

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневиц

«15» *Апрель* 2019 г.

Рег. номер № 038-0419

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ ОСТРЫХ
ЭКСТРАПИРАМИДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ
ОСЛОЖНЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ПАРАНОИДНОЙ
ШИЗОФРЕНИЕЙ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр психического здоровья», государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

АВТОРЫ:

Горгун О.В., к.м.н. Обьедков В.Г., д.м.н. Скугаревский О.А., к.б.н. Голоенко И.М., д.м.н. Скугаревская М.М.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
25.04.2019
Регистрационный № 038-0419

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ ОСТРЫХ
ЭКСТРАПИРАМИДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ
ОСЛОЖНЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ПАРАНОИДНОЙ ШИЗОФРЕНИЕЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Белорусский государственный медицинский университет», ГУ «Республиканский научно-практический центр психического здоровья», ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

АВТОРЫ: О. В. Горгун, канд. мед. наук В. Г. Обьедков, д-р мед. наук
О. А. Скугаревский, канд. биол. наук И. М. Голоенко, д-р мед. наук
М. М. Скугаревская

Минск 2019

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана для оценки вероятности возникновения острых лекарственно-индуцированных расстройств у пациентов с параноидной шизофренией, которые нуждаются в лечении антипсихотиками. Метод основан на наличии связи между полиморфными локусами генов *CYP2D6*, *DRD2/ANKK1*, *MDR1*, *GST-M1*, *GST-T1* и вероятностью возникновения острых лекарственно-индуцированных акатизии и паркинсонизма и может быть использован в оказании комплексных медицинских услуг пациентам с параноидной шизофренией.

Данная инструкция предназначена для врачей-психиатров-наркологов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Ватные палочки в неповрежденной упаковке или специальные разовые зонды с синтетическим ворсом в индивидуальной упаковке.
2. Стерильные одноразовые пробирки типа «эппендорф».
3. Специальный медицинский контейнер для транспортировки биоматериала.
4. Оборудование и реагенты для выделения ДНК из биоматериала и генотипирования (приложение 1).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Параноидная шизофрения (F20.01, F20.00, F20.02, F20.03, F20.09).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап 1. Подготовка пациента к получению биологического материала

1. За 0,5 ч до сбора образцов пациент должен воздержаться от еды, питья, а также курения.
2. Непосредственно перед получением образцов биологического материала пациент должен тщательно прополоскать рот водой или физиологическим раствором.

Этап 2. Сбор биологического материала

1. Извлеките чистую ватную палочку или специальный зонд из упаковки, касаясь их пальцами только за один кончик.
2. Аккуратно и с нажимом протрите ватной палочкой или специальным зондом внутреннюю поверхность обеих щек. Следует сделать 10–20 движений палочкой или зондом, поворачивая их во рту; продолжительность по времени — 30–45 с.
3. Отрежьте ножницами и выбросите тот конец ватной палочки или нерабочую часть зонда, за которые держались рукой. При этом не касайтесь пальцами и посторонними предметами той части палочки или зонда, на которой содержится биологический материал в виде буккального эпителия.

4. Оставшуюся часть ватной палочки или зонда положите для просушки на отдельный чистый лист бумаги.

5. Повторите пункты 1–3, используя новую ватную палочку или специальный зонд. Положите новый отрезок палочки или зонда на тот же лист.

6. Просушите образцы ватных палочек или специальных зондов при комнатной температуре, избегая попадания прямых солнечных лучей в течение 30–60 мин.

7. Поместите каждый образец ватных палочек или специальных зондов в отдельную стерильную пробирку типа «эппендорф», закройте пробирки.

8. Подпишите каждую пробирку, указав маркировку или шифр образца и дату взятия биологического материала.

Забор буккального эпителия по вышеописанной методике может производиться самостоятельно обследуемым под контролем медперсонала; процедура совершенно безболезненна, бескровна и нетравматична.

Этап 3. Хранение и транспортировка биоматериала в генетическую лабораторию

1. При комнатной температуре пробирка с биоматериалом может храниться не более 6 ч, при температуре 2–8 °С — до 3-х сут. Допускается только однократное замораживание материала.

2. Доставка пробирки в генетическую лабораторию должна происходить по стандартным правилам транспортировки биологического материала в специальном медицинском контейнере. Срок доставки биоматериала не должен превышать время хранения образца. При использовании обычного медицинского контейнера без охлаждения биоматериал должен быть доставлен в лабораторию не позднее 6 ч от момента его взятия или размораживания.

