менее, чем за 20% внезапных смертей у лиц без структурных изменений миокарда не только в отдельных этнических группах, но практически повсеместно [30, 87].

Единственное популяционное исследование частоты СБ в России было выполнено Дупляковым Д.В и соавт. в 2007 году. Авторами был выполнен скрининг электрокардиограмм 42779 жителей Самарской области, среди которых были выявлены 20 пациентов с СБ. Таким образом, расчётная частота заболевания среди взрослых лиц составила около 1:10000 [4]. В Иране крупных эпидемиологических исследований, направленных на определение частоты встречаемости СБ, не проводилось.

Нами были обследованы 31 российская и 50 иранских неродственных семей, в которых хотя бы одному члену семьи был поставлен диагноз СБ,

из них 50 случаев (62%) были семейными (более одного больного в семье), 31 случай (38%) были изолированными (спорадическими).

Всего было обследовано 81 пробанд и 144 родственника, из которых у 88 человек был клинический диагноз СБ, а 56 были клинически здоровы.

Всем больным было проведена трансторакальная эхокардиография. Ни у кого из больных не было выявлено структурных нарушений в миокарде. Также пациенты не предъявляли экстракардиальных жалоб в нашей группе.

В обследованной нами группе, 19% пациентов не имели никаких жалоб на момент выявления особенностей на ЭКГ. Характерный ЭКГ-паттерн либо выявляется случайно при профилактическом обследовании, либо при обследовании по поводу синкопальных состояний. Таким образом, СБ длительное время может оставаться бессимптомным.

Средний возраст постановки диагноза СБ составил 38 ± 13 лет, минимальный возраст 2 года, максимальный 67 лет. Это согласуется с имеющимися описаниями СБ в других странах, согласно которым преимущественный возраст манифестации СБ составляет 30-40 лет (в диапазоне от 2 до 85 лет).

Мы проанализировали распределение по полу среди пробандов в изученной группе пациентов. В группе больных соотношение больных по полу (М:Ж) составило 7:1 (Таблица 3.1).

Таблица 3.1.

Распределение по полу у пациентов с СБ

Пол	Число пробандов, чел/ (%)	Всего больных, чел(%)
Мужской	72 (89%)	148 (87%)
Женский	9 (11%)	21 (13%)

Заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу, не известно ни одного гена, ответственного за СБ, который был бы

локализован на X-или на Y-хромосоме. Классическая форма доминантного наследования предполагает равное поражение обоих полов. Тем не менее, более 80% пациентов с СБ в западных странах и более чем 90% больных с СБ в азиатских странах - мужского пола [22, 56, 59]. Наши результаты согласуются с распределением больных по полу в других странах.

Природа неравновесия по полу настоящее время достаточно не изучена. Одна из гипотез связывает различия в манифестации СБ с более высоким уровнем тестостерона у мужчин, который предположительно обуславливает большую амплитуду кратковременного выходящего тока ионов калия I_{to} у мужчин (одного из токов, участвующих в фазе 1 потенциала действия в эпикардальном отделе правого желудочка (ПЖ)). Другая точка зрения предполагает, что гендерные различия при проявлении СБ связаны с физиологически более медленным I_{to} у женщин, что естественным образом предохраняет от падения уровня деполяризации в фазе «плато» потенциала действия кардиомиоцита [45, 98]. Увеличение калиевого тока (I_{to} - Преходящий компонент исходящего калиевого тока) может приводить к сходному эффекту, однако этот механизм до настоящего времени не был описан у больных СБ.

Мы провели сравнение особенностей проявлений заболевания у больных разного пола (Таблица 3.2).

Таблица 3.2.

Клиническая характеристика пробандов.

Клиническая характеристика	Пол (число пробандов)		Достоверность (значение p)
	М (72)	Ж (9)	
Возраст, лет	37± 13	41± 10	p>0.05*
Семейный анамнез ВСС	38	7	p>0.05
Синкопальная форма	36	5	p>0.05
Реанимация после ВСС	10	2	p>0.05

Суправентрикулярная аритмия	8	2	p>0.05
Интервал PR (мс)	181± 25	168± 29	p>0.05
Интервал QTc (мс)	402±62	392±40	p>0.05
Бругада-паттерн 1-го типа на ЭКГ	31	4	p>0.05
Имплантиция ИКД	57	3	p>0.05
ЖТ/ФЖ или мотивированные разряды ИКД	32	4	p>0.05

* p>0.05 : Недостоверно

Ни по одному из изученных параметров достоверных отличий между мужчинами и женщинами с установленным диагнозом СБ выявлено не было. Таким образом, если у женщины манифестация заболевания всё-таки развивается, то его течение не имеет гендерных особенностей. Небольшое число женщин в группе больных (9 человек) может быть фактором, ограничивающим статическую мощность исследования. Кроме того, по-прежнему остаётся неясным, почему клинические проявления СБ преимущественно наблюдаются у мужчин.

Разграничение пациентов, имеющих ЭКГ-паттерн 1 типа или 2 типа является сложной задачей, так как форма Бругада-паттерна изменяется во времени и зависит от местоположения электродов в отведениях V₁-V₂. В обследованной группе больных наблюдались следующие кардиографические феномены: спонтанный Бругада-паттерн типа 1 был выявлен у 35 пробандов (43%), Бругада-паттерн 2 типа на ЭКГ был выявлен у 46 пробандов (57%) (Табл 3.3) (Рис. 3.1 и Рис. 3.2).

Таблица 3.3.

Соотношение различных электрокардиографических вариантов Бругада-паттерна (1-го и 2-го типа) у пробандов.

Вариант Бругада-паттерна	Число пробандов	Доля (%)
1 типа (Рисунок 3.1)	35	43%
2 типа (Рисунок 3. 2)	46	57%

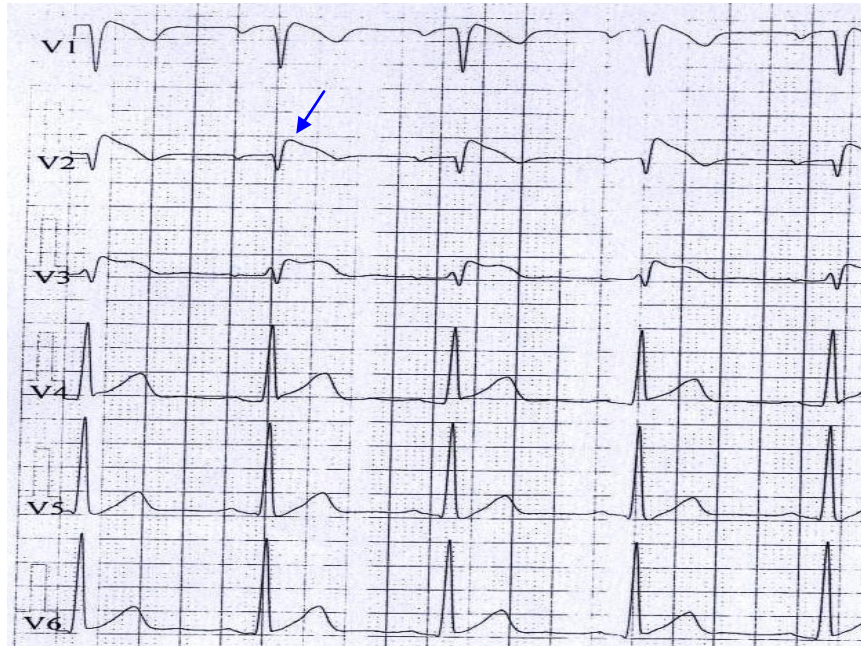


Рисунок 3.1. Фрагмент ЭКГ (V₁-V₆) пробанда № 11. Бругада-паттерн 1 типа на ЭКГ, ЧСС 65 уд/мин. Сводчатый ST–Т сегмент указан стрелкой.

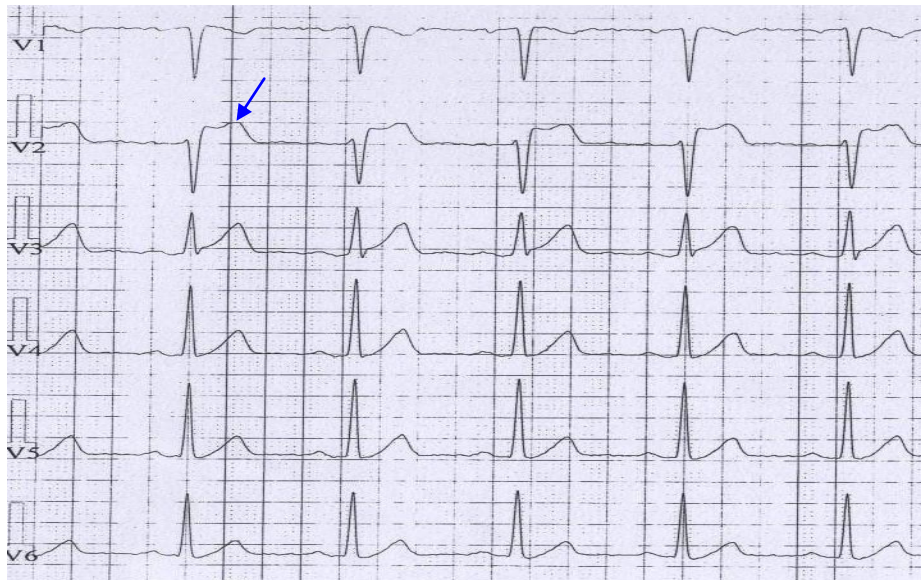


Рисунок 3.2. Фрагмент ЭКГ (V₁-V₆) пробанда 21. Бругада-паттерн 2 типа на ЭКГ, ЧСС 68 уд/мин. Седловидный участок ST–Т сегмента указан стрелкой.

Мы изучили спектр и частоту различных жалоб, наличия синкопальных состояний, нарушений сердечного ритма и внезапной смерти в обследованной группе больных (Рисунок 3.3).

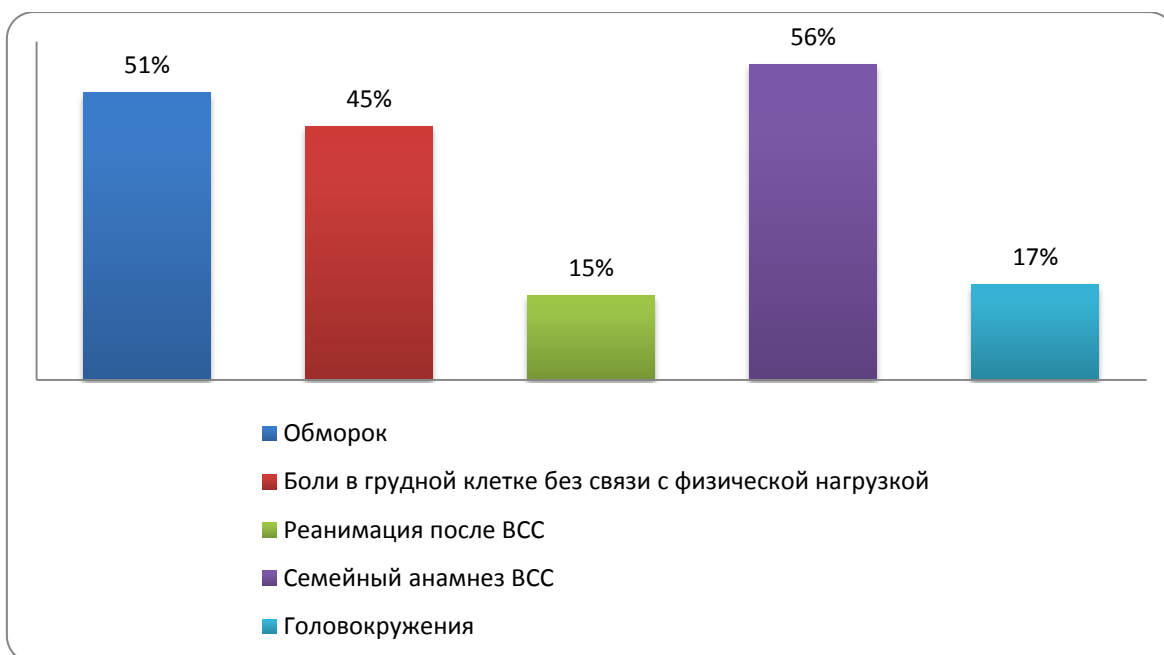


Рисунок 3.3. Частота клинических и анамнестических находок у больных с СБ.

Наиболее частыми анамнестическими феноменами были случаи ВСС в семье (56%), обмороки (51%) и боли в грудной клетке без связи с физической нагрузкой (45%).

В настоящей выборке самой распространенной анамнестической находкой является семейный анамнез ВСС (56%). Однако пациенты редко указывают этот факт при “рутинном” изложении жалоб и во время первого сбора семейного анамнеза. Поэтому уточнение причин смерти родственников должно быть предметом специального интереса врача. Средний возраст ВСС среди родственников без установленного диагноза составил 35 ± 7 лет. Интересно отметить, что этот возраст несколько ниже среднего возраста постановки диагноза СБ (38 ± 13), что указывает на важность тщательного семейного, в том числе генетического, обследования доступных членов семьи, и своевременного выявления малосимптомных случаев заболевания.

Второй по частоте жалобой у больных с СБ являлись синкопальные состояния. В обследованной группе обмороки были установлены более

чем у половины пробандов (51%), средний возраст первого синкопе составил 30 ± 11 лет.

Большинство обмороков случались рано утром или после еды, что может быть ассоциировано с повышением тонуса блуждающего нерва. Такие часто приводящие к нарушениями ритма сердца провоцирующие факторы, как физическая и эмоциональная нагрузка, пациентами отмечены не были.

Мы проанализировали частоту и характер нарушений и проводимости сердечного ритма у больных с СБ (Рисунок 3.4).

ФП и СССУ в нашем исследовании были выявлены у 20% пациентов. Такая же частота наджелудочковых нарушений ритма наблюдалась в исследовании Miyamoto и соавт [96]. Спектр нарушений ритма при СБ довольно обширен. Суправентрикулярные аритмии или синдром слабости синусового узла (СССУ) могут быть первым проявлением СБ или сопутствовать его классическим электрокардиографическим проявлениям [26, 57]. Описаны высокая частота спонтанных предсердных аритмий, которые имеют возраст-зависимый характер [59].

Среди обследованных больных у 45% были выявлены желудочковые аритмии (у 32% пациентов - только желудочковые тахикардии, у 13% больных - ЖТ в сочетании с ФП или СССУ) (Рисунок 3.4). Желудочковые аритмии при СБ являются одним из главных факторов риска ВСС, так как даже единственный эпизод ЖТ/ФЖ может закончиться летально [26, 77, 113].

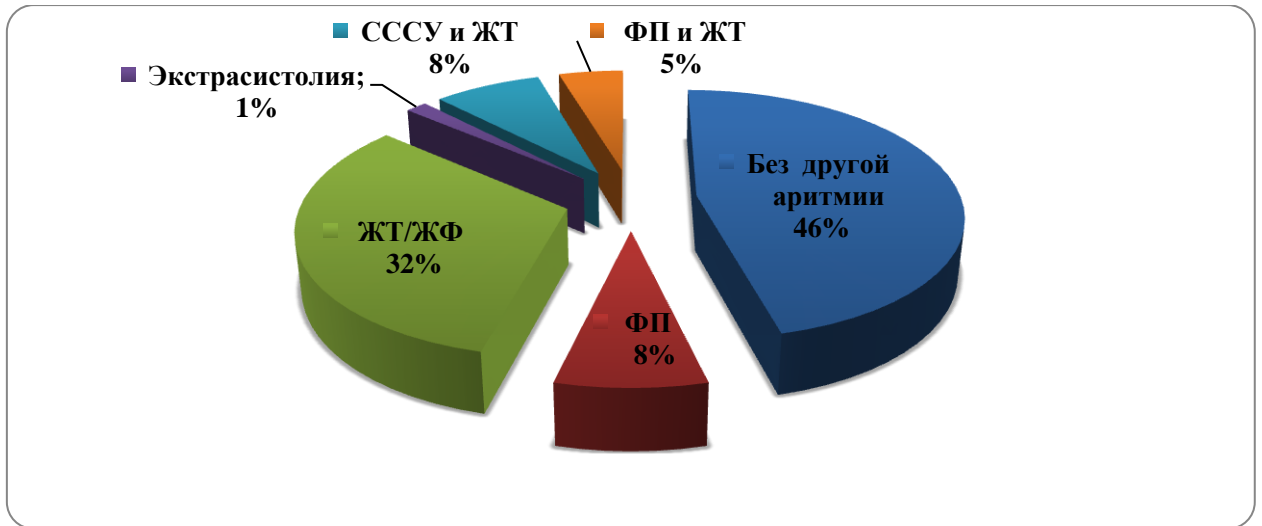


Рисунок 3.4. Частота и спектр нарушений ритма у больных с СБ.

Хотя головокружения не были ранее известны как частый симптом при СБ, в нашей группе стойкие жалобы на головокружения были отмечены у 17% пациентов. Поэтому мы полагаем, что при головокружениях неясного генеза рекомендуется провести, по крайней мере, одно ЭКГ исследование с целью исключения синдрома Бругада.

Как показал анализ клинических проявлений, жалобы при СБ носят неспецифический характер, и могут быть интерпретированы как кардиогенные, или как нейрогенные. В сочетании с транзиторным характером ЭКГ-паттерна, это может являться причиной поздней диагностики заболевания.

Мы считаем, что «таргетными» группами, в которых могут быть недиагностированные случаи СБ, являются не только группы больных с нарушениями сердечного ритма, но и пациенты с диагнозами неврологических заболеваний. СБ следует иметь в виду при обследовании пациентов с обмороками неясной этиологии, эпилепсией, резистентной к терапии, головокружениями.

3.2. Молекулярно-генетическое исследование в группе больных с синдромом Бругада.

Для выполнения молекулярно-генетического исследования был сформирован банк ДНК пациентов с СБ, состоящий из образцов ДНК пациентов из 31 российской и 50 иранских неродственных семей (81 пробанд и 144 кровных родственников), в которых хотя бы одному человеку был поставлен диагноз СБ. Пациенты наблюдались в РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского и Сердечно-сосудистом центре им. Шахид Раджайи, Тегеран, Иран.

3.2.1. Молекулярно-генетический анализ гена *SCN5A* в группе больных с синдромом Бругада.