Этап 4. Выделение ДНК из биоматериала и генотипирование

Выделение из биоматериала ДНК осуществляется по стандартной методике. Аллельное состояние генов *CYP2D6*, *DRD2/ANKK1*, *MDR1*, *GST-M1*, *GST-T1* определяется стандартными методами ПЦР-ПДРФ и кПЦР-РВ с использованием зондов TaqMan в молекулярно-генетической лаборатории (приложение 2).

Клиническое значение результатов генотипирования

1. Аллельное состояние гена *CYP2D6*:

генотип А/А — высокая вероятность развития острого лекарственного паркинсонизма. Рекомендовано: назначать *CYP2D6*-независимые антипсихотики (приложение 3, таблица 1): трифлуоперазин, клозапин, оланзапин, кветиапин, палиперидон;

генотип G/A — средняя вероятность развития острого лекарственного паркинсонизма. Рекомендовано: назначать *CYP2D6*-независимые антипсихотики (приложение 3, таблица 1): трифлуоперазин, клозапин, оланзапин, кветиапин, палиперидон;

генотип G/G — низкая вероятность экстрапирамидного синдрома (ЭПС). Рекомендовано: назначение лечения в соответствии с клиническими протоколами.

2. Аллельное состояние гена *DRD2/ANKK1*:

генотип A1/A1 — низкая вероятность ЭПС. Рекомендовано: назначение лечения в соответствии с клиническими протоколами;

генотип A1/A2 — низкая вероятность ЭПС. Рекомендовано: назначение лечения в соответствии с клиническими протоколами;

генотип A2/A2 — высокая вероятность развития острого лекарственного паркинсонизма. Рекомендовано: назначение антипсихотиков, которые обладают малой аффинностью к D2-рецепторам (приложение 3, таблица 2): хлорпротиксен, флупентиксол, сульпирид, амисульпирид, рисперидон, сертиндол, клозапин, оланзапин, кветиапин.

3. Аллельное состояние гена *MDR1*:

генотип C/C — низкая вероятность ЭПС. Рекомендовано: назначение лечения в соответствии с клиническими протоколами;

генотип C/T — низкая вероятность ЭПС. Рекомендовано: назначение лечения в соответствии с клиническими протоколами;

генотип T/T — высокая вероятность развития острого лекарственного паркинсонизма. Рекомендовано: назначение антипсихотиков, являющихся субстратами гликопротеина-P: трифлуоперазин, хлорпромазин, флуфеназин, зуклопентиксол, флупентиксол, хлорпротиксен, сульпирид, рисперидон, оланзапин, кветиапин, арипипразол, сертиндол, зипрасидон, клозапин, амисульпирид.

4. Наличие делеции в гене *GST-M1*:

нет делеции — низкая вероятность ЭПС. Рекомендовано: назначение лечения в соответствии с клиническими протоколами;

делеция — высокая вероятность развития острой лекарственной акатизии. Рекомендовано: назначение антипсихотиков, не образующих активные метаболиты (приложение 3, таблица 3): флуфеназин, трифлуоперазин, галоперидол, зуклопентиксол, клозапин, оланзапин, сульпирид, амисульпирид, арипипразол, палиперидон.

5. Наличие делеции в гене *GST-T1*:

нет делеции — низкая вероятность ЭПС. Рекомендовано: назначение лечения в соответствии с клиническими протоколами;

делеция — высокая вероятность развития острой лекарственной акатизии. Рекомендовано: назначение антипсихотиков, не образующих активные метаболиты (приложение 3, таблица 3): флуфеназин, трифлуоперазин, галоперидол, зуклопентиксол, клозапин, оланзапин, сульпирид, амисульпирид, арипипразол, палиперидон.

При наличии аллелей риска в нескольких генах у одного пациента следует учитывать рекомендации по каждому пункту. Например, у пациента выявлены следующие генотипы: G/A в гене *CYP2D6*, A2/A2 в гене *DRD2/ANKK1*, C/T в гене *MDR1*, делеция в гене *GST-M1* и делеция в гене *GST-T1*. Следовательно, у пациента имеется высокий риск развития, как острого лекарственного паркинсонизма, так и острой лекарственной акатизии. Для минимизации риска развития этих осложнений ему могут быть рекомендованы только следующие антипсихотики: клозапин, оланзапин, т. е. те антипсихотики, которые

повторяются в рекомендациях к каждому из данных аллельных состояний исследуемых генов.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Использование любых нагревательных приборов (фен, примус, микроволновая печь и др.) для ускорения просушки, или просушивание биоматериала под прямыми солнечными лучами.