В Иране систематический поиск мутаций при этом заболевании не проводился. Первые работы по изучению спектра мутаций в гене *SCN5A* в России проводились в Медико-Генетическом Научном Центре РАМН [Заклязьминская Е. В., 2005, 2006].

В гене *SCN5A* нами были выявлены 16 мутаций в 16 неродственных семьях, что составило 19.7% обследованных семей. Интересно отметить, что все пробанды, у которых выявлены мутации в гене *SCN5A*, были мужского пола. Таким образом, если оценить выявляемость мутаций с учётом пола пробанда, то частота выявления мутаций в гене *SCN5A* составляет 22.2% у пробандов–мужчин. Ни у одной из 9 женщин-пробандов мутаций в гене *SCN5A* выявлено не было. По-видимому, женский пол пробанда является негативным предсказательным признаком выявления мутаций в гене *SCN5A*. По данным европейских и американских авторов, доля *SCN5A*-опосредованных форм среди больных с СБ в соответствующих популяциях составляет 15-30%, что согласуется с данными, полученными в настоящем исследовании.

Результаты молекулярно-генетического исследования гена *SCN5A* представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4.

Мутации, выявленные в гене *SCN5A* у больных СБ.

	Нуклеотидная замена	Изменение белка	Экзон/Интроны	Область белка	Функциональный эффект	Ссылки
1	c.260A>G	p.Y87C	2	N-terminal	Не изучено	Новая
2	c.1657G>T	p.E553*	12	DI-DII	Снижение плотности субъединиц Nav1.5 (гаплонедостаточность)	Новая
3	c.2204C>T	p.A735V	14	DII-S1	Снижение натриевого тока I_{Na} в фазы 1 ПД	Vetta et al.2002; Kapplinger et al. 2010.
4	c.2332C>T	p.Q778*	15	DII-S2/S3	Снижение плотности субъединиц Nav1.5 (гаплонедостаточность)	Новая
5	c.2542-2544del	p.I848del	16	DII-S5	Не изучено	Новая
6	c.2677G>A	p.R893H	16	DII-S5/S6	Снижение натриевого тока I_{Na} в фазы 1 ПД	Kapplinger et al. 2010.
7	IVS16S-5A>G	Нарушение сплайсинга	IVS16	DII-S6	Снижение плотности субъединиц Nav1.5 (гаплонедостаточность)	Новая
8	c.3577C>G	p.R1193W	20	DII-DIII	Не изучено	Новая

9	c.3946C>T	p.R1316*	22	DIII /S4-S5	Снижение плотности субъединиц Nav1.5 (гаплонедостаточность)	Catalano et al, 2009.
10	IVS24S+1 G>A	Нарушение сплайсинга	IVS24	DIII /S5-S6	Снижение плотности субъединиц Nav1.5 (гаплонедостаточность)	Новая
11	c.4302T>G	p.Y1434*	25	DIII/S5- S6	Снижение плотности субъединиц Nav1.5 (гаплонедостаточность)	Kapplinger et al, 2010.
12	c. 4511- 4519del	p.KPQ (1505-1507) del	26	DIII-DIV	Ускоренная инактивация	Wang et al, 1995; Splawski et al, 2000; Tester et al, 2005; Postema et al, 2010.
13	c.4516C>T	p.P1506S	26	DIII-DIV	Ускоренная инактивация	Новая
14	c.5129C>T	p.S1710L	28	DIV /S5-S6	Ускоренная инактивация	Akai et al, 2000; Shirai, 2002.
15	c.5360G>A	p.S1787N	28	c-terminal	Не изучено	Новая
16	c.5755C>T	p.R1929C	28	c-terminal	Не изучено	Новая

Десять из 16 (62.5%) мутаций были новыми, впервые выявленными в рамках настоящей работы. Для этих впервые выявленных замен было проведено популяционное исследование в контрольных группах здоровых лиц той же этнической принадлежности. Ни одной из этих замен в контрольной группе выявлено не было.

В семейных случаях заболевания проанализирована сегрегация этих вариантов с СБ. Во всех случаях выявленные варианты сегрегировали совместно с заболеванием, кроме замены p.P1506S в гене *SCN5A* (семья №46). Клинические и генетические особенности больных в семье №46 будут обсуждены отдельно (раздел 3.2.4).

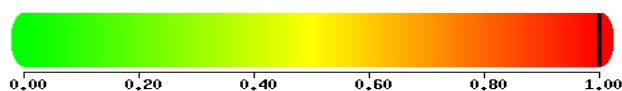
Была выполнена оценка консервативности исследуемой области, проведены биоинформационный анализ и функциональные исследования вариантов. Так как у нас не было технической возможности выполнить экспериментальный анализ всех новых замен, потенциальный функциональный эффект миссенс-мутаций p.Y87C, p.R1193W, p.S1787N и p.R1929C был проанализирован *in silico* с помощью программного обеспечения PolyPhen-2 и SIFT. (Рисунок 3.5, А-Г).

А)

SIFT

Вариант	PROVEAN балл	Прогноз
Y87C	-8.255	(Повреждающий)

PolyPhen-2

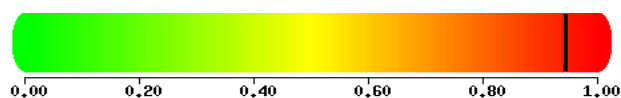


Б)

SIFT

Вариант	PROVEAN балл	Прогноз
R1193W	-3.976	(Повреждающий)

PolyPhen-2

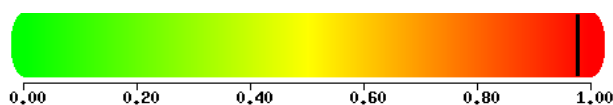


В)

SIFT

Вариант	PROVEAN балл	Прогноз
S1787N	-2.318	(Нейтральный)

PolyPhen-2



Г)

SIFT

Вариант	PROVEAN балл	Прогноз
R1929C	-2.668	(Повреждающий)

PolyPhen-2

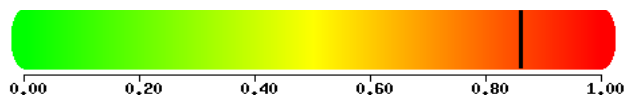


Рисунок 3.5. Результат предиктивного анализа патогенности вариантов р.Y87C (А), р.R1193W (Б), р.S1787N (В) и р.R1929C (Г) в при помощью онлайн-ресурсов SIFT и PolyPhen-2.

Ниже представлены результаты оценки консервативности найденных замен у разных видов млекопитающих:

<i>Homo sapiens</i>	LDPFYSTQK
<i>Macaca mulatta</i>	LDPFYSTQK
<i>Mus musculus</i>	LDPFYSTQK
<i>Rattus norvegicus</i>	LDPFYSTQK
<i>Homo sapiens</i> Y87C	LDPFCSTQK

<i>Homo sapiens</i>	VWWRLRKT
<i>Macaca mulatta</i>	VWWRLRKT
<i>Mus musculus</i>	VWWRLRKT
<i>Rattus norvegicus</i>	VWWRLRKT
<i>Homo sapiens</i> R1193W	VWWVLRKT

<i>Homo sapiens</i>	TEPLSEDDF
<i>Macaca mulatta</i>	TEPLSEDDF
<i>Mus musculus</i>	TEPLSEDDF
<i>Rattus norvegicus</i>	TEPLSEDDF
<i>Homo sapiens</i> S1787N	TEPLNEDDF

<i>Homo sapiens</i>	FLFRQQA
<i>Macaca mulatta</i>	FLFRQQA
<i>Mus musculus</i>	FLFRQQA
<i>Rattus norvegicus</i>	FLFRQQA
<i>Homo sapiens</i> R1929C	FLFCQQA

Таким образом, все варианты находятся в высоко консервативных регионах белка. Широко распространена точка зрения, что мутации в аминокислотной последовательности высоко консервативных регионов приводят к изменению функциональных свойств белка.

В соответствии с результатами биоинформатического анализа замен, новые варианты p.Y87C, p.R1193W, p.S1787N и p.R1929C с высокой вероятностью влияют на функционирование белка. Учитывая данные анализа *in silico*, отсутствие этих вариантов в контрольной группе и сегрегацию с заболеванием, мы квалифицируем эти варианты как патогенные мутации.

Для миссенс-замены p.P1506S было проведено экспериментальное исследование функционального эффекта мутации на характеристики натриевого канала Nav1.5. Для оценки электрофизиологических свойств мутантного натриевого канала было проведено экспериментальное электрофизиологическое исследование с использованием клеточной линии НЕК293 совместно с группой проф. Абриеля (Университет г. Берна, Швейцария).

Для исследования функционального влияния мутации p.P1505S на функцию Na^+ канала, была проведена серия экспериментов с использованием методики определения клеточного мембранного потенциала на клеточной линии НЕК293, экспрессирующих мутантный белок. Наличие мутации p.P1506S индуцировало снижение функции натриевого канала Nav1.5 (сдвиг кривой инактивации влево, ускорение инактивации Nav1.5 и положительный сдвиг кривой активации) (Рисунок 3.6 и Таблица 3.5).

Клетки, экспрессирующие мутантный ионный канал, характеризовались снижением плотности тока Nav1.5 (плотность тока при -20 mV (pA/pF): -119 ± 21 (n=6) vs. -58 ± 16 (n=8), $**p < 0.01$; для “дикого типа” (wt) и мутантного канала, соответственно [Рисунок 3.6.A, B]). Состояние

стойкой активации было сдвинуто в сторону более положительного потенциала ($V_{1/2}$ акт: -24 ± 2 mV (n=6) vs. 15 ± 2.8 mV (n=8) * $p < 0,05$; slope: $6 \pm 0,3$ mV vs. 8.8 ± 0.6 mV, ** $p < 0.01$; для каналов wt и мутантных, соответственно (Рисунок 3.6 C)).

С другой стороны, потенциал-зависимое состояние стойкой инактивации было сдвинуто в сторону более негативных значений потенциала, для Nav1.5-p.P1505S канала ($V_{1/2}$ акт: -66 ± 2 mV (n=6) vs. -80 ± 4 mV (n=8) ** $p < 0.01$; slope: $6.1 \pm 0,5$ mV vs. $5.6 \pm 0,2$ mV; для каналов wt и мутантных, соответственно (Рисунок 3.6 C)).

Скорости активации и инактивации были увеличены в мутантных каналах по сравнению с wt каналами (Рисунок 3.6 D, E). Однако не наблюдалось никаких существенных различий в скорости восстановления после быстрой инактивации ($t_{1/2}$ выхода из восстановления от инактивации: 9.4 ± 1.3 мс (n=4) vs. $9,3 \pm 1$ мс (n=7); (Рисунок 3.6 F)).

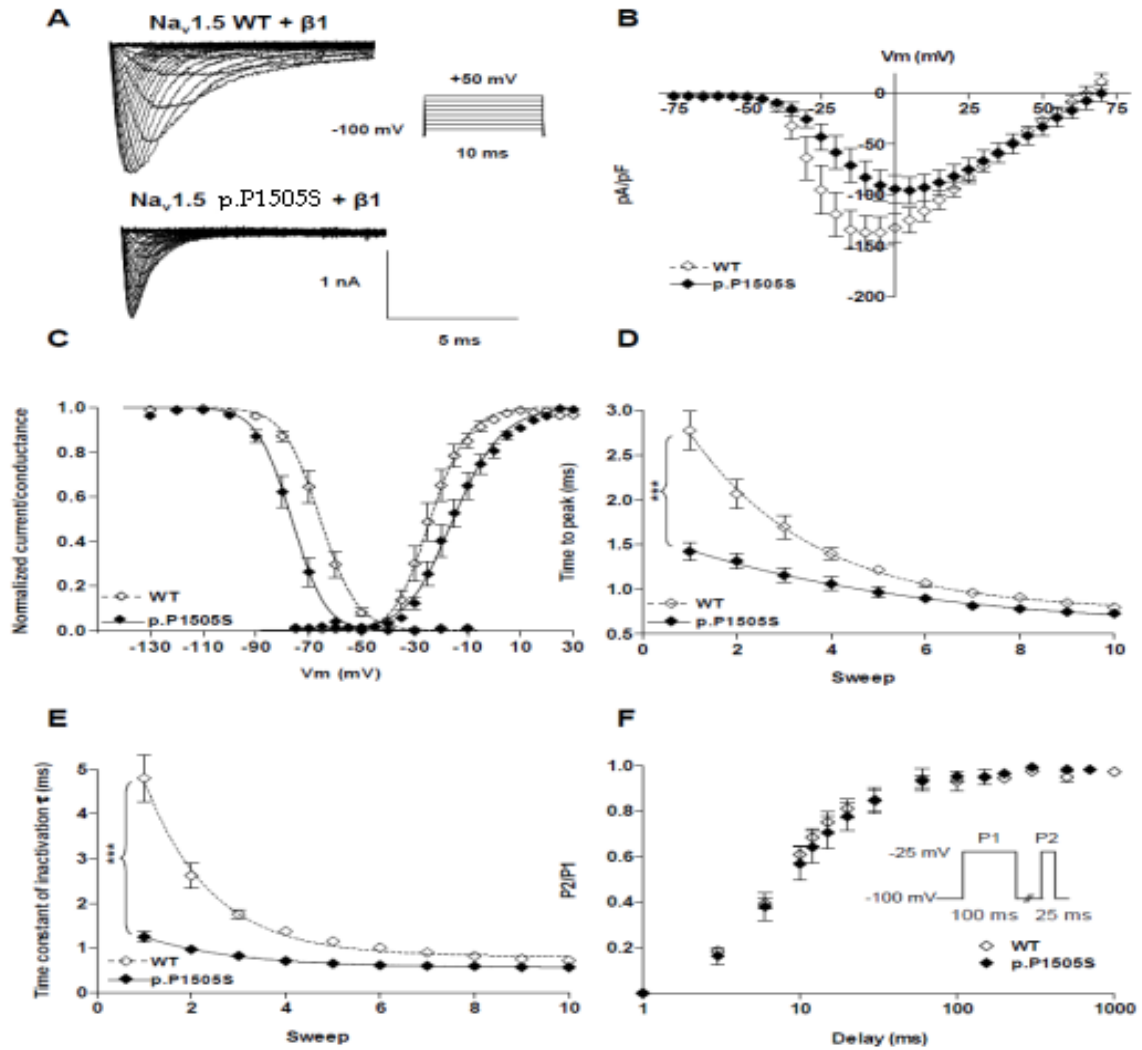


Рисунок 3.6. А: Сравнение проводимости I_{Na} нормального «дикого» типа и мутантного каналов. В, С, D, Е, F: Сопоставление кривых активации и инактивации wt и мутантного каналов.

Сдвиг кривой инактивации мутантного белка в сторону более положительного мембранного потенциала означает, что при одном и том же мембранном потенциале в случае мутации меньшее число субъединиц канала активировано, и в целом, реализуется в снижении натриевой проводимости через канал (loss of function, потеря функции канала).

Таблица 3.5.

Электрофизиологические характеристики Nav1.5-P1506S.

	WT	p.P1506S
Максимальная плотность тока (pA/pF)	-137.9±16.8; n=6	-82.3± 16 (P<0.01); n=8
Потенциал активации (мВ)	V _{1/2} =-23±2; K=6±0.3; n=6	V _{1/2} =-15.6± 3; (P<0.001); K=8.4±0.5; n=8
Потенциал инактивации (мВ)	V _{1/2} =-66±2; K=6.1±0.5; n=6	V _{1/2} =-80±3.7; (P<0.001); K=5.6±0.2; n=8
Восстановление после инактивации, t _{1/2} (мс)	9.4±1.3; n=4	9.3±1; n=3

Таким образом, в эксперименте мы показали значимое отличие мутантной α -субъединицы Nav1.5 по сравнению с α -субъединицей дикого типа. В целом, изменения характеризовались снижением функции канала, что является характерным типом нарушения при синдроме Бругада, поэтому мы считаем возможным рассматривать данный генетический вариант как патогенный, приводящий к СБ.

Кроме миссенс-мутаций, в нашем исследовании были выявлены 2 мутации сплайсинга и четыре нонсенс-мутации. Все эти мутации были выявлены в семейных случаях СБ. В нашем исследовании, во всех 6 семьях, в которых были выявлены мутации, реализующиеся по механизму гаплонедостаточности, наблюдались случаи ВСС среди родственников.

В семье №57, в которой была выявлена мутация с.IVS16S-5A>G, отмечалось накопление случаев внезапной смерти в молодом возрасте (5 родственников умерли в возрасте 38 - 50 лет) (Рисунок 3.7).

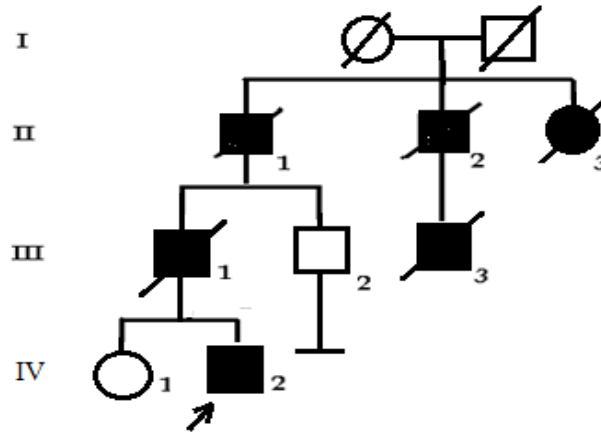


Рисунок 3.7. Родословная семьи №57, в которой была выявлена мутация $c.IVS16S-5A>G$. Родственники, умершие внезапно, отмечены перечеркнутым заполненным символом. Возраст ВСС указан рядом с символом, пробанд указан стрелкой.

В семье №74, в которой СБ обусловлен мутацией $c.IVS24S+1 G>A$, двоюродный брат пробанда умер внезапно в возрасте 18 лет.

Были также выявлены 2 делеции без сдвига рамки считывания: Одной из таких интересных находок в нашей группе была иранская семья №02, в которой была выявлена известная мутация $p.KPQ(1505-1507) del$ в гене *SCN5A* у пробанда и 11 родственников. Ни один из клинически здоровых родственников не был носителем мутации. Интересно, что среди членов семьи носителей этой мутации были больные как с LQTS, так и с СБ (Рисунок 3.8).

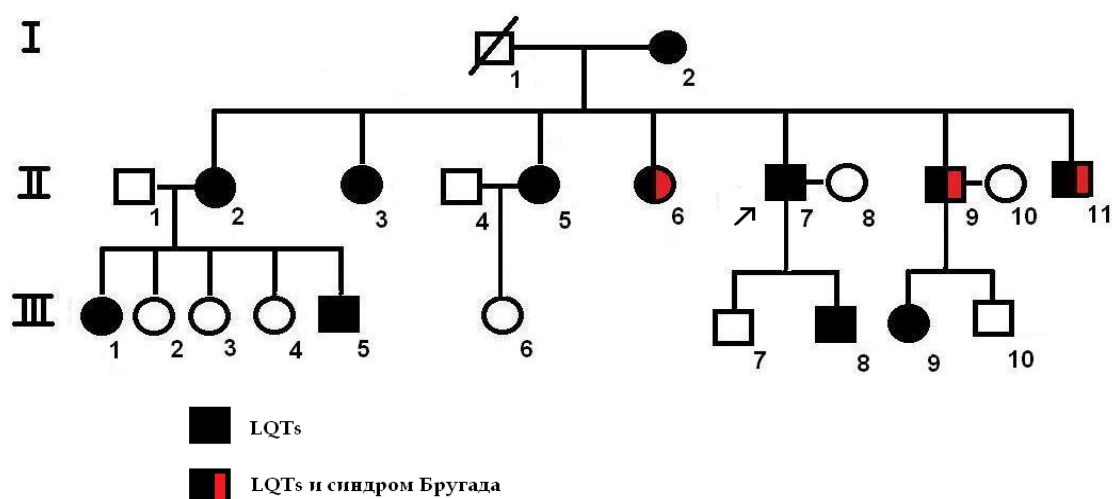


Рисунок 3.8. Родословная семьи №02. Римскими цифрами обозначены номера поколения, арабскими – порядковый номер человека в поколении, пробанд указан стрелкой.

Делеция р.KPQ(1505-1507)del затрагивает область, которая принимает участие во взаимодействии белка Nav1.5 с другими компонентами белкового комплекса, в том числе, с анкирином G и синтрофином- α 1. Предположительно, делеция аминокислот в этом регионе приводит к нарушению взаимодействий между белками и снижению представленности натриевого канала на мембране кардиомиоцита.

Электрофизиологические свойства делеции р.KPQ(1505-1507)del и её роль в аритмогенезе были впервые изучены группой Nuyens и соавт. в 2001 году, на экспериментальной модели мышей, гетерозиготных по мутации р.KPQ(1505-1507)del [52, 82].

Два аллельных заболевания, LQT-3 и СБ, тип 1, являются результатом функционально противоположных нарушений работы натриевого канала. Однако примечательно, что в гене *SCN5A* известны и другие уникальные генетические варианты р.1795insD и р.E1784K, приводящие к развитию обоих заболеваний, причем даже среди членов одной семьи [28, 66, 89].

Как видно из таблицы 3.4, в каждой семье была выявлена уникальная мутация, ответственная за заболевание. Даже те генетические изменения, которые ранее были опубликованы, встретились не более чем в ещё одной семье. Таким образом, у больных с СБ в России и Иране частых мутаций выявлено не было. Нам также не удалось выявить закономерностей в распределении мутаций в гене *SCN5A*. Как видно из рисунка 3.9, мутации относительно равномерно распределены по гену.

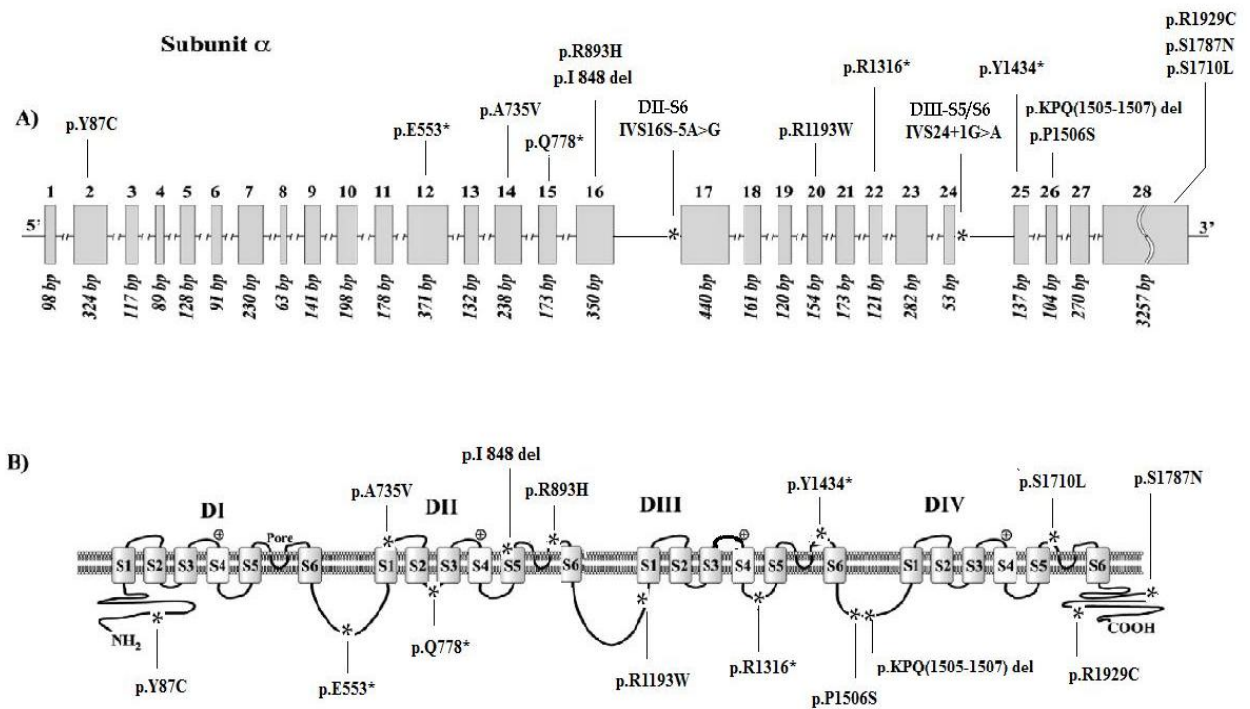


Рисунок 3.9: (А) Схема структуры гена *SCN5A* и (Б) кодируемого им белка $Na_v1.5$ с указанием локализации мутаций, выявленных в настоящей работе.

Поэтому для диагностики синдрома Бругада не может быть предложена простая и недорогая диагностическая система для выявления ограниченного числа генетических вариантов в гене *SCN5A*, которая была бы эффективной в практической медицине [27, 74, 110]. В основе подтверждающей ДНК-диагностики СБ 1 типа, может лежать только

прямое секвенирование всей кодирующей последовательности и прилегающих регуляторных участков гена *SCN5A*.

Мы проанализировали типы выявленных в гене *SCN5A* изменений (Таблица 3.6). Выявленные генетические изменения относятся практически ко всем известным функциональным классам.

Таблица 3.6.

Типы мутаций, выявленных в гене *SCN5A*.

Тип мутации	Число мутаций/ Доля	База данных*
Миссенс	8 (50%)	67%
Нонсенс	4 (25%)	11%
Небольшие делеции	2 (12.5%)	12%
Мутация сайта сплайсинга	2 (12.5%)	7%
Дупликация	0	2%
Инсерция	0	1%

*База данных мутаций при Molecular Cardiology Laboratories IRCCS Fondazione Salvatore Maugeri – Italia и Cardiovascular Genetics New York University (<http://triad.fsm.it/cardmoc/>).

Половина мутаций представлена миссенс-мутациями, в результате которых в первичной последовательности белка происходит замена одной аминокислоты на другую.

При СБ, как правило, эти замены реализуются по типу «loss of function» (снижение натриевого тока I_{Na} в фазе 1 потенциала действия), либо оказывают доминант-негативный эффект.

Вторую половину составляют мутации, которые выявляются по механизму гаплонедостаточности (нонсенс-мутации, небольшие делеции, мутации сайтов сплайсинга). Все эти мутации реализуются по единому механизму, связанному с деградацией мРНК, содержащей преждевременный стоп-кодон. Таким образом, синтезируется и транспортируется в мембрану только нормальный белок, но плотность

субъединиц канала значительно снижена. Соответственно, при снижении плотности нормальных α -субъединиц на мембране клетки электрофизиологические и кинетические характеристики канала останутся сохранными, но суммарный ток I_{Na} через мембрану кардиомиоцитов будет снижен.

Снижение натриевого тока может быть результатом действия нескольких возможных патологических механизмов. Описаны мутации, приводящие к (1) нарушению экспрессии канала; (2) к снижению его проницаемости для ионов натрия, времени его активации, инактивации и реактивации; (3) к снижению плотности нормальных субъединиц (вследствие нарушения стабильности мРНК при гаплонедостаточности, или вследствие нарушения транспорта белка к поверхности клетки).

При этом мы понимаем, что использованный нами метод поиска мутаций с помощью прямого секвенирования по Сенгеру имеет существенные ограничения. В частности, он не позволяет выявлять крупные делеции, инсерции и инверсии, сопоставимые с размером гена или отдельного экзона. К сожалению, у нас не было технической возможности выявлять подобный тип мутаций. По литературным данным, частота крупных перестроек в гене *SCN5A* составляет не более 1% [Eastaugh LJ, 2011].

Таким образом, в результате анализа гена *SCN5A* были установлены следующие основные факты: частота мутаций в гене *SCN5A* при СБ составила 19.7%; для всех выявленных мутациях было установлено или обоснованно предполагалось снижение функции натриевого канала I_{Na} . Мутации были равномерно распределены по гену, поэтому прямое двунаправленное секвенирование по Сенгеру всей кодирующей последовательности и прилегающих интронных областей является наиболее эффективным путем ДНК-диагностики этой формы синдрома Бругада.

3.2.2. Молекулярно-генетический анализ гена *SNTA1* в группе больных с синдромом Бругада.

Одним из белков, ассоциированных с Nav1.5 каналом, является $\alpha 1$ -синтрофин. Известно, что этот белок оказывает модулирующее действие на активность натриевого канала, и нарушения его работы могут сказываться на результирующей активности белков-мишеней. Поэтому мы считаем, что ген *SNTA1*, кодирующий данный белок, может также рассматриваться в качестве кандидатного гена для всех аритмогенных синдромов, для которых показана патогенетическая роль гена *SCN5A*, в том числе, для синдрома Бругада. Косвенным подтверждением этой гипотезы может служить тот факт, что недавно была впервые показана роль мутаций в гене *SNTA1* при синдроме удлиненного интервала QT в работе Ueda et al., в 2008 г. [37, 111]. Было показано, что мутации в гене, кодирующем синтрофин А, реализуются опосредованно, через нарушение активности канала Nav1.5 [37, 111].

В основе аритмогенеза лежит нарушение взаимодействия синтрофина с α -субъединицей натриевого канала $Na_v1.5$, отвечающего за фазу 1 потенциала действия в кардиомиоците. Предположительно, при дефиците синтрофина существенно снижается уровень экспрессии белка Nav1.5 и отмечается снижение натриевого тока.

Мы провели поиск мутаций в гене *SNTA1* в нашей выборке больных. В результате исследования были выявлены 3 редких генетических варианта в 4 неродственных семьях (Таблица 3.7), что составило 5%.

Замены, выявленные в гене *SNTA1*.

№	Нуклеотидная замена	Замена белка	Пол	Вероятная значимость	Область белка	Частота аллеля в группе больных с СБ	Частота аллеля в контрольной группе
1	с. 317 G>A	p.R106Q	М	Полиморфизм	PDZ-домен	2/162 (0.01%)	1/200
2	с. 317G>A	p.R106Q	Ж		PDZ-домен	2/162 (0.01%)	1/200
3	с.784A>C	p.T262P	М	VUCS* (предположительно патогенный)	PH1-домен	1/162 (0.006%)	0/200
4	с.869G>A	p.G290E	Ж	Мутация	Между PH1 и PH2	1/162 (0.006%)	0/200

*VUCS (Variant of Unknown Clinical significance) (вариант с неизвестным клиническим значением)

Таким образом, все генетические варианты в гене *SNTA1*, представляли собой миссенс-замены. Поскольку мы не имели технической возможности провести функциональный анализ, был проведен популяционный анализ и оценка потенциальной значимости выявленных замен *In Silico* при помощи пакетов программ Polyphen-2 и SIFT (Рисунок 3.10 А, В).

В контрольной группе вариант p.R106Q найден у одного человека в гетерозиготном состоянии, варианты p.T262P и p.G290E не найдены (табл 3.7).

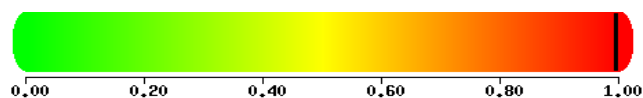


Рисунок 3.10. А. Результат анализа функциональной значимости замены p.G290E в гене *SNTA1* с помощью онлайн-ресурса PolyPhen-2 (патогенная с вероятностью, близкой к 1).

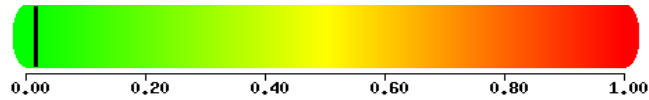


Рисунок 3.10. Б. Результат анализа функциональной значимости замены р.Т262Р в гене *SNTA1* с помощью онлайн-ресурса PolyPhen-2 (нейтральная замена).

Генетический вариант р.Т262Р был выявлен в гетерозиготном состоянии у больного №56 с синдромом Бругада.

Данная замена описана в литературе как редкая, с предположительно патогенным значением. Она впервые была выявлена при синдроме внезапной детской смерти [Cheng J., 2009], однако клинический статус плода при этом не был точно установлен, а электрокардиографической картины причин, приведших к смерти плода, не получено.

Эта замена затрагивает высоко консервативную область РН1-домена белка синтрофина А. В первом описании этого варианта были также представлены данные функционального анализа. При совместной экспрессии всего макромолекулярного комплекса *SCN5A-nNOS-PMCA4b* с белком *SNTA1*, несущего замену р.Т262Р, в клетках HEK293 отмечено изменение натриевого тока, однако детального описания молекулярного механизма увеличения натриевого тока представлено не было [37].

Генетический вариант р.Г290Е был выявлен в гетерозиготном состоянии у больного №147 с синдромом Бругада.

Таким образом, с учётом клинических данных, результатов предсказательного анализа *in silico* с использованием программы PolyPhen-2, а также отсутствия этих вариантов в контрольной группе пациентов, мы считаем выявленные редкие генетические варианты р. Г290Е мутациями, приводящими к синдрому Бругада.

Мы также проанализировали потенциальное клиническое значение варианта p.R106Q, выявленного в двух неродственных семьях. На рисунке 3.11 представлена родословная одной из семей с выявленной заменой p.R106Q в гетерозиготном состоянии. Нами также были обследованы сестра пациентки и две дочери.

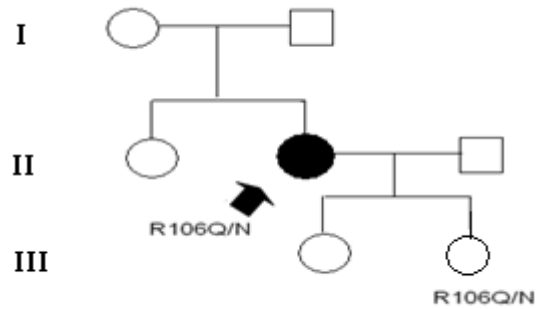


Рисунок 3.11. Родословная пациентки №75. Черной стрелкой обозначен пробанд.

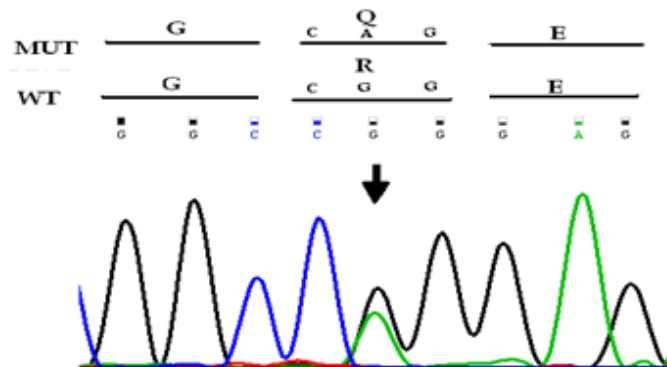


Рисунок 3.12. Фрагменты последовательности 2-го экзона гена *SNTA1* с генетическим вариантом с.317G>A (p.R106Q) (пациентка №75). Стрелкой отмечена нуклеотидная замена в гетерозиготном состоянии.

Замена p.R106Q затрагивает PDZ-домен, обеспечивающий связь α -синтрофина с $\text{Na}_v1.5$. При моделировании вторичной структуры нативного белка *SNTA1* и белка, несущего замену p.R106Q, с помощью интринет-

ресурса APSSP2 выявляется изменение вторичной структуры следующей за заменой области, однако при моделировании третичной структуры (SWISSModel) изменений выявлено не было. Ниже представлена последовательность этого домена белка *SNTA1* для ряда организмов:

<i>Homo sapiens</i>	KGGREN
<i>Macacamulatta</i>	KGGREN
<i>Mus musculus</i>	KGGREN
<i>Rattus norvegicus</i>	KGGREN
<i>Homo sapiens</i> R106Q	KGGQEN

Таким образом, можно сделать вывод, что эта область довольно консервативна, и следует ожидать существенной значимости выявленной нами миссенс-мутации. Однако ресурс PolyPhen-2 оценивает замену p.R106Q в гене *SNTA1* как нейтральную (Рисунок 3.13).

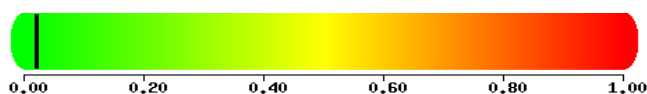


Рисунок 3.13. Результат анализа функциональной значимости замены p.R106Q в гене *SNTA1* с помощью онлайн-ресурса PolyPhen-2.

Так как эта замена была выявлена у больной с семейной формой заболевания, мы провели анализ сегрегации этого варианта с нарушениями ритма и синкопальными состояниями.

На момент госпитализации возраст пробанда №75 составил 33 года; в анамнезе – нарушения ритма сердца (фибрилляция предсердий и желудочковая тахикардия), однократный эпизод кратковременной потери сознания после физической нагрузки, после которого ей была выполнена имплантация ИКД.