При нарушении выполнении ПЦР могут быть неверные — ложноположительные или ложноотрицательные результаты. Во избежание диагностических ошибок лаборантам необходимо соблюдать основные правила работы в молекулярно-генетической лаборатории.

Перечень необходимого оборудования и реактивов с описанием стандартных методов для всех генотипируемых локусов:

Таблица 1. — Оборудование для проведения ПЦР

| Наименование оборудования | Необходимое количество |
|--|------------------------|
| Амплификатор | 5 |
| Миницентрифуга-вортекс | 5 |
| Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 200–1000 мкл) | 5 |
| Холодильник с морозильной камерой | 5 |
| Хладоэлемент | 5 |

Таблица 2. — Оборудование для детекции результатов ПЦР путем электрофоретического разделения амплифицированных фрагментов

| Наименование оборудования | Необходимое количество |
|--|------------------------|
| pH-метр | 5 |
| Водяная баня/СВЧ-печь | 5 |
| Источник питания с постоянным током | 5 |
| Камера для горизонтального электрофореза | 5 |
| Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 200–1000 мкл) | 5 |
| Набор пластиковых кювет для геля | 5 |
| Набор планшетов для смешивания образцов с краской | 5 |
| Набор посуды для приготовления агарозного геля | 5 |
| Трансиллюминатор | 5 |

Таблица 3. — Реактивы для проведения ПЦР

| Наименование реактива | Назначение реактива | Количество на 1 исследование |
|---|--|------------------------------|
| 10x буфер для taq-полимеразы | Смесь реактивов для создания оптимальных условий для taq-полимеразы | 1,5 мкл |
| Taq-полимераза | Фермент, осуществляющий синтез ДНК | 1,5 ед. |
| MgCl ₂ 25 mM | Донор ионов Mg ²⁺ , необходимых для работы taq-полимеразы | 0,9 мкл |
| Смесь dNTP25 mM (дезоксирибонуклеотидтрифосфатов) | Мономер для синтеза ДНК | 1,8 мкл |
| Олигонуклеотидные праймеры 10 pM | «Затравка» для начала синтеза новой нити ДНК | По 0,75 мкл каждого |
| Образец тотальной ДНК | Матрица для синтеза ДНК | 1,2 мкл |
| ДМСО | Увеличивает вязкость смеси и денатурацию исходной ДНК-матрицы | 0,6 мкл |
| Стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз вода | Растворитель | 4,2 мкл |

Таблица 4. — Реактивы для проведения электрофоретического разделения продуктов амплификации

| Наименование реагента | Назначение реагента | Количество на 1 исследование |
|---------------------------|--|------------------------------|
| Агароза | Компонент агарозного геля | 2 г |
| Трис-основание | Компонент ТАЕ-буфера | 5,3 г |
| Ледяная уксусная кислота | Компонент ТАЕ-буфера | 1,3 мл |
| ЭДТА | Компонент ТАЕ-буфера | 2,2 мл |
| Водный раствор NaOH | Компонент ТАЕ-буфера | 20 мкл |
| Бромфеноловый синий | Компонент загрузочного буфера | 0,4 мг |
| Сахароза | Компонент загрузочного буфера | 64 мг |
| Дистиллированная вода | Растворитель | 20 мл |
| Маркер молекулярного веса | Набор фрагментов ДНК известного размера для определения размеров полученных ампликонов | 0,075 мкл |

Таблица 5. — Последовательности праймеров, использованных для проведения ПЦР для определения полиморфных аллелей исследованных генов

| Ген | Полиморфный локус | Последовательность олигонуклеотида |
|---------------|-------------------|---|
| <i>DRD2</i> | rs1800497 | [F] – 5'-CCGTCGACGGCTGGCCAAGTTGTCTA-3' |
| | | [R] – 5'- CCGTCGACCCTTCCTGAGTGTCATCA-3' |
| <i>GST-M1</i> | - | [F] – 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' |
| | | [R] – 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3' |
| <i>GST-T1</i> | - | [F] – 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' |
| | | [R] – 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3' |
| <i>CYP2D6</i> | rs 3892097 | [F] – 5'-TGCCGCCTTCGCCAACCCT-3' |
| | | [R] – 5'-TCGCCCTGCAGAGACTCCTC-3' |
| <i>MDR1</i> | rs1045642 | [F] – 5'-GATGGCAAAGAAATAAAGCGACTG-3' |
| | | [R] – 5'-ACCAGCCCCTTATAAATCAAACCTA-3' |

Расходные материалы: резиновые перчатки, наконечники для дозаторов (до 10, 200, 1 000 мкл), пробирки «эппендорф» (1,5 мл), ПЦР-пробирки (0,2 мл), штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда.