На ЭКГ у пациентки выявлена блокада правой ножки пучка Гиса. По результатам клинического обследования пациентке был поставлен диагноз «синдром Бругада». У одной из дочерей пациентки была также найдена замена p.R106Q в гетерозиготном состоянии. Примечательно, что эта замена была выявлена у клинически здоровой дочери, а у той из дочерей, которая также имеет нарушения ритма сердца и эпизоды потери сознания, данная замена выявлена не была. Таким образом, этот генетический вариант не сегрегирует в семье совместно с клинически выраженными нарушениями сердечного ритма.

Кроме того, как видно из таблицы 3.7, этот вариант был выявлен в контрольной группе с частотой 0.5%, а по данным ресурса Exome Variant Server, замена p.R106Q встречается в популяции с частотой 0.035.

Взятые вместе, представленные данные свидетельствуют об отсутствии явного клинического значения замены p.R106Q, которая, вероятнее всего, является нормальным полиморфным вариантом гена.

Таким образом, нами были выявлены две замены, предположительно, имеющие патогенетическое значение при синдроме Бругада - p.T262P и p.G290E.

Мы считаем ген *SNTA1* новым геном-кандидатом, ответственным за синдром Бругада. Частота выявления мутаций в гене *SNTA1* у пробандов с СБ составила более 2%. Среди пробандов-мужчин мутации выявлены у более 1%, среди пробандов-женщин мутации обнаружены у 11%.

Для окончательной верификации патогенетического значения выявленных мутаций запланировано совместное исследование с Университетом г.Берна, включающего проведение экспрессионного анализа мутантных белков.

3.2.3. Поиск мутаций в генах *MOG1*, *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B* и *SCN4B*.

По данным международных регистров больных с СБ, у части пациентов заболевание обусловлено мутациями в генах минорных субъединиц Na⁺ каналов и ассоциированных с ними белков. Чтобы оценить вклад этих генетических форм в структуру СБ в России и Иране, мы выполнили поиск мутаций в генах *MOG1*, *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B* и *SCN4B*. Эти гены кодируют белки, ассоциированные с Na⁺ каналом и регулируют его активность. Мутации в этих генах ранее были выявлены в единичных семьях больных с СБ [78].

При проведении секвенирования полной кодирующей последовательности и прилегающих интронных областей генов *MOG1*, *SCN2B*, *SCN3B* и *SCN4B* генетические изменения не были выявлены ни у российских, ни у иранских больных с СБ.

В гене *SCN1B* были обнаружены два известных генетических варианта с.629T>C (p.L210P) и с.744C>A (p.S248R). Впервые данные об этих вариантах были опубликованы Patino G.A. в 2011 г. Частота выявленных вариантов была оценена в группе больных с СБ и в контрольных группах из 100 здоровых добровольцев (200 аллелей), набранных в России и Иране (Таблица 3.8).

Таблица 3.8.

Частоты выявленных генетических вариантов в гене *SCN1B*.

Выявленный вариант	Частота в группе больных с СБ	Частота в контрольной группе	Различия
p.L210P	0.52	0.44	Недостаточно
p.S248R	0.21	0.18	Недостаточно

Частоты встречаемости обоих вариантов в группах здоровых лиц и группе пациентов с СБ достоверно не различаются.

Был проведен *in silico* анализ выявленных генетических изменений с помощью биоинформатического ресурса PolyPhen-2. Вариант p.L210P оценен как “мягкая” замена с уровнем значимости 0.002 (Рисунок 3.13). Вариант p.S248R также отнесен к “мягким” заменам с уровнем значимости: 0.001 (Рисунок 3.14А и Б).

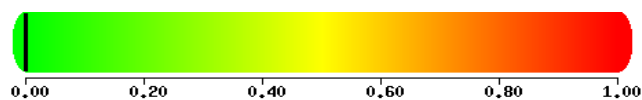


Рисунок 3.14.А. Результат анализа патогенности замены p.L210P в гене *SCN1B* с помощью онлайн - ресурса PolyPhen-2.

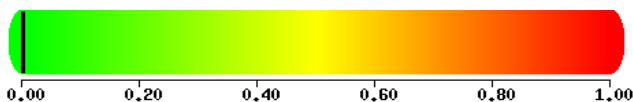


Рисунок 3.14.Б. Результат анализа патогенности замены p.S248R в гене *SCN1B* с помощью онлайн - ресурса PolyPhen-2.

Результаты биоинформатического анализа совместно с результатами популяционного исследования позволяют нам считать, что данные генетические варианты не имеют явного клинического значения.

Мы полагаем, что описанные в единичных публикациях формы синдрома Бругада, связанные с мутациями в генах *MOG1*, *SCN1B*, *SCN3B* и *SCN4B*, являются казуистически редкими как в российской, так и в иранской группах больных, и включение их анализа в схему рутинного генетического обследования пациентов с СБ не является целесообразным.

3.2.4. Дополнительные генетические находки в группе больных с синдромом Бругада

В одной из семей было выявлено нарушение сегрегации мутации с СБ, что потребовало проведения дополнительных исследований.

ДНК пробанда № 46). Стрелкой отмечена нуклеотидная замена в гетерозиготном состоянии.

Подобные случаи нарушения сегрегации генетических и клинических признаков были ранее описаны в трех неродственных семьях, где некоторые из членов семьи с клиническими проявлениями СБ не имели мутации, выявленной у пробанда [57, 65, 90, 107, 114]. Эти находки даже послужили поводом для сомнений в патогенетической роли мутаций в гене *SCN5A* при этом заболевании.

Одним из наиболее вероятных объяснений отсутствия сегрегации мутации с заболеванием может быть наличие в семье независимой формы СБ, обусловленной мутациями в другом гене.

Для проверки этой гипотезы мы провели дополнительное секвенирование методом полупроводникового секвенирования генов *KCNQ1*, *KCNE2*, *KCNE3*, *KCNE1*, *KCNJ2*, *KCNH2*, *SCN1B*, *SCN3B*, *SCN4B*, *SNTA1* и *SCN5A* на платформе PGM Ion Torrent. В результате у больного Ш.9 была выявлена независимая миссенс-мутация (p.R25W) в гене *KCNH2* - изоформе С (herg-b) (Рисунок 3.17). Мутации в этом гене также были ранее описаны в качестве причины синдрома Бругада [Wang Q; 2014].

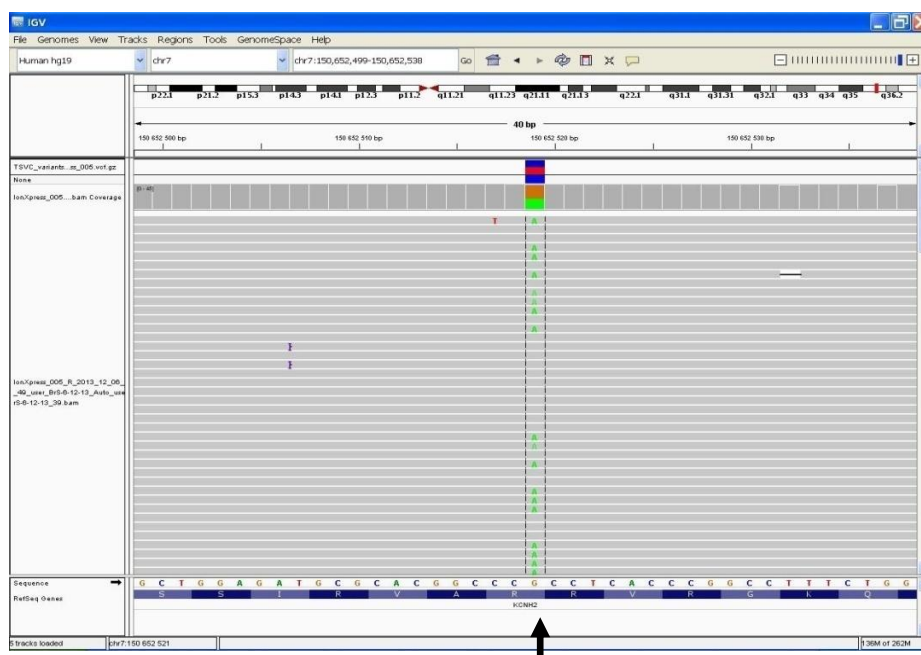


Рисунок 3.17. Мутация p.R25W в гене *KCNH2* в гетерозиготном состоянии, обнаруженная в результате полупроводникового секвенирования на платформе PGM Ion Torrent. Визуализация в программе Integrative Genomics Viewer. Положение нуклеотидной замены указано стрелкой.

Затем был выполнен каскадный скрининг мутации p.R25W в гене *hERG-1b* у других членов семьи. В результате данная мутация была обнаружена у следующих членов семьи: II.3, II.5, III.3, III.6, III.7 и III.8 (Таблица 3.9).

Таблица 3.9.

Клинические и генетические данные членов семьи №46.

	Пол	<i>SCN5A</i> p.P1506S	<i>KCNH2</i> p.R25W	Бругада-паттерн на ЭКГ покоя		Синкопе	HR	PR мс	QTc мс	ИКД
				Спонтанный	Нагрузочная проба с блокаторами натриевых каналов					
II.2 Пробанд	М	+/-	-/-	СБ тип- 1	Не выполнялась	+	93	180-200	425	+
II.3	М	+/-	+/-	-	+	+	78	180-200	404	+
II.5	М	-/-	+/-	-	отрицательная	+	НД	НД	НД	Нет
II.6	Ж	-/-	-/-	-	не выполнялась	-	67	160-180	428	Нет
III.1	М	+/-	-/-	СБ тип- 1/ 2	+	-	78	200-220	413	Рекомендовано
III.2	М	-/-	-/-	-	Не выполнялась	-	89	160	395	Нет
III.3	Ж	+/-	+/-	-	Отказался	-	81	180-200	390	Нет
III.4	Ж	+/-	-/-	-	Отказался	-	НД	НД	НД	Нет
III.5	М	-/-	-/-	-	Рекомендовано	-	97	160-180	439	Нет

III.6	М	+/-	+/-	-	Рекомендовано	-	65	160-180	428	Нет
III.7	Ж	-/-	+/-	-	Рекомендовано	-	95	160-180	363	Нет
III.8	+	-/-	+/-	-	Рекомендовано	-	73	140-160	404	Нет
III.9	М	-/-	+/-	-	+	+	81	140-160	380	Рекомендовано
III.10	М	-/-	-/-	-	-	-	100	180-200	405	Нет

+ / -: Присутствует в гетерозиготном состоянии

- / -: Генетический вариант отсутствует

НД: Нет данных

Эта замена ранее была выявлена Crotti и соавт. у погибшего антенатально плода [65]. В результате экспрессионного анализа этой мутации, проведенный Crotti и соавт., были получены данные, что она может значимо влиять на калиевый ток и является потенциально патогенной.

Принимая во внимание гипотезу, что p.R25W в изоформе С гена *KCNH2* (*herg-b*) может повлиять на длительность интервала QT, мы сравнили значение скорректированного интервала QT у членов семьи с мутацией в гене *KCNH2* и без мутации в гене *KCNH2* (Таблица 3.10). Продолжительность QTc у пациентов, несущих только вариант *KCNH2*-p.R25W была значительно короче, чем у пациентов с мутацией только в *SCN5A* (p-Value < 0.05).

Таблица 3.10.

Оценка QTc интервала длительности у больных с комбинациями *KCNH2* и вариантов *SCN5A*.

Комбинация генетических вариантов	Число носителей комбинации	QTc, мс
<i>SCN5A</i> : p.P1506S/N; <i>KCNH2</i> : N/N	3	419± 8.4
<i>SCN5A</i> : p.P1506S/N; <i>KCNH2</i> : p.R25W/N	3	407± 19.2
<i>SCN5A</i> : N/N; <i>KCNH2</i> : p.R25W/N	4	382± 20.5

Существование двух или более мутаций не является чем-то необычным при сердечных каналопатиях, учитывая наличие большого числа вовлечённых генов. Частота компаунд-гетерозигот, по данным разных авторов, составляет от 4% до 7.9% в разных когортах пациентов с LQTS, а также были выявлены редкие случаи сочетания трех независимых мутантных аллелей (менее 1% от генотип-позитивных пациентов) [114]. Таким образом, мы считаем, что в данной семье наблюдается сосуществование двух различных генетических вариантов, каждый из которых может быть причиной аритмогенного синдрома.

Дополнительное генетическое исследование было также проведено в семье №67. Нами наблюдались пробанд 19 лет и его мама 39 лет, с признаками СБ и семейным случаем СБ с ВСС родственников мужского пола в возрасте 40 лет. В гене *SCN5A* мутаций не было выявлено.

В качестве дополнительного исследования был проведен скрининг мутаций в генах *KCNQ1*, *KCNE2*, *KCNE3*, *KCNE1*, *KCNJ2*, *KCNH2*, *SCN1B*, *SCN3B*, *SCN4B* и *SNTA1* методом полупроводникового секвенирования на платформе PGM Ion Torrent.

В образце ДНК пробанда в гене *KCNH2* было выявлено новое генетическое изменение p.R397C. Эта замена не была выявлена в контрольной группе. Был проведен анализ выявленного генетического изменения с помощью биоинформатического ресурса PolyPhen-2, который оценил эту замену как патогенную с достоверностью 0.999 (Рисунок 3.18).

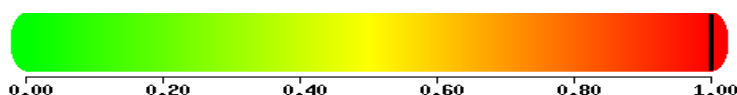


Рисунок 3.18. Результат анализа патогенности замены p.R397C в гене *KCNH2* с помощью онлайн - ресурса PolyPhen-2.

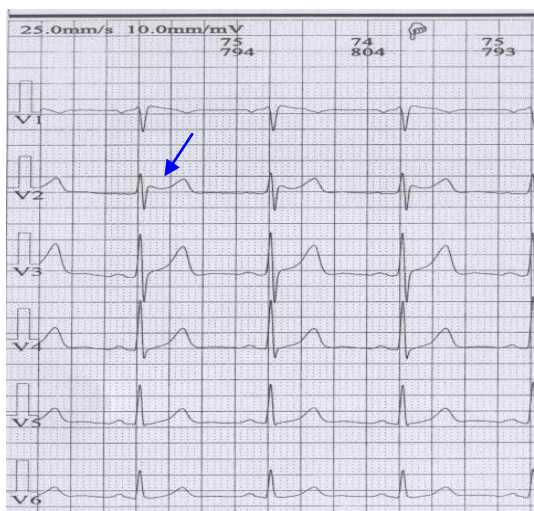
После выявления мутаций в гене *KCNH2* в двух семьях, скрининг мутаций в этом гене был выполнен всем пробандам, но диагностически значимых находок выявлено не было.

Таким образом, в нашей выборке мутации в гене *KCNH2* были обнаружены у 2 пробандов с СБ, что составило более 2%. По литературным данным, доля *KCNH2*-опосредованных форм среди больных с СБ в соответствующих популяциях составляет менее 1% [Nielsen M. V; 2013].

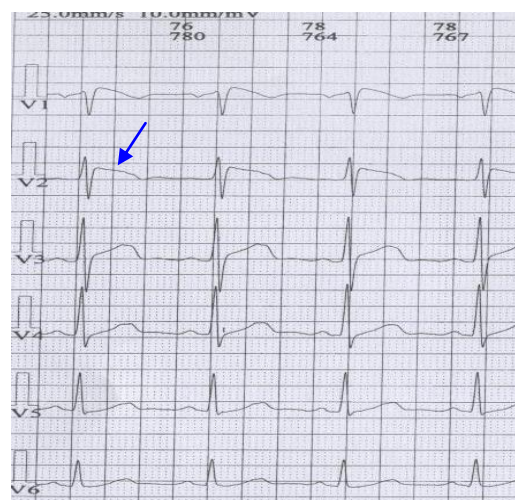
3.3. Хирургическое лечение синдрома Бругада.

Были проанализированы результаты лечения 81 пробанда и членов их семей. В рамках настоящей работы с целью решения вопроса об имплантации кардиовертера–дефибриллятора были обследованы 81 пробанд с СБ, 88 больных родственников и 56 клинически здоровых родственников.

С целью уточнения диагноза и решения вопроса об имплантации кардиовертера–дефибриллятора у пробандов со спонтанным Бругада-паттерном 2-го и 3-го типа на ЭКГ было проведено 69 нагрузочных тестов с использованием блокаторов натриевых каналов (Рисунок 3.19).



А.



Б.

Рисунок 3.19. Пример положительной фармакологической нагрузочной пробы. А. Фрагмент ЭКГ (V_1-V_6) пробанда №36 до введения прокаинамида. Стрелкой указан Бругада-паттерн, тип 2. Б. Фрагмент ЭКГ (V_1-V_6) пробанда №36 после введения прокаинамида. Конверсия в Бругада-паттерн тип 1.

По литературным данным, аймалин является наиболее эффективным препаратом в диагностике СБ [55]. Однако в связи с тем, что аймалин недоступен для исследования, были использованы по стандартному протоколу флекаинид (400 мг per os) или прокаинамид (внутривенно, 10мг/10мин). Проба с флекаинидом была выполнена 20 пробандам и 18 членам их семей. Положительные результаты пробы с флекаинидом показали 13 пробандов (65%) и 16 членов семей (88%). Проба с прокаинамидом была выполнена 26 пробандам и 5 членам их семей, в 100% случаев был получен положительный результат. Всем пациентам, показавшим отрицательный результат нагрузочного теста с флекаинидом, также была проведена повторная проба с прокаинамидом, чтобы избежать ложноотрицательного результата тестирования. Повторная проба также в 100% случаев была положительной. Результаты фармакологических нагрузочных проб представлены в Таблице 3.11.

Таблица 3.11.

Результаты проведения фармакологических нагрузочных проб, проведенные больным и их родственникам.

Пациенты, которым выполнялись нагрузочные пробы	Результат нагрузочных проб	
	Флекаинид Выполнено (доля положительных, %)	Прокаинамид Выполнено (доля положительных, %)
Пробанды (n=46)	20 (65%)	33 (100%)
Члены семей (n=23)	18 (88%)	7 (100%)

У 9 пациентов результаты нагрузочной пробы с флекаинидом были отрицательными (23%), однако они имели положительный результат (конверсия Бругада-паттерна 2 типа в Бругада-паттерн 1 типа, являющийся диагностическим критерием для СБ) после внутривенного введения прокаинамида.