Таблица 6. — Состав растворов для горизонтального агарозного гелевого электрофореза

| Раствор/компонент | Количество |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 2 % агароза | |
| Агароза | 2 г |
| ТАЕ буфер 50x | 2 мл |
| Дистиллированная вода | До 100 мл |
| Бромистый этидий | До конечной концентрации 0,0001 % |
| Трис-ацетатный (ТАЕ) буфер 50x | |

Продолжение таблицы 6

| | |
|--|-----------|
| Трис-основание | 242 г |
| Ледяная уксусная кислота | 57 мл |
| ЭДТА- Na_2 0,5 моль/л (рН 8,0) | 100 мл |
| Дистиллированная вода | До 1 л |
| <i>ЭДТА-Na_2 0,5 моль/л (рН 8,0)</i> | |
| ЭДТА | 186,1 г |
| Водный раствор NaOH | До рН 8,0 |
| Дистиллированная вода | До 1 л |
| <i>Загрузочный буфер</i> | |
| Бромфеноловый синий | 0,125 г |
| Сахароза | 20 г |
| Дистиллированная вода | До 50 мл |

Приготовление геля

Для приготовления агарозного геля следует смешать необходимые объемы ТАЕ буфера 50x и дистиллированной воды (таблица 6) в мерном цилиндре. Затем перелить полученный буфер в колбу с соответствующим количеством агарозы. После этого нагреть смесь на водяной бане или в СВЧ-печи до полного растворения агарозы и добавить бромистый этидий. Расплавленную агарозу залить в кювету с установленной гребенкой и подождать 10–15 мин до полного застывания геля. Полученный гель следует поместить в камеру для горизонтального электрофореза, заполненную ТАЕ 1x буфером.

Внесение образцов в гель

Перед внесением смешать 5–7 мкл продукта амплификации с 2 мкл загрузочного буфера. Внесение образцов в лунки геля осуществляется с помощью пипеточного дозатора, используя индивидуальные наконечники для каждого образца. Для определения размеров полученных фрагментов внести в одну из лунок геля маркер молекулярного веса. Для постановки реакции необходимы маркеры, содержащие фрагменты ДНК от 100 до 500 пар оснований с интервалом в 100 пар нуклеотидов.

Оптимальным напряжением является 100 В. Электрофоретическое разделение продуктов осуществляется в течение 40–50 мин, после чего гель следует извлечь из камеры и промыть дистиллированной водой. Промытый гель поместить в проходящий УФ свет.

Генотипирование полиморфных локусов

1. Протокол генотипирования полиморфного локуса 32806С>Т гена рецепторов D2-дофамина

Условия для амплификации

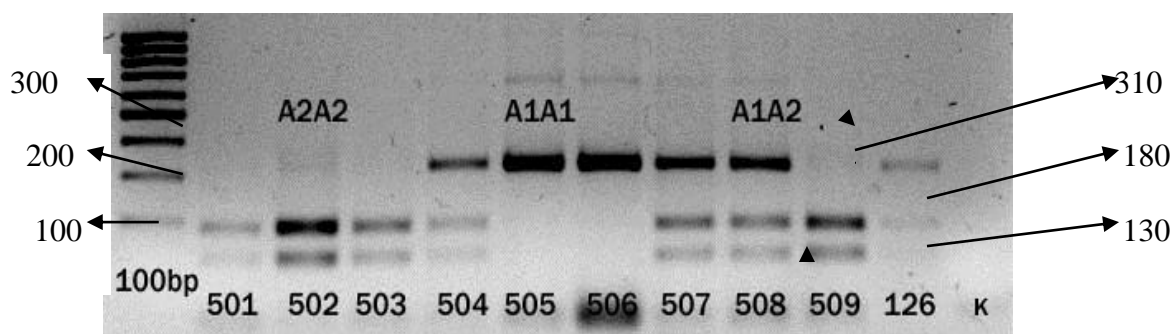
Амплификационная смесь объемом 15 мкл содержала 30–40 нг ДНК-матрицы, по 1 мкл каждого из праймеров (концентрация праймеров 10 пмоль/мкл) (таблица 3), 1 мкл $MgCl_2$ 25 mM), 1,5 мкл смеси $dNTP$ (2,5 mM), 1,5 мкл 10x буфера (750 ммоль/л $Tris-HCl$ (pH 8,8), 200 ммоль/л $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 % Тритон X-100, 10 моль/л Тартразин, 5 % Фикол 400), 0,15 мкл (0,75 единицы) taq -ДНК-полимеразы (Dialat) и 7,15 мкл стерильной деионизованной воды. Амплификация проводилась при следующих условиях:

| | |
|--------------|-------------|
| 94° — 3 мин | } 35 циклов |
| 94° — 1 мин | |
| 58° — 1 мин | |
| 72° — 1 мин | |
| 72° — 10 мин | |
| 4° — ∞ | |

Эндонуклеазная рестрикция ампликонов. После амплификации продукт ПЦР величиной 310 п.н подвергался расщеплению с помощью специфической эндонуклеазы TagIA. К 10 мкл амплифицированных образцов добавляли по 5 мкл премикса для рестрикции: 1,5 мкл буфера Tango/Tag, 0,5 мкл рестриктазы TagA1

(*Fermentas*, Латвия) и 3 мкл стерильной деионизованной воды на каждый образец. Далее пробирки помещали на 8 ч (на ночь) в термостат при температуре 65 °С.

Электрофорез в агарозном геле. Продукты рестрикции наносили на 2 % агарозный гель, содержащий этидиум бромид (0,0001 %). Разделение рестрикционных фрагментов величиной 310 п.н. (A1 аллель) и 180 + 130 п.н. (A2 аллель) производили в аппарате для горизонтального гель-электрофореза в 1xTAE буфере при напряжении 100 В. Полученную электрофореграмму фиксировали с помощью системы гель-документирования *VilberLourmat* (Франция). Гомозиготные генотипы «A1A1» и «A2A2» определяются по наличию на электрофореграмме фрагментов длиной 310 п.н. и 180 + 130 п.н. соответственно. Гетерозиготный генотип «A1A2» определяется на электрофореграмме присутствием всех фрагментов (рисунок 1).



501–509 — номера проб; 100bp — маркер длин ДНК; вверху — аллельное состояние гена *DRD2TagI*; справа — размеры амплифицированных фрагментов (310 п.н. для A1A1 генотипа и 180 и 130 п.н. для A2A2 генотипа); слева — размеры фрагментов маркера длин ДНК 100bp

Рисунок 1. — Электрофореграмма продуктов амплификации

2. Протокол генотипирования полиморфного локуса *CYP2D6*4*

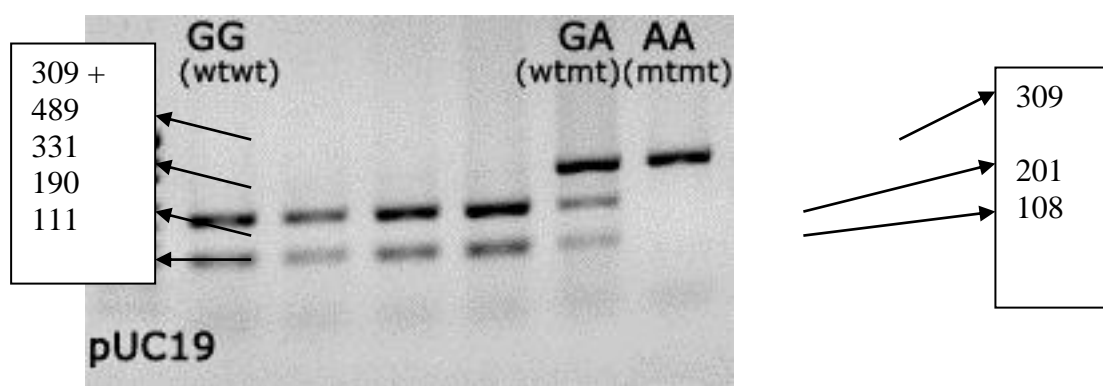
Генотипирование по полиморфным аллелям исследованных локусов проводилось с применением ПЦР-анализа. Для генотипирования аллелей *CYP2D6*4* были использованы праймеры, указанные в таблице 1.

Условия для амплификации. Амплификационная смесь объемом 15 мкл содержала 30–40 нг ДНК-матрицы, по 1 мкл каждого из праймеров (концентрация праймеров 10 пмоль/мкл) (таблица 3), 0,7 мкл $MgCl_2$ (25 mM), 1,5 мкл смеси *dNTP* (2,5 mM), 1,5 мкл 10x буфера (750 ммоль/л *Tris-HCl* (pH 8,8), 200 ммоль/л $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 % Тритон X-100, 10 ммоль/л Тартразин, 5 % Фикол 400), 0,15 мкл (0,75 единицы) *taq*-ДНК-полимеразы и 8,15 мкл стерильной деионизованной воды. Амплификация производилась при следующих условиях:

| | |
|--------------|--------------|
| 94° — 8 мин | } 30 циклов. |
| 62° — 2 мин | |
| 94° — 30 с | |
| 63° — 30 с | |
| 72° — 20 с | |
| 72° — 10 мин | |
| 4° — ∞ | |

Эндонуклеазная рестрикция ампликонов. После амплификации продукт ПЦР величиной 309 пн подвергался расщеплению с помощью специфической эндонуклеазы *MvaI*. К 10 мкл амплифицированных образцов добавляли по 5 мкл премикса для рестрикции: 1,5 мкл буфера Tango/Tag, 0,3 мкл рестриктазы *MvaI* и 3,2 мкл стерильной деионизованной воды на каждый образец. Далее пробирки помещали на 8 ч (на ночь) в термостат при температуре 37 °С.

Электрофорез в агарозном геле. Продукты рестрикции наносили на 2 % агарозный гель, содержащий этидиум бромид (0,0001 %). Разделение рестрикционных фрагментов величиной 309 п.н. (мутантный «*mt*» или *A* аллель) и 201 + 108 п.н. (дикий «*wt*» или *G* аллель) производили в аппарате для горизонтального гель-электрофореза в 1xTAE буфере при напряжении 100 В. Полученную электрофореграмму фиксировали с помощью системы гель-документирования *VilberLourmat* (Франция) (рисунок 2).



pUC19 — маркер длин ДНК «pUC19 ДНК/ *MspI*»; сверху — аллельное состояние гена *CYP2D6*; справа — размеры амплифицированных фрагментов (309 п.н. для AA (*mtmt*) генотипа и 201 и 108 п.н. для GG (*wtwt*) генотипа); слева — размеры фрагментов маркера длин ДНК pUC19/*MspI*

Рисунок 2. -Электрофореграмма продуктов амплификации

3. Протокол генотипирования полиморфного локуса *rs1045642* (*C3435T*) гена *MDR1*

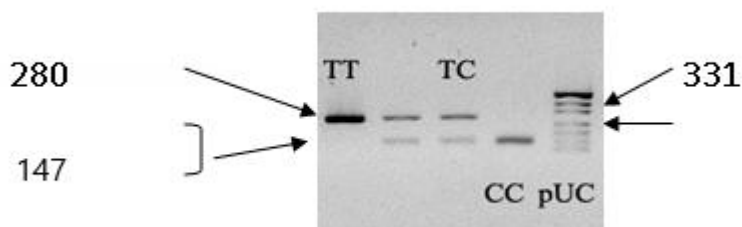
Генотипирование по полиморфным аллелям исследованных локусов проводилось с применением ПЦР-анализа. Для генотипирования аллелей *MDR1C3435T* были использованы праймеры, указанные в таблице 1.

Условия для амплификации. Амплификационная смесь объемом 15 мкл содержала 30–40 нг ДНК-матрицы, по 1 мкл каждого из праймеров (концентрация праймеров 10 пмоль/мкл) (таблица 3), 0,7 мкл *MgCl₂* (25 mM), 1,5 мкл смеси *dNTP* (2,5 mM), 1,5 мкл 10x буфера (750 ммоль/л *Tris-HCl* (pH 8,8), 200 ммоль/л $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 % Тритон X-100, 10 ммоль/л Тартразин, 5 % Фикол 400), 0,15 мкл (0,75 единицы) *taq*-ДНК-полимеразы и 8,15 мкл стерильной деионизованной воды. Амплификация производилась при следующих