Согласно полученным данным, прокаинамид является более эффективным препаратом для обнаружения скрытого СБ, чем флекаинид. Он может являться препаратом выбора в отсутствие аймалина. Прокаинамид также эффективен в качестве альтернативного препарата при отрицательном результате лекарственного теста с флекаинидом. Использование двух последовательных лекарственных нагрузочных тестов (при отрицательном результате первой пробы) позволило подтвердить диагноз СБ у всех пациентов с Бругада-паттерном 2-го типа, которые вошли в исследование.

Показания к оценке риска ВСС и имплантации ИКД у пациентов с СБ активно обсуждаются, но остаются противоречивыми. Много разногласий вызывают показания к выполнению и интерпретация результатов ЭФИ. В нашей выборке процедура эндокардиального ЭФИ была предложена 6 больным, демонстрировавшим бессимптомный Бругада-паттерн I типа. От всех 6 пациентов было получено информированное согласие на проведение данного исследования. По протоколу, ФЖ или ПЖТ может быть индуцирована при стимуляции выводного отдела ПЖ на базовой частоте 500 Hz и интервалах сцепления 230-220-220 мс. При проведении эндокардиального ЭФИ были индуцированы ФЖ или ПЖТ у 3 из 6 пробандов с СБ (50%). Показания к имплантации ИКД у пациентов с СБ обсуждаются в международном руководстве по лечению СБ, опубликованном в 2005 году, и в руководстве по диагностике и терапии для пациентов с синдромом удлиненного интервала QT с СБ (2011) (Рисунок 1.23, Таблица 1.7).

Мы оценили состояние больных через 16 месяцев после выполнения ЭФИ (Таблица 3.12).

Таблица 3.12.

Результаты динамического наблюдения в течение 16 месяцев пациентов с СБ, которым было выполнено эндокардиальное ЭФИ.

Пробанд	Индукция ФЖ/ПЖТ	ИКД	ЖТ/ФЖ, синкопе или остановка сердца в течение 16 месяцев
№3	Да	Да	Зарегистрирован
№5	Нет	Нет	Зарегистрирован
№11	Да	Да	Не зарегистрирован
№14	Нет	Нет	Не зарегистрирован
№53	Да	Да	Зарегистрирован
№68	Нет	Нет	Не зарегистрирован

Наиболее важной находкой мы считаем произошедший обморок и эпизод ФЖ, зарегистрированный у пробанда №5, у которого ФЖ или ПЖТ не были индуцированы при эндокардиальном ЭФИ. Для серьезного статистического анализа эти данные не являются достаточными. Однако феноменологически ложно-отрицательный результат ЭФИ у пробанда №5, полученный в настоящем исследовании, не позволяет нам считать эндокардиальное ЭФИ достаточно надежным методом для прогнозирования жизнеугрожающих аритмических эпизодов и оценки риска ВСС у больных с синдромом СБ.

Динамическое наблюдение было рекомендовано 15 пробандам, результаты обследования которых не удовлетворяли критериям имплантации кардиовертера–дефибриллятора.

Согласно международным рекомендациям, по результатам обследования хирургическое лечение было предложено 66 пробандам (Рисунок 3.19, Таблица 3.13). Из них 7 пробандов (10%) отказались от имплантации кардиовертера–дефибриллятора и мы рекомендуем применять хинидин (200 мг/2 раза в день) всем пациентам, отказавшимся

от имплантации ИКД. В течение 30 месяцев динамического наблюдения с момента отказа от операции трое из них умерли внезапно (57%).

59 пациентам имплантация кардиовертера–дефибриллятора была успешно выполнена. В течение 30 месяцев динамического наблюдения были зафиксированы только два осложнения:

- дислокация правопредсердного электрода (1/59);
- гнойное осложнение (1/59).

Таким образом, были зарегистрированы осложнения у 3.3% пациентов с имплантации ИКД. Эти показатели выше мировой статистики по данным осложнениям. В обоих случаях осложнения были успешно пролечены (переустановить электрод и принять курс антибиотикотерапии) в условиях хирургического центра, имплантированные кардиовертеры-дефибрилляторы продолжили работу.

Один из пробандов, перенесший мотивированный шок за 30-месячный период наблюдения, по истечении срока службы аккумулятора ИКД отказался от его замены. Спустя 18 месяцев после окончания срока службы аккумулятора ИКД этот больной умер внезапно в возрасте 41 г. (Таблица 3.13). Поэтому результаты лечения этого пациента были учтены при статистической обработке дважды: первый раз - при подсчёте числа мотивированных шоков в группе больных, согласившихся на имплантацию кардиовертера-дефибриллятора; второй раз – при оценке смертности в группе больных, отказавшихся от хирургического лечения.

Таблица 3.13.

Результаты хирургического лечения у 66 пробандов с СБ, согласившихся на хирургическое лечение.

	Выживаемость в течение 30 месяцев	
	Без случаев ВСС	ВСС
ИКД имплантирован - (59* пробандов)	59	0
Отказ от хирургического лечения (7** пробандов)	3	4
	Чувствительность 93%	Специфичность 100%

* - исключён пробанд, отказавшийся от замены батареи ИКД

** - включён пробанд, отказавшийся от замены батареи ИКД.

Согласно полученным результатам хирургического лечения у больных с СБ, и анализу выживаемости по Каплану-Мейеру (Рисунок 3.20), можно утверждать, что имплантация ИКД является эффективной профилактикой ВСС у больных с синдромом Бругада ($p < 0.02$).

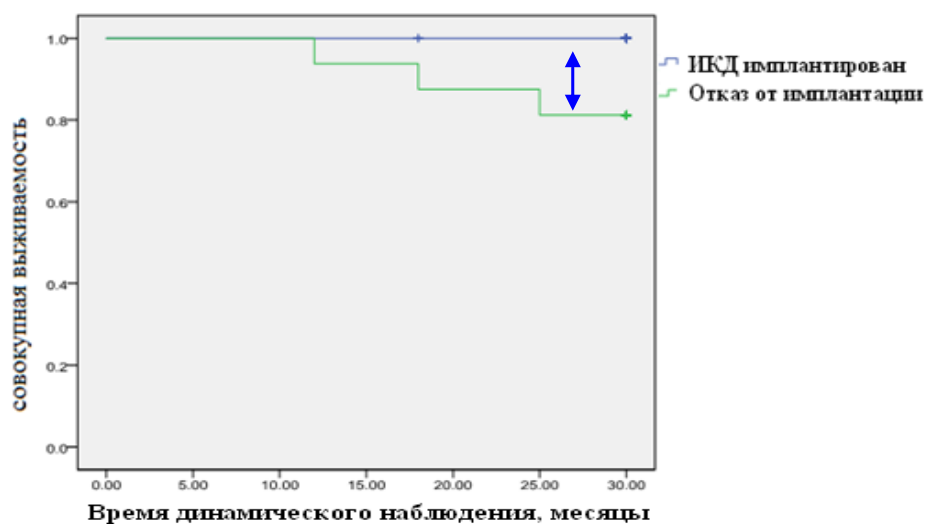


Рисунок 3.20. Выживаемость больных с СБ, согласившихся и отказавшихся от имплантации ИКД (тест Каплан-Мейера) ($p < 0.02$).

В течение 30 ± 6 месяцев наблюдения у 19 пациентов с ИКД (33%) были зафиксированы срабатывания дефибриллятора. Всего число шоков составило 27. У 16 (27%) больных срабатывания были только в виде мотивированных разрядов, у 3 (5%) больных регистрировались мотивированные и немотивированные разряды, у 8 (13%) - только немотивированные. (Таблица 3.13, Рисунок 3.21).

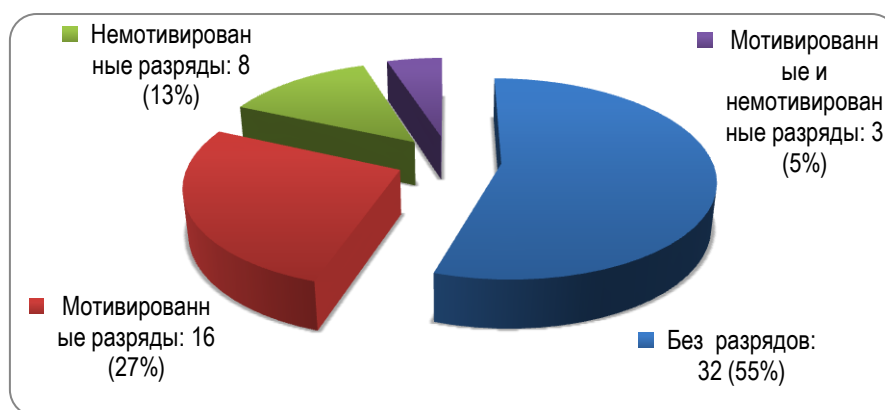


Рисунок 3.21. Результаты динамического наблюдения за пациентами, перенесшими имплантацию ИКД, в течение 30 месяцев.

В нашей группе частота мотивированных разрядов выше, чем предыдущего исследования [Sacher F., et al 2006 и Sarkozy A, et al 2007]. Частота срабатываний ИКД у больных СБ, по литературным данным, перенесших ВСС в течение 1 года, составила 3.7% [26, 94, 96].

Средний возраст пациентов с первым мотивированным разрядом составил 39 ± 9 лет. Средний возраст наблюдения у больных без шоков составил 42 ± 8 лет. Возраст больного не является основным критерием хирургического лечения у пациентов с СБ.

Вклад ФП в оценку риска ВСС и необходимость интервенционного лечения при СБ однозначно не определена, и для уточнения этого вопроса требуются дополнительные исследования. У нас был единственный опыт радиочастотной абляции ФП у пробанда №10 с кратковременным

эффектом (не более 4 месяцев), что не позволяет сделать каких-либо выводов. Имеются лишь единичные публикации, посвященные эффективности РЧА при СБ с сопутствующей ФП. В исследовании Akinori. S [15] была показана эффективность РЧА у 5 из 6 больных. Мы также полагаем, что проведение РЧА у больных с СБ может снижать частоту немотивированных разрядов ИКД, так как ФП способна вызывать немотивированные разряды, а РЧА является эффективным методом лечения ФП. В нашем исследовании такой опыт был у пациента №10.

Медикаментозные подходы к лечению СБ активно разрабатываются, но результаты этих исследований остаются противоречивыми, и данные очень немногочисленные.

Опыт медикаментозного лечения в нашей группе также ограниченный. Эффективность хинидина в снижении частоты ЖТ у больных с СБ доказана [Viskin. S; 2013]. Количество мотивированных шоков сократилось у всех пациентов. В нашем исследовании лечение хинидином (200 мг/2 раза в день) применялось у 4 больных с ИКД и с несколькими мотивированными шоками вследствие развития желудочковой тахикардии. При наблюдении в течение одного года 4 больных, принимавших хинидин после мотивированных шоков, эпизоды желудочковой аритмии не были зарегистрированы у 3 пациентов.

Мы считаем, что хинидин может сократить повторяющиеся мотивированные шоки у пациентов с СБ и имплантированным кардиовертером-дефибриллятором.

Эффективность хирургического лечения в снижении риска ВСС у больных СБ была продемонстрирована только для ИКД. В данный момент, мало исследований, доказывающих эффективность хинидина для первичной профилактики ВСС и ЖТ. Однако мы полагаем, что хинидин может быть рекомендован пациентам, которые отказались от хирургического лечения.

3.4. Анализ гено-фенотипических корреляций

Был проведён анализ анамнестических, клинических и электрокардиографических проявлений заболевания у больных с различными генетическими вариантами СБ.

В первую очередь мы оценили клинические и анамнестические особенности пробандов в зависимости от наличия мутаций в гене *SCN5A* (Таблица 3.14).

Таблица 3.14

Клинические и анамнестические особенности больных, в зависимости от наличия мутаций в гене *SCN5A*.

	<i>SCN5A+</i>	<i>SCN5A-</i>	p-Value	Статистическая достоверность
Число пробандов	16	65		
Возраст, лет	40 ± 12	38 ± 13	0.3	Недостоверно
Семейный анамнез ВСС	13 (81%)	30 (46%)	0.01	Достоверно
Синкопе	12(75%)	29(44%)	0.01	Достоверно
Реанимация после внезапной смерти	3(19%)	9(13%)	0.7	Недостоверно
Бругада-паттерн тип 1 на ЭКГ	13(81%)	3(4%)	0.001	Достоверно
Суправентрикулярная аритмия	5 (31%)	7 (1%)	0.6	Недостоверно
ЖТ/ФЖ	9 (56%)	19 (29%)	0.16	Недостоверно
Интервал PR (мс)	207±24	174±21	0.001	Достоверно
Интервал QTc (мс)	423± 43	396± 62	0.1	Недостоверно
Немотивированные разряды ИКД	6 (37%)	5 (7%)	0.1	Недостоверно
Мотивированные разряды ИКД	8(50%)	11(17%)	0.1	Недостоверно

Как было изложено в главе 3.2.1, женский пол пробанда является негативным предсказательным фактором выявления мутаций в гене *SCN5A*.

Наши результаты свидетельствуют об отсутствии корреляции мутаций в гене *SCN5A* с такими демографическими и анамнестическими параметрами, как средний возраст больных, реанимация после внезапной

смерти в анамнезе. Но установлена достоверная положительная корреляция между наличием мутаций в гене *SCN5A* с семейным анамнезом ВСС (до 45 лет), а также с синкопальными состояниями.

Частота синкопальных состояний была достоверно выше у больных с мутациями в гене *SCN5A*. Однако структура провоцирующих синкопе факторов достоверно не отличались. Наиболее часто обмороки происходили рано утром или после еды у всех пробандов.

Исходя из этого, мы полагаем, что у больных СБ, в чьих семьях отмечались случаи внезапной смерти, а также у пациентов с синкопальной формой заболевания, вероятность выявления патогенной мутации в гене *SCN5A* выше, чем у больных без обмороков (25% vs. 4%).

По данным электрокардиографии мы не выявляли корреляции между наличием мутаций в гене *SCN5A* и частотой суправентрикулярных и/или вентрикулярных аритмий, а также продолжительности интервала QTc. Однако выявляемость спонтанного Бругада-паттерна 1-го типа была достоверно выше у больных с мутациями в гене *SCN5A* (Рисунок 3.22).

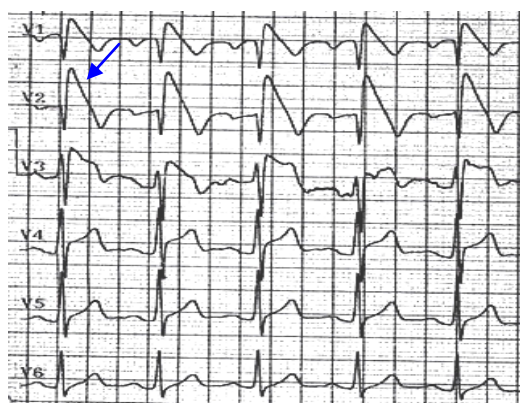


Рисунок 3.22: Фрагмент ЭКГ отведения (V_1 - V_6) у пробанда №46 с выявленной мутацией p.P1506S. Стрелкой указан подъем сегмента ST > 7 мм (V_2) и характерный Бругада-паттерн тип 1.

Также было установлено наличие корреляции между наличием мутаций в гене *SCN5A* и продолжительностью интервала PR ($p < 0.001$). В группе носителей мутации продолжительность интервала PR была существенно выше и составила в среднем 207 мс, что свидетельствует о замедлении проведения по предсердиям и АВ-соединению.

При анализе результатов хирургического лечения (имплантации кардиовертера-дефибриллятора), достоверных различий в частоте мотивированных и немотивированных разрядов ИКД у пробандов с наличием мутаций в гене *SCN5A* выявлено не было.

Мы также проанализировали тяжесть течения заболевания и результаты хирургического лечения внутри группы носителей мутаций в гене *SCN5A*.

Было проведено сравнение частоты жизнеугрожающих симптомов у больных с миссенс-мутациями и мутациями, реализующимися по механизму гаплонедостаточности (Рисунок 3.23).

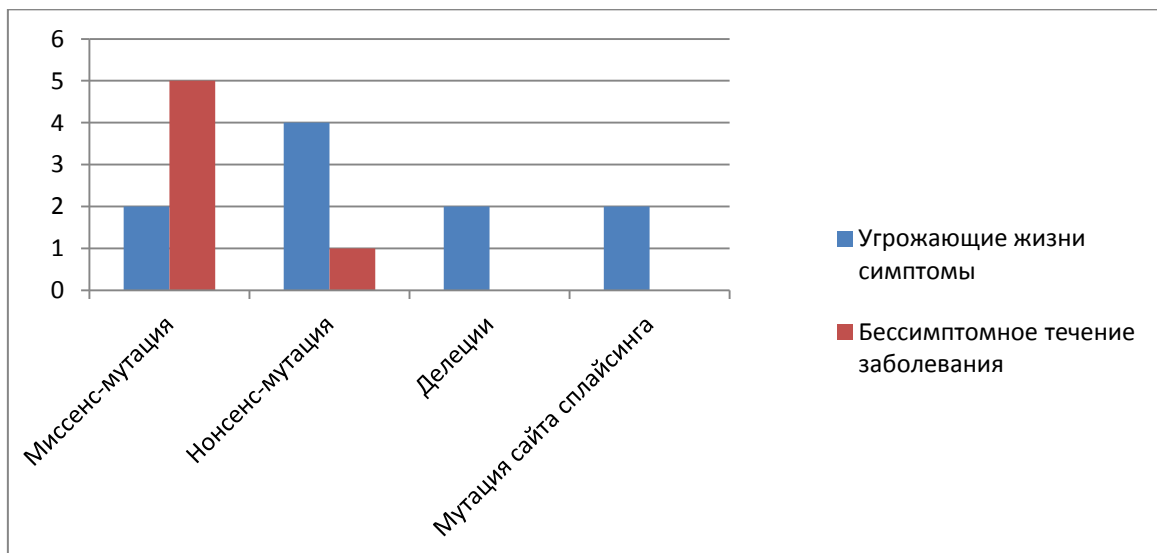


Рисунок 3.23. Ассоциация между типом мутации и жизнеугрожающими симптомами* ($p\text{-Value} < 0.05$).

*жизнеугрожающие симптомы: ЖТ, мотивированные разряды ИКД или реанимация после внезапной смерти у больного.

Была выявлена значимая корреляция между характером мутаций в гене *SCN5A* и частотой жизнеугрожающих симптомов (ЖТ, мотивированные разряды ИКД или реанимация после внезапной смерти считаются угрожающих жизни). Прогноз при наличии нонсенс-мутации, делеций и мутаций сайтов сплайсинга оказался более серьезным, чем при наличии миссенс-мутации ($p < 0.05$). Однако для повышения достоверности этого вывода требуется дополнительное исследование на больших группах пациентов с *SCN5A*-опосредованным синдромом Бругада.

Опубликованные результаты европейских исследований достаточно противоречивы. Были сообщения как об отсутствии связи аритмических событий у пациентов с СБ и наличием патогенных мутаций в гене *SCN5A*, так и о более высокой частоте обмороков у больных с СБ с нонсенс-мутациями и мутациями со сдвигом рамки считывания [32].

В соответствии с полученными результатами исследования, изложенными в главе 3.3, мы предлагаем модифицировать алгоритм принятия решения при имплантации ИКД.

В обследованной группе больных положительная прогностическая ценность (ППЦ) эндокардиального ЭФИ в прогнозировании опасных для жизни событий составила 66%.

Положительная прогностическая ценность выявления мутаций, реализующихся по механизму гаплонедостаточности в гене *SCN5A*, в отношении жизнеугрожающих событий (ППЦ) составила 89%.

Таким образом, выявление этого типа мутаций имеют большую прогностическую цельность, чем положительный результат при выполнении эндокардиального ЭФИ.

Мы предлагаем модификацию алгоритма принятия решений об имплантации ИКД у больных с СБ, в котором предлагаем использовать результаты ДНК-диагностики (поиск мутаций в гене *SCN5A*) вместо ЭФИ (Рисунок 3.24).

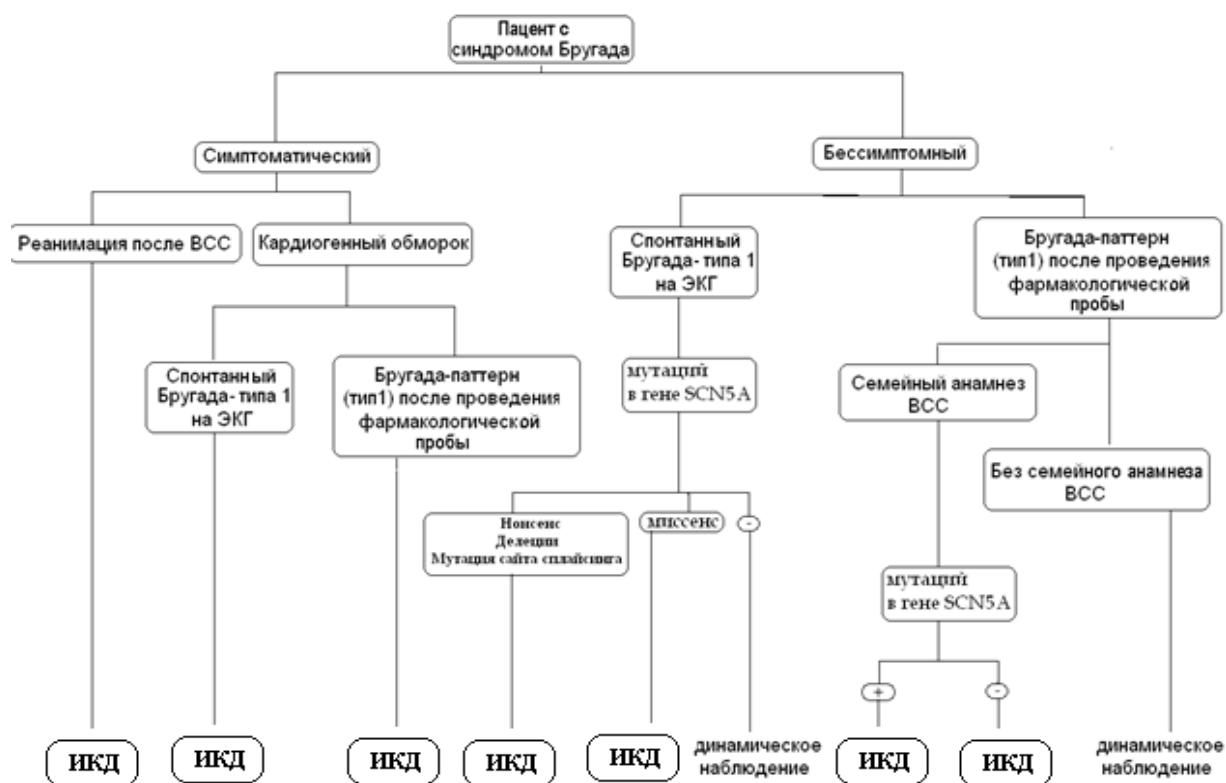


Рисунок 3.24. Модифицированный алгоритм принятия решения об имплантации кардиовертера дефибриллятора.

В нашем исследовании ген *SNTA1* впервые раз упоминается как ген, приводящий к развитию синдрома Бругада. В нашей группе было выявлено всего двое больных с потенциально патогенными мутациями в этом гене, поэтому предоставленные данные (Таблица 3.15) носят только описательный характер и не могут использоваться для статистического анализа.

Таблица 3.15.

Клиническая характеристика больных с мутациями в гене *SNTA1*.

Мутации в гене <i>SNTA1</i>	p.T262P	p.G290E
Пол	М	Ж
Возраст на момент диагноза, лет	12	34
Семейный анамнез ВСС	-	-
Синкопе	1	-

Реанимации после внезапной смерти	-	-
Бругада-паттерн тип 1 на ЭКГ	-	1
Суправентрикулярная аритмия	1	-
ЖТ/ФЖ	1	-
Интервал PR (мс)	155	180
Интервал QTc (мс)	441	420
Немотивированные разряды ИКД	1	-
Мотивированные разряды ИКД	1	-

Для оценки клинических проявлений мутаций в этом гене необходимо проведение дополнительных исследований на больших группах больных.

В данную работу вошли результаты дополнительных генетических исследований (Глава 3.2.4), которые не были запланированы в начале работы.

В двух семьях у восьми пациентов были выявлены мутации в гене *KCNH2*, кодирующем альфа-субъединицу калиевого канала I_{Kr} .

Мы провели сравнение продолжительности интервалов QTc и PR больных с мутациями в генах *SCN5A* и *KCNH2*, а также больных без выявленных мутаций (Таблица 3.16).

Таблица 3.16.

Сравнение продолжительности интервалов PR и QTc у больных с разными генетическими вариантами синдрома Бругада.

		Число больных	Интервал QTc (мс)	Интервал PR (мс)
Мутации в гене	<i>SCN5A</i> +	35	423± 43	207± 24
	<i>KCNH2</i> +	8	380± 2	165± 15
Без мутаций		39	397±24	175±21

У больных с мутациями в гене *KCNH2* продолжительность интервалов QTc и PR составили 380±2 мс и 165±15 мс, соответственно, что достоверно

короче, чем в группе больных с мутациями в гене *SCN5A*. Эти результаты согласуются с литературными данными Seiko Ohno и соавт, (2011), которые также описали случаи выявления мутаций в гене *KCNH2* при синдроме Бругада в сочетании с укороченным интервалом QTc [96, 97].

Мы считаем, что первым этапом генетического анализа у пациентов с СБ, у которых регистрируется на ЭКГ спонтанный Бругада-паттерн 1-го типа, при наличии синкопальных состояний, положительном анамнезе ВСС (у самого пробанда или в семье) должен быть поиск мутаций в гене *SCN5A*. Для оптимизации ДНК-диагностики необходимо также учитывать продолжительность интервалов QTc и интервала PR (Таблица 3.16). Мы предлагаем следующий алгоритм ДНК-диагностики у пациентов с СБ (Рисунок 3.25):

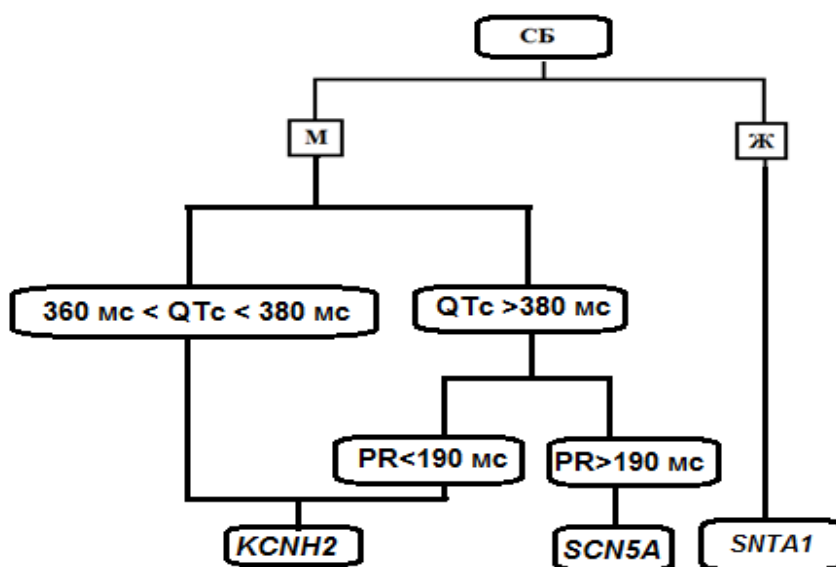


Рисунок 3.25. Алгоритм ДНК-диагностики у пациентов с СБ

Известно не менее 17 генов, ответственных за СБ. В настоящей работе мы проанализировали 7 из них, которые кодируют белки, входящие состав собственно натриевого канала Nav1.5 или моделируют его активность.

По полученным данным, диагностическая эффективность анализа генов *MOG1*, *SCN1B*, *SCN3B* и *SCN4B* очень низкая: мутаций в этих генах

в нашей выборке пациентов обнаружено не было. Таким образом, мы не рекомендуем анализ генов *MOG1*, *SCN1B*, *SCN3B* и *SCN4B* в качестве рутинной этапа генетической диагностики у российских и иранских пациентов с СБ.

Однако если в генах, предусмотренных данным алгоритмом, мутаций не выявлено, мы рекомендуем проводить дальнейшее исследование методами секвенирования нового поколения панелей генов кальциевых каналов. В исследовательских целях может выполняться секвенирование экзона в формате «трио».

Выводы

1. Синдром Бругада в обследованной группе был диагностирован преимущественно у мужчин (М:Ж=7:1). Однако выраженность симптомов и риск ВСС от пола не зависят. Средний возраст постановки диагноза - 38 ± 13 лет, что выше среднего возраста ВСС среди не имевших диагноза родственников (35 ± 7 лет).
2. Самыми частыми анамнестическими и клиническими признаками синдрома Бругада являются случаи ВСС среди родственников (56%); синкопальные состояния, не связанные с физической нагрузкой (51%); желудочковые НРС (45%). Частым клиническим симптомом СБ являются головокружения (17%).
3. Частота выявления мутаций в гене *SCN5A* у пробандов составила 19.7%; среди пробандов-мужчин 22.2%; среди пробандов-женщин - 0. Десять из 16 (62.5%) выявленных мутаций были идентифицированы впервые.
4. Ген *SNTA1* – новый ген, ответственный за СБ. Частота выявления мутаций в гене *SNTA1* у пробандов составила 2.5%; среди пробандов-мужчин 1.4%; среди пробандов-женщин - 11.1%.
5. Прокаинамид (10мг/10мин в/в) является более эффективным препаратом для выявления латентного течения синдрома Бругада, чем флекаинид (400 мг, per os). Ни положительные, ни отрицательные результаты эндокардиального ЭФИ не являются достаточно надёжными в прогнозировании ЖТ/ФЖ и оценке риска ВСС.
6. Имплантация кардиовертера-дефибриллятора является надёжным способом профилактики ВСС. Частота нелетальных осложнений имплантации составила 3.2%. В течение 30 месяцев после имплантации частота мотивированных шоков составила 27%,

летальность – 0. В группе больных, отказавшихся от ИКД, летальность составила 57% за тот же период наблюдения.

7. Женский пол пробанда является негативным прогностическим фактором для выявления мутаций в гене *SCN5A*.
8. Выявление мутаций, реализующихся по механизму гаплонедостаточности (нонсенс-мутации, мутации сплайсинга, делеции/инсерции со сдвигом рамки считывания) является фактором плохого прогноза и должно учитываться в алгоритме принятия решения об имплантации кардиовертера-дефибриллятора.
9. Стратегия ДНК-диагностики должна учитывать электрокардиографические параметры. Удлинение интервала $PR > 190$ мс более характерно для больных с мутациями в гене *SCN5A*; укорочение интервала $QTc < 380$ мс характерно для больных с мутациями в гене *KCNH2*.

Практические рекомендации.

- 1) Хотя головокружение не считается характерным симптомом при синдроме Бругада, в нашей группе на 17.9% пациентов жаловались на головокружение. Пациентам, страдающим головокружениями неясного генеза, рекомендуется проведение ЭКГ-скрининга с целью исключения синдрома Бругада и/или других первичных аритмий.
- 2) Предложен оптимизированный алгоритм принятия решений об имплантации кардиовертера-дефибриллятора у больных с СБ, учитывающий результаты молекулярно-генетических исследований. Мы предлагаем использовать данные генетического обследования вместо данных ЭФИ, а также рассматривать выявление мутаций в гене *SCN5A*, реализующихся по механизму гаплонедостаточности, в качестве негативным прогностическим фактором.
- 3) Предложен алгоритм ДНК-диагностики у пациентов с СБ, который может использоваться для оптимизации стратегии ДНК-диагностики.

Список литературы

- 1) Бокерия Л. А., Бокерия О. Л., Киртбая Л. Н.; Синдром Бругада : клеточные механизмы и подходы к лечению; УДК 616.124-008.318:576.3 Анналы Аритмологии, № 3, 2010.
- 2) Бокерия Л. А., Ревешвили А. Ш., Неминуций Н. М. и др. Имплантируемые кардиовертеры-дефибрилляторы. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева, 2005. 178 с.
- 3) Дупляков Д. В. Блокада правой ножки пучка Гиса, подъем сегмента ST в отведениях V₁-V₂ (V₃) и опасные для жизни нарушения сердечного ритма. Кардиология 2001; 8: 43-51.
- 4) Дупляков Д.В., Глухова В.Л., Максимова С.В., др. Частота выявления признаков синдрома Бругада в ходе регистрации ЭКГ; Кардиология 2007; 47(11): 55- 9. 3.
- 5) Иванов Г.Г., Сметнев А.С., Сыркин А.Л. и др. Основные механизмы, принципы прогноза и профилактики внезапной сердечной смерти. Кардиология 1998; 12: 64- 73.
- 6) Кузнецов В.А. Сердечная ресинхронизирующая терапия: избранные вопросы. М., 2007. 126 с.
- 7) Клинические рекомендации по применению электрокардио-стимуляторов, имплантируемых кардиовертеров-дефибрилляторов, устройств для сердечной ресинхронизирующей терапии и имплантирующей терапии и имплантируемых кардиомониторов. 2013; 74
- 8) Макаров, Л. М. Синдром Бругада. Медицина неотложных состояний. – 2008. № 1 (14). – С. 96 – 99.
- 9) Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. ПЦР «в реальном времени» - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 233с.: ил.
- 10) Рекомендации 2006 года Американской коллегии кардиологов, Американской ассоциации сердца и Европейского общества кардиологов

по лечению пациентов с желудочковыми аритмиями и профилактике внезапной сердечной смерти.

- 11) Abriel Hugues; Roles and regulation of the cardiac sodium channel Nav1.5: Recent insights from experimental studies ; *Cardiovasc Res* (2007) 76 (3): 381-389.
- 12) Abriel H, Kass RS. Regulation of the Voltage-Gated Cardiac Sodium Channel Nav1.5 by Interacting Proteins. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2005 January; 15 (1): 35- 40.
- 13) Abriel H., Zaklyasminskaya E.V. Cardiac Channelopathies: Genetic and Molecular Mechanisms; *j. gene.* 2012.12.061. Epub 2012 Dec 22.
- 14) Akihiko S; Review- Indication of ICD in Brugada syndrome; *Journal of Arrhythmia* 29 (2013) 110–116.
- 15) Akinori S, Yukihiro Y, Yukiko N, et.al; Ablation of atrial fibrillation in Brugada syndrome patients with an implantable cardioverter defibrillator to prevent inappropriate shocks resulting from rapid atrial fibrillation; *International Journal of Cardiology* 168 (2013) 5273– 5276.
- 16) Alter P, Waldhans S, Plachta E, Moosdorf R, Grimm W. Complications of implantable cardioverter defibrillator therapy in 440 consecutive patients. *Pacing Clin Electrophysiol* 2005; 28: 26 – 32.
- 17) Amin Ahmad S.; Asghari - Roodsari. Alaleh; Tan, Hanno L. Cardiac sodium channelopathies *European Journal of Physiology*; July 2010, Volume 460, Issue 2, 223-237.
- 18) Antzelevitch C. The Brugada syndrome: ionic basis and arrhythmia mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2001; 12: 268- 272.
- 19) Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, LeMarec H, Nademanee K, Perez Riera AR, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Tan H, Wilde A. Brugada syndrome: report of the second consensus conference. *Heart Rhythm.* 2005; 2:429-440.

- 20) Antzelevitch C., Brugada P., Brugada J., Brugada R. Brugada Syndrome: from cell to bedside; *Curr. Probl. Cardiol.* 2005 30 (1): 9-54.
- 21) Arthur A.M. Wilde; Charles Antzelevitch; Martin Borggrefe; Josep Brugada; Ramón Brugada; Pedro Brugada; Domenico Corrado; Richard N.W. Hauer; Robert S. Kass; Koonlawee Nademanee; Silvia G.; Jeffrey A. Towbin; for the Study Group on the Molecular Basis of Arrhythmias of the European Society of Cardiology; Proposed Diagnostic Criteria for the Brugada Syndrome; *Circulation.* 2002; 106: 2514- 2519.
- 22) Atarashi H, Ogawa S, Harumi K et al. Characteristics of patients with right bundle branch block and ST-segment elevation in right precordial leads. Idiopathic Ventricular Fibrillation Investigators. *Am J Cardiol* 1996; 78(5):581-3.
- 23) Atarashi H, Ogawa S. New ECG criteria for high-risk Brugada syndrome. *Circ J.* 2003; 67: 8- 10.
- 24) Baroudi, G. Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an *SCN5A* mutant (R1432G); *Circ. Res.* – 2001. –Vol. 88. – P. E78– E83.
- 25) Bayés de Luna A, Brugada J, Baranchuk A, Borggrefe M, Breithardt G, Goldwasser D, Lambiase P, Riera AP, Garcia-Niebla J, Pastore C, Oreto G, McKenna W, Zareba W, Brugada R, Brugada P.; Current electrocardiographic criteria for diagnosis of Brugada pattern: a consensus report; *J Electrocardiol.* 2012 Sep; 45 (5): 433- 42.
- 26) Benito Begoña, Brugada Josep, Brugada Ramon, and Brugada Pedro; Brugada Syndrome; *Rev Esp Cardiol.* 2009; 62 (11):1297- 315.
- 27) Benito B, Campuzano O, Ishac R, Iglesias A, Junttila MJ, Michaud J, et al. Role of genetic testing in risk stratification of Brugada syndrome. *Heart Rhythm.* 2009; 6: S102.

- 28) Bezzina C, Veldkamp MW, Van Den Berg MP, Postma AV, et al. A single Na⁺ channel mutation causing both long QT and Brugada syndromes. *Circ; Res* 1999; 85: 1206- 1213.
- 29) Brugada J., Brugada R., Antzelevitch C. Et al. Long-term follow-up of individuals with the electrocardiographic pattern of right bundle-branch block and ST-segment elevation in precordial leads V1 to V3. *Circulation* 2002 Jan 1; 105 (1): 73-78.
- 30) Brugada P., Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *JACC*, 1992; 15; 20(6); 1391-1396.
- 31) Brugada J., Brugada R., Brugada P. Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V1 through V3: a marker for sudden death in patients without demonstrable structural heart disease. *Circulation* 1998 Feb 10; 97 (5):457- 460.
- 32) Campuzano O, Allegue C, Iglesias A, Brugada R; Genetic Basis of Brugada syndrome; *J. Genetic syndromes and Gene Therapy*; 2013- V.4.
- 33) Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*; 2000; 26:13-25.
- 34) Cau C. The Brugada syndrome. A predicted sudden juvenile death. *Minerva Med* 1999 Sep; 90(9): 359- 364.
- 35) Chalvidan T., Deharo J.C., Dieuzaide P. et al. Near fatal electrical storm in a patient equipped with an implantable cardioverter defibrillator for Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 2000 Mar; 23(3): 410-412.
- 36) Chen S.M., Kuo C.T., Lin K.H., Chiang F.T. Brugada syndrome without mutation of the cardiac sodium channel gene in a Taiwanese patient. *J Formos Med Assoc*; 2000 Nov; 99 (11): 860- 862.
- 37) Cheng J., Van Norstrand D. W., Medeiros-Domingo A., Valdivia C., Bi-hua Tan, Bin Ye, S. Kroboth, M. Vatta, D. J. Tester, C. T. January, J. C. Makielski and M.I J. Ackerman α 1- Syntrophin Mutations Identified in Sudden

Infant Death Syndrome Cause an Increase in Late Cardiac Sodium Current. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2009; 2; 667- 676.

- 38) Chevallier S, Forclaz A, Tenkorang J, et al. New electrocardiographic criteria for discriminating between Brugada types 2 and 3 patterns and incomplete right bundle branch block. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58: 2290.
- 39) Corrado D, Pelliccia A, Antzelevitch C, Leoni L, Schiavon M, Buja G, Maron BJ, Thiene G, Basso C. ST segment elevation and sudden death in the athlete. In: Antzelevitch C (ed.), *The Brugada Syndrome: from Bench to Bedside*. Oxford: Blackwell Futura; 2005. p. 119– 129.
- 40) Corrado D, Pelliccia A, Heidbuchel H, et al. Section of Sports Cardiology, European Association of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation; Working Group of Myocardial and Pericardial Disease, European Society of Cardiology. Recommendations for interpretation of 12- lead electrocardiogram in the athlete. *Eur Heart J* 2010; 31: 243.
- 41) Cortez-Dias, Nuno; Plácido, Rui; Marta, Liliana; Bernardes, Ana; Sobral, Sílvia; Carpinteiro, Luís; de Sousa, João; Epicardial ablation for prevention of ventricular fibrillation in a patient with Brugada Syndrome; *Portuguese Journal of Cardiology*; 2014; 33 (5): 305.
- 42) De Bruyne MC, Hoes AW, Kors JA, et al. QTc dispersion predicts cardiac mortality in the elderly: the Rotterdam Study. *Circulation* 1998; 97: 467–72.
- 43) Di Diego JM, Cordeiro JM, Goodrow RJ, Fish JM, Zygmunt AC, Perez GJ, Scornik FS, Antzelevitch C. Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation*. 2002; 106: 2004- 2011.
- 44) Douglas S. Lee, Andrew D. Krahn, Jeffrey S. Healey, David Birnie, Eugene Crystal, Paul Dorian, Christopher S. Simpson, Yaariv Khaykin, Douglas Cameron, Amir Janmohamed, Raymond Yee, Peter C. Austin, Zhongliang Chen, Judy Hardy, Jack V. Tu, (For the Investigators of the Ontario ICD Database) Evaluation of Early Complications Related to De Novo Cardioverter

Defibrillator Implantation Insights From the Ontario ICD Database; *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(8):774-782

- 45) Eckardt L., Kirchhof P., Loh P. et al. Brugada syndrome and supraventricular tachyarrhythmias: a novel association *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001 Jun; 12 (6): 680 - 685.
- 46) Gradaus R, Block M, Brachmann J, et al. Mortality, morbidity, and complications in 3344 patients with implantable cardioverter defibrillators: results from the German ICD Registry EURID. *Pacing Clin Electrophysiol* 2003; 26: 1511 - 8.
- 47) Gima, K. Ionic current basis of electrocardiographic waveforms: a model; *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 90. – P. 889–896.
- 48) Gold MR, Peters RW, Johnson JW, Shorofsky SR, the World – Wide Jewel Investigators. Complications associated with pectoral implantation of cardioverter defibrillators. *Pacing Clin Electrophysiol* 1997; 20: 208 - 11.
- 49) Gould PA, Krahn AD. Complications associated with implantable Cardioverter - defibrillator replacement in response to device advisories. *JAMA* 2006; 295: 1907 - 11.
- 50) Haïssaguerre M, Derval N, Sacher F, et al. Sudden cardiac arrest associated with early repolarization. *N Eng J Med* 2008; 358: 2016.
- 51) Hallstrom AP, Greene HL, Wyse DG, Zipes D, Epstein AE, Domanski MJ, Schron EB; AVID Investigators. AVID Investigators. Antiarrhythmics Versus Implantable Defibrillators (AVID): rationale, design, and methods // *Am. J. Cardiol.*- 1995.- Vol. 75.- P. 470 - 475.
- 52) Head CE, Balasubramaniam R, Thomas G, et al. Paced electrogram fractionation analysis of arrhythmogenic tendency in DeltaKPQ *SCN5A* mice. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005; 16: 1329 - 40.
- 53) Hedley PL; Jorgensen P; Schlamowitz S; et al. "The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update". *Human Mutation* (2009) 30 (11): 1486 - 511.

- 54) Healey JS, Birnie DH, Lee DS, Krahn AD, Crystal E, Simpson CS, et al. Defibrillation testing at the time of ICD insertion: an analysis from the Ontario ICD Registry. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2010; 21:1344 - 8.
- 55) Hong K, Brugada J, Oliva A, Berruezo-Sanchez A, Potenza D, Pollevick GD, Guerchicoff A, Matsuo K, Burashnikov E, Dumaine R, Towbin JA, Nesterenko V, Brugada P, Antzelevitch C, Brugada R: Value of electrocardiographic parameters and ajmaline test in the diagnosis of Brugada syndrome caused by *SCN5A* mutations. *Circulation* 2004; 110: 3023- 3027.
- 56) Huang MH, Marcus FI. Idiopathic Brugada-type electrocardiographic pattern in an octogenarian.; *J Electrocardiol* 2004; 37(2):109 - 11.
- 57) Itoh H, Sakaguchi T, Ashihara T, et al. A novel *KCNH2* mutation as a modifier for short QT interval. *Int J Cardiol* 2009; 137:83– 5.
- 58) Itoh H, Shimizu M., Ino H. et al. Arrhythmias in patients with Brugada-type electrocardiographic findings. *Jpn Circ J* 2001 Jun; 65 (6): 483 - 486.
- 59) Johnson Francis, Charles Antzelevitch; Atrial Fibrillation and Brugada Syndrome; *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 51, No. 12, 2008.
- 60) Kakishita M., Kurita T., Matsuo K. et al. Mode of onset of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome detected by implantable cardioverter defibrillator therapy. *J Am Coll Cardiol* 2000 Nov 1; 36 (5):1646 - 1653.
- 61) Kalla H., Yan G.X., Marinchak R. Ventricular fibrillation in a patient with prominent J (Osborn) waves and ST segment elevation in the inferior electrocardiographic leads: a Brugada syndrome variant? *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000 Jan; 11 (1):95-98.
- 62) Karaoka H. Electrocardiographic patterns of the Brugada syndrome in two young patients with pectus excavatum. *J Electrocardiol* 2002; 35: 169.
- 63) Krahn AD, Healey JS, Chauhan V, Birnie DH, Simpson CS, Champagne J, et al. Systematic assessment of patients with unexplained cardiac arrest:

- Cardiac Arrest Survivors with Preserved Ejection Fraction Registry (CASPER).
Circulation 2009; 120: 278– 85.
- 64) Kattygnarath, D., Maugendre, S., Neyroud, N., Balse, E., Ichai, C., Denjoy, I. MOG1: a new susceptibility gene for Brugada syndrome. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2011. 4, 261–268.
- 65) Lia Crotti, David J. Tester, Wendy M. et.al; Long QT Syndrome– Associated Mutations in Intrauterine Fetal Death; *JAMA.* 2013 April 10; 309-14.
- 66) Makita N, Behr E, Shimizu W, et al. The E1784K mutation in *SCN5A* is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome. *J Clin Invest* 2008; 118: 2219- 2229.
- 67) Mallidi J, Nadkarni G, Berger R, et al. Meta-Analysis of Catheter Ablation as an Adjunct to Medical Therapy for Treatment of Ventricular Tachycardia in Patients with Structural Heart Disease. *Heart Rhythm* 2011; 8(4):503–510.
- 68) Manoj N. Obeyesekere, George J. Klein, Simon Modi, Peter Leong-Sit, Lorne J. Gula, Raymond Yee, Allan C. Skanes, Andrew D. Krahn,; *Advances in Arrhythmia and Electrophysiology - How to Perform and Interpret Provocative Testing for the Diagnosis of Brugada Syndrome, Long- QT Syndrome, and Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia ; Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology.* 2011; 4: 958-964.
- 69) Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. Proposed modification of the Task Force Criteria. *Circulation* 2010; 121: 1533.
- 70) Masahiko Takagi; Risk Stratification in Brugada Syndrome: Role of Programmed Electrical Stimulation; *J Clinic Experiment Cardiol* 2013 S10: 004
- 71) Matsuo K., Yano K. Brugada syndrome. *Nippon Rinsho* 2002 Jul; 60 (7):1408-1414.

- 72) McIntyre W, Perez Riera A, Femenia F, et al. Coexisting early repolarization pattern and Brugada syndromes recognition of potentially overlapping entities. *J Electrocardiol* 2012; 45:195.
- 73) Meregalli PG, Wilde AA, Tan HL. Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovasc Res.* 2005;67:367-378.
- 74) Meregalli PG, Tan HL, Probst V, Koopmann TT, Tanck MW, Bhuiyan ZA, et al. Type of SCN5A mutation determines clinical severity and degree of conduction slowing in loss-of function sodium channelopathies. *Heart Rhythm.* 2009; 6: 341-8.
- 75) Minoru Horie, Seiko Ohno; Genetic basis of Brugada syndrome; *Journal of Arrhythmia* Volume 29, Issue 2, April 2013, Pages 71–76
- 76) Miyazaki T., Mitamura H., Miyoshi S. et al. Autonomic and antiarrhythmic drug modulation of ST segment elevation in patients with Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 1996 Apr; 27 (5):1061-1070.
- 77) Miyamoto K, Yokokawa M, Tanaka K, et al. Diagnostic and prognostic value of a type 1 Brugada electrocardiogram at higher (third or second) V1 to V2 recording in men with Brugada syndrome. *Am J Cardiol* 2007; 99: 53 – 7.
- 78) Morten W. Nielsen, Anders G. Holst, Søren- Peter Olesen and Morten S. Olesen The genetic component of Brugada syndrome: 15 July 2013.
- 79) Moss A.J., Zareba W., Hall W.J., et al. Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction // *N. Eng. J. Med.* – 2002. – N. 346.- P.877 - 883].
- 80) Morgan JM, Marinskis G. Defibrillation testing at the time of implantable cardioverter defibrillator implantation: results of the European Heart Rhythm Association survey. *Europace* 2011; 13: 581–2.
- 81) Nademanee K. Sudden unexplained death syndrome in Southeast Asia. *Am J Cardiol.* 1997; 79:10-11.

- 82) Nuyens D, Stengl M, Dugarmaa S, et al. Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long QT3 syndrome. *Nat Med.* 2001; 7:1021– 1027.
- 83) Ogata, N. Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels; *Jpn. J. Pharmacol.*; 2002 № 4 (Vol. 88). – P. 365–377.
- 84) Oreto G, Corrado D, Delise P, et al. Doubts of the cardiologist regarding an electrocardiogram presenting QRS V1-V2 complexes with positive terminal wave and ST segment elevation. Consensus Conference promoted by the Italian Cardiology Society. *G Ital Cardiol (Rome)* 2010; 11:3S.
- 85) Patton DE, Isom LL, Catterall WA, Goldin AL. The adult rat brain beta 1 subunit modifies activation and inactivation gating of multiple sodium channel alpha subunits. *J. Biol Chem.* 1994; 269: 17649 - 17655.
- 86) Priori S.G., Aliot E., Blomstrom-Lundqvist C. et al. Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology//*European Heart J.*-2001- 22.-P.1374- 1450.
- 87) Priori SG, Napolitano C, Giordano U, Collisani G, Memmi M. Brugada syndrome and sudden cardiac death in children. *Lancet* 2000; 355(9206):808-9.
- 88) Priori Silvia G., Napolitano Carlo, Gasparini Maurizio, Pappone Carlo, Della Bella Paolo, Giordano Umberto, Bloise Raffaella, Giustetto Carla, De Nardis Roberto, Massimiliano, Ronchetti Elena, Faggiano Giovanna and Nastoli Janni; Natural History of Brugada Syndrome: Insights for Risk Stratification and Management; *Circulation.* 2002; 105: 1342-1347; originally published online February 25, 2002.
- 89) Postema PG, Mosterd A, Hofman N, et al. Sodium Channelopathies: Do We Really Understand What's Going On?; *J Cardiovasc Electrophysiol.* (2010) Vol. pp. 1-4.
- 90) Proietti R, Sagone A. Electrical storm: Incidence, Prognosis and Therapy. *Indian Pacing Electrophysiol J.* 2011; 11(2): 34-42.

- 91) Probst, Wilde AA, Barc J, Sacher F, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Le Scouarnec S, Kyndt F, Le Caignec C, Guicheney P, Gouas L, Albuissou J, Meregalli PG, Le Marec H, Tan HL, Schott JJ. ; *SCN5A* mutations and the role of genetic background in the pathophysiology of Brugada syndrome; *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2009; 2: 552- 557.
- 92) Raghava, G. P. S. (2000) Protein secondary structure prediction using nearest neighbor and neural network approach. *CASP4*: 75- 76.
- 93) Rosso R, Kogan E, Belhassen B, et al. J-point elevation in survivors of primary ventricular fibrillation and matched control subjects: incidence and clinical significance. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52:1231.
- 94) Sacher F, Probst V, Iesaka Y, et al; Outcome after implantation of Cardioverter defibrillator in patients with Brugada syndrome: a multicenter study. *Circulation*, 2006;114: 2317- 24.
- 95) Sarkozy Andrea, Brugada Pedro, Mont Lluís, and Brugada Josep; Optimizing the clinical use of implantable defibrillators in patients with Brugada syndrome; *European Heart Journal Supplements* (2007) 9 (Supplement I), I74–180.
- 96) Sarkozy A, Boussy T, Kourginnides G, et.al.: Long-term follow up of primary prophylactic implantable Cardioverter-defibrillator therapy in Brugada syndrome. *Eur Heart J*. 2007; 28:334- 44.
- 97) Shimizu W., Aiba T., Kurita T., Kamakura S. Paradoxical abbreviation of repolarization in epicardium of the right ventricular outflow tract during augmentation of Brugada-type ST segment elevation. *J Cardiovasc Electrophysiol*: 2001 Dec; 12 (12): 1418- 1421.
- 98) Shimizu W: Sex Hormone and Gender Difference - Role of Testosterone on Male Predominance in Brugada Syndrome. (*J Cardiovasc Electrophysiol*, Vol. 18, pp. 415-421, April 2007).
- 99) Smits J.P., Eckardt L., Probst V. Et al. Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate *SCN5A*-related

- patients from non- *SCN5A* -related patients. *J Am Coll Cardiol* 2002 Jul 17; 40 (2): 350-356.
- 100) Sweeney M.O. Wathen M.S., Volosin K. et al. Appropriate and Inappropriate Ventricular Therapies, Quality of Life, and Mortality Among Primary and Secondary Prevention Implantable Cardioverter Defibrillator Patients Results From the Pacing Fast VT REduces Shock Therapies (PainFREE Rx II) Trial. *Circulation* 2005; 111; 2898-2905.
- 101) Tan V., Yap J., Li-Fern Hsu, R. Liew. Catheter ablation of ventricular fibrillation triggers and electrical storm. *Europace*. 2012; 14 (12): 1687-1695.
- 102) Tanaka H., Kinoshita O., Uchikawa S. et al. Successful prevention of recurrent ventricular fibrillation by intravenous isoproterenol in a patient with Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 2001 Aug; 24 (8 Pt 1):1293-1294.
- 103) Thackray S., Coletta A. et al. Clinical trials update: highlights of the Scientific Sessions of Heart Failure 2001, a meeting of the Working Group on Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail*. 2001. V. 3. P. 491–494.
- 104) Tsuchiya T., Ashikaga K., Honda T., Arita M. Prevention of ventricular fibrillation by cilostazol, an oral phosphodiesterase inhibitor, in a patient with Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002 Jul; 13 (7): 698-701.
- 105) Vatta M, Dumaine R, Varghese G, Richard TA, Shimizu W, Aihara N, Nademanee K, Brugada R, Brugada J, Veerakul G, Li H, Bowles NE, Brugada P, Antzelevitch C, Towbin JA. Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Hum Mol Genet*. 2002; 11:337-345.
- 106) Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld AC, Pfeufer A, Kääh S, Wichmann HE, Hasdemir C, Aizawa Y, Wilde AA, Roden DM, Bezzina CR; Sodium channel β 1 subunit mutations associated with Brugada

- syndrome and cardiac conduction disease in humans; *J Clin Invest.* 2008 Jun; 118 (6): 2260- 8.
- 107) Wang Q, Ohno S, Ding WG, Fukuyama M, Miyamoto A, Itoh H, Makiyama T, Wu J, Bai J, Hasegawa K, Shinohara T, Takahashi N, Shimizu A, Matsuura H, Horie M. Gain-of-Function *KCNH2* Mutations in Patients with Brugada Syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2014 Jan.
- 108) Wathen M.S., DeGroot P.J., Sweeney M.O. et al. Reduces Shock Therapies (PainFREE Rx II) Trial Results Implantable Cardioverter- Defibrillators: Pacing Fast Ventricular Tachycardia Versus Shocks for Spontaneous Rapid Ventricular Tachycardia in Patients With Prospective Randomized Multicenter Trial of Empirical Antitachycardia Pacing. *Circulation* 2004; 110; 2591-2596.
- 109) Webster G, Berul CI. Congenital Long QT Syndromes: A Clinical and Genetic Update From Infancy Through Adulthood. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2008 August; 18 (6): 216-24.
- 110) Wu L, Yong SL, Fan C, Ni Y, Yoo S, Zhang T, Zhang X, Obejero-Paz CA, Rho HJ, Ke T, Szafranski P, Jones SW, Chen Q, Wang QK. Identification of a new co-factor, MOG1, required for the full function of cardiac sodium channel Nav 1.5. *J. Biol Chem.* 2008; 283: 6968 – 6978.
- 111) Wu G, Ai T, Kim JJ, Mohapatra B, Xi Y, Li Z, Abbasi S, Purevjav E, Samani K, Ackerman MJ, Qi M, Moss AJ, Shimizu W, Towbin JA, Cheng J, Vatta M. "Alpha-1-syntrophin mutation and the long QT syndrome: a disease of sodium channel disruption.". *Circ Arrhythm Electrophysiol* – 1 (Aug 2008) (3): 193– 201.
- 112) Yodogawa K, Morita N, Kobayashi Y, et al. A new approach for the comparison of conduction abnormality between arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia and Brugada syndrome. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2011; 16 : 263.

- 113) Yuka Mizusawa, Arthur A.M. Wilde; Arrhythmogenic Disorders of Genetic Origin “Brugada Syndrome”; *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2012; 5: 606-616.
- 114) Zaklyazminskaya Elena V. and Abriel Hugues; Prevalence of Significant Genetic Variants in Congenital Long QT Syndrome is Largely Underestimated; *Frontiers in Pharmacology* 2012- V.3 Article. 72.

Перечень лекарственных препаратов, противопоказанных больным с СБ

Антиаритмические препараты

Родовое наименование	Торговое название ®	Клиническое применение	Ссылки	Класс
<u>Аймалин</u>	например Gilurytmal ® - <u>другие</u> <u>названия</u> -	Антиаритмический препарат (1А: Na-блокатор) / Аритмия	<u>Бругада 1997</u> <u>Рольф 2003</u> <u>Вольперт 2005</u> <u>Bébarová 2005</u>	I
<u>Противоаритмического</u>	например Tambosor ® - <u>другие</u> <u>названия</u> -	Антиаритмический препарат (1С: Na-блокатор) / Аритмия	<u>Кришнан 1998</u> <u>Бругада 2000</u> <u>Gasparini 2003</u> <u>Meregalli 2006</u> <u>Стоко 2007</u>	I
<u>Pilsicainide</u>	например Sunrhythm ® - <u>другие</u> <u>названия</u> -	Антиаритмический препарат (1С: Na-блокатор) / Аритмия	<u>Takenaka 1999</u> <u>Фудзики 1999</u> <u>Такаги 2002</u> <u>Кимура 2004</u>	I
<u>Прокаинамида</u>	например Procan ® Pronestyl ® - <u>другие</u> <u>названия</u> -	Антиаритмический препарат (1А: Na-блокатор) / Аритмия	<u>Миядзаки 1996</u> <u>Бругада 1997</u> <u>Джоши 2007</u> <u>Villemaire 1992</u>	I
<u>Propafenone</u>	например Rythmol ® - <u>другие</u> <u>названия</u> -	Антиаритмический препарат (1С: Na-блокатор) / Аритмия	<u>Matana 2000</u> <u>Akdemir 2002</u>	IIa

Психотропные препараты

Родовое наименование	Торговое название ®	Клиническое применение	Ссылки	Класс
<u>Амитриптилин</u>	например Elavil ® Sarotex ® Тryptizol ® - <u>другие названия</u> -	Антидепрессивное (Трициклические)	<u>Болоньези 1997</u> <u>Rouleau 2001</u> <u>Bebarta 2007</u> <u>Нау 2000</u>	IIa
<u>Кломипрамин</u>	например Anafranil ® Anafril ® - <u>другие названия</u> -	Антидепрессивное (Трициклические)	<u>Goldgran 2002</u> <u>Пачер 2000</u>	IIa
<u>Дезипрамин</u>	например Norpramin ® Pentofran ® - <u>другие названия</u> -	Антидепрессивное (Трициклические)	<u>Babaliaros 2002</u> <u>Чоу 2005</u> <u>Ахтар 2006</u> <u>Sudoh 2003</u>	IIa
<u>Литий</u>	например Eskalith ® - <u>другие названия</u> -	Антидепрессивное	<u>Babalarios 2002</u> <u>Darbar 2005</u> <u>Райт 2010</u>	IIб
<u>Лохарин</u>	например Cloxazepine ® Loxitane ® - <u>другие названия</u> -	Антипсихотический	<u>Rouleau 2001</u> <u>Kinugawa 1988</u>	IIa
<u>Нортриптилин</u>	например Nortrilen ® Pamelor ® - <u>другие названия</u> -	Антидепрессивное (Трициклические)	<u>Bardai 2013</u> <u>Тада 2001</u> <u>Мьюир 1982</u> <u>Sudoh 2003</u>	IIa
<u>Окскарбазепин *</u>	например Trileptal ® - <u>другие названия</u> -	Антиэпилептические	<u>Эль-Менуар 2011</u> <u>Хуан 2008</u>	IIa
<u>Трифлуоперазин</u>	например Fluoperazine ® Stelazine ® - <u>другие названия</u> -	Антипсихотический (Фенотиазин)	<u>Rouleau 2001</u> <u>Клекнер 1987</u>	IIa

I: Препараты, применение которых противопоказано (отмечена аритмогенность)

II (а- б): Препараты, применения которых желательно избегать.

Таблица 2.

Последовательности праймеров для экзонов и прилегающих интронных областей гена *SCN5A*.

№	Номер экзона	Название праймера	Последовательность	ПЦР		Длина фрагмента (bp)
				ТМ ^{оС}	Циклов	
1	2	SCN5A-2f	TCTGGAGCCTCTCTGCAAATGGT	60	32	492
2		SCN5A-2r	GGAGTTGCACAGAAGGGTAGG			
3	3	SCN5A-3f	CTCCACCTCACCGCTCAG	60	32	258
4		SCN5A-3r	GGGGTACTCAGCAGGTATTA			
5	4	SCN5A-4f	TGTTTATTGTCTGGTAGCACTG	60	32	356
6		SCN5A-4r	AAAGAGGGTAGAAGCTGAG			
7	5	SCN5A-5f	CATTGCAGAGAGCCCCGTTTGAT	60	32	294
8		SCN5A-5r	GCAAGGCATAGCACAGCATAGC			
9	6	SCN5A-6f	TATCCCAGGTAAGATGCCCAGGTTTG	60	32	285
10		SCN5A-6r	GGCCCAGGCATATCCCTCTA			
11	7	SCN5A-7f	AAGCCTCCCTTATTCTGTCCCCAC	60	32	409
12		SCN5A-7r	GTCTCACAAAGTCTTCCCCAG			
13	8	SCN5A-8f	GGCAGAGAAGAAGGAAGAC	64	36	216
14		SCN5A-8r	TGGCAGGACAAGGAGAC			
15	9	SCN5A-9f	GAACAAAGTCACGGAGGCAG	60	32	360
16		SCN5A-9r	GACCCTGAGCCCACACTT			
17	10	SCN5A-10f	CTATGGCTATTTGAACCCCTG	60	32	400
18		SCN5A-10r	TTTACCCAGCATGTACCAC			
19	11	SCN5A-11f	GCAAGTCCACTTACTGATAG	60	32	332
20		SCN5A-11r	CCACCCTGGAAAAGCTAGAA			
21	12	SCN5A-12f	CAATGCTCTGAGAAGTTTAGCTG	60	32	553
22		SCN5A-12r	TGTATTTTTGGACTTGGCACTGG			
23	13	SCN5A-13f	CATCCCCAGCCTGAGTCTG	63	30	418

24		SCN5A-13r	TGAAACAGATGAAAAGACATGGAAGGA			
25	14	SCN5A-14f	GTCATCTCCCAGAGCAAGTCATAA	60	32	380
26		SCN5A-14r	CCAGGATGCCCATTTGAGAG			
27	15	SCN5A-15f	GCCACAGCAAGAGTCAAGAG	59	32	314
28		SCN5A-15r	GTTGTGCCGAGCCTTCCA			
29	16	SCN5A-16f	GAGCTAGAGAGAGTGAGGGT	60	32	529
30		SCN5A-16r	TAGATGGATTGATAGAAGGGTAAGTAAAT G			
31	17	SCN5A-17f	TCACAGGCAGTCTTAAAGGTCTCT	65	34	684
32		SCN5A-17r	GCCTTCTACCCCTACCCACTG			
33	18	SCN5A-18f	GGAGGAGTCTTCAGTGAGATGG	60	32	414
34		SCN5A-18r	TGTGGCTCCCAACAGCAAAT			
35	19	SCN5A-19f	ATGAAGATGCTGCCTCCCTT	63	34	362
36		SCN5A-19r	CAGAGGAATGGAGGAGGTG			
37	20	SCN5A-20f	TTCTCTCAGTCATCTCTTCAACCAT	60	32	378
38		SCN5A-20r	AGAGCACATTTTCAGCAGAGG			
39	21	SCN5A-21f	TGGGCAACAGAGCAAGACT	65	36	355
40		SCN5A-21r	CTCCGCCTCAGCTCCTTCT			
41	22	SCN5A-22f	CTCTCGCACCCAGCACCGT	60	32	330
42		SCN5A-22r	GCCATAGGACATCAGAAGCAC			
43	23	SCN5A-23f	CAGCCAGGGAGTTCATTCTTTCTTG	60	32	423
44		SCN5A-23r	AGCCATTGGGAGGAAGGAAGT			
45	24	SCN5A-24f	GTGGGGTGGCTTGCTTTTCATAA	60	32	269
46		SCN5A-24r	TGGGCTTTTCAGATGCAGACACT			
47	25	SCN5A-25f	CACAGAATGGACACCCCTAGACAG	60	32	291
48		SCN5A-25r	CCCCACCCTACCCAGCCAG			
49	26	SCN5A-26f	CAGGAGAGAAAGCCAGGAGGT	61	36	331
50		SCN5A-26r	CTGAAAGACTGTGAAGCGG			
51	27	SCN5A-27f	AGGGTGGGTGGTCTGGGATGAG	61	34	449
52		SCN5A-27r	AGCTAGGGTTGTACATGGCATTTCAG			
53	28	SCN5A-28f- 1	TGCACAGTGATGCTGGCTGGAAG	65	30	741
54		SCN5A-28r-	CTCAGTTTATTGA GTATTCGGTCC			

		1				
55		SCN5A-28f-2	GCCCTGTCTGAGCCACTCCG	62	32	691
56		SCN5A-28r-2	GCAGCCTTTTTACCCATGGCAAA			

Таблица 3.

Последовательности праймеров для экзонов и прилегающих интронных областей гена *SNTA1*.

№	Номер экзона	Название праймера	Последовательность	ПЦР		Длина фрагмента (bp)
				ТМ ^{оС}	Циклов	
1	1	SNT1A-f-1	CCCGCTAGGTAGTCCCAC	55	32	728
2		SNT1A-r-1	CCTTGGTGTGCCAGTGC			
3	2	SNT1A-f-2	TATTATTAGTGTTACTAGTGTCCC	56	32	611
4		SNT1A-r-2	TACACAGCTAGTGA CTGGA			
5	3	SNTA1-f-3	CTAAGGGTCTAATAGTGACACGT	60	32	374
6		SNTA1-r-3	CCACCACCTGACGCCAGGGC			
7	4	SNT1A-f-4	CCCTGGTTTTCTCCTGGTTTGG	62	32	531
8		SNT1A-r-4	AGAGACAAGTAGAGGAGCAGTTCC			
9	5	SNT1A-f-5	GACATCAAGCAGATTGGCTGGCTA	65	32	451
10		SNT1A-r-5	AGACAGGGCAGAGACTTGCTTCA			
11	6	SNT1A-f-6	CCCTTTGCCCAGAACTATTTGCC	60	32	395
12		SNT1A-r-6	ATCCACCCACCTTGACCTCC			
13	7-8	SNT1A-f-7-8	GCCTGTACCTATGTGCCCTC	64	32	600
14		SNT1A-r-7-8	AGTCCACTCTGTCCTGCGTC			

Таблица 4.

Последовательности праймеров для экзонов и прилегающих интронных областей гена *MOG1*.

№	Номер экзона	Название праймера	Последовательность	ПЦР		Длина фрагмента (bp)
				T ^o C	Циклов	
1	1-5	MOG-1-f	CAAATCTTAAAGGATCCGGGAG	58	32	1520
2		MOG-1-r	CCAAAACCAAAGGGAATCGAG			

Таблица 5.

Последовательности праймеров для экзонов и прилегающих интронных областей гена *SCN1B*.

№	Номер экзона	Название праймера	Последовательность	ПЦР		Длина фрагмента (bp)
				T ^o C	Циклов	
1	1	SCN1B-1-f	GTGCACCTAGCGGATGTG	65	30	602
2		SCN1B-1-f	AGCTGACTCCGCGTTTCCTC			
3	2	SCN1B-2-f	CTCAGCCTAGCATCCAGTC	65	30	413
4		SCN1B-2-f	GAATCCAGGTCAGCAATCAC			
5	3	SCN1B-3-f	TCTGAGCCCATCTGTGTGC	65	30	825
6		SCN1B-3-f	AACAGTAAGAACCGCCACCC			
7	4	SCN1B-4-f	TAATCACAGTGCATACACCAG	65	30	503
8		SCN1B-4-f	GGGTCTTTGAGGAATCTGGCTG			
9	5	SCN1B-5-f	GCTCCCAGCCAGATTCCTC	65	30	597
10		SCN1B-5-f	AAACAGGCAGCAGAAGCAG			

Таблица 6.

Последовательности праймеров для экзонов и прилегающих интронных областей гена *SCN2B*.

№	Номер экзона	Название праймера	Последовательность	ПЦР		Длина фрагмента (bp)
				ТМ ^{оС}	Циклов	
1	1	SCN2B-1-f	TTTAGCAGCAACATACAAGC	54	30	352
2		SCN2B-1-r	CTAGCAATGTCTTCTTTCCT			
3	2-3	SCN2B-2,3-f	TTAACTGGAGCTGTCAGGGA	58	30	975
4		SCN2B-2,3-r	CAGGTTCTTGAGGACTAGAGG			
5	4	SCN2B-4-f	TCGGCTTTGCTAAAGTCCTG	60	30	487
6		SCN2B-4-r	AGGGTGGGAGATACGAAGTC			

Таблица 7.

Последовательности праймеров для экзонов и прилегающих интронных областей гена *SCN3B*.

№	Номер экзона	Название праймера	Последовательность	ПЦР		Длина фрагмента (bp)
				ТМ ^{оС}	Циклов	
1	2	SCN3B-2-f	CCTTCCTTCGGTCAGAAAGTC	60	30	270
2		SCN3B-2-r	GTCACCAACGACATCAATGTG			
3	3	SCN3B-3-f	CATGACTCTTCCTTCTCTGTC	57	30	284
4		SCN3B-3-r	CATACAAGGAAATCTTTACCGC			
5	4	SCN3B-4-f	CTCTCAATGTCCGTCTCCTG	59	30	746
6		SCN3B-4-r	AAGAAGATGGGTCAATGGTG			
7	5	SCN3B-5-f	GGAGAGTCAGGATTTGGAATA CC	60	30	345
8		SCN3B-5-r	TGAGAGCAAGCATTCTGAAGG			

9	6	SCN3B-6-f	CTGTTCTGTAGATCCTTGCTCC	62	30	395
10		SCN3B-6-r	ACTCAGGTCAAAGCAGTTCAC			

Таблица 8.

Последовательности праймеров для экзонов и прилегающих интронных областей гена *SCN4B*.

№	Номер экзона	Название праймера	Последовательность	ПЦР		Длина фрагмента (bp)
				T ^o C	Циклов	
1	1	SCN4B-1-f	TGCCCGCTAACTTTCCCGAG	60	30	376
2		SCN4B-1-r	GGAGCACAGCCTATGAACCAG			
3	2	SCN4B-2-f	GTGATAGAGACCTACCTGCC	60	30	457
4		SCN4B-2-r	CTCCCAGTTACATCCTTCC			
5	3	SCN4B-3-f	AATTCAGGTTAGACAGGCAG	60	30	571
6		SCN4B-3-r	TTTAGATGTAACCTCCAGCAG			
7	4	SCN4B-4-f	GCCTGATAGATGCCATGCTC	60	30	507
8		SCN4B-4-r	GAAGAGGGAAAGCGATGAGG			
9	5	SCN4B-5-f	GTCATCCCTACCTCTATTTAC	60	30	414
10		SCN4B-5-r	GAAAGACTACAGTTTGAGCC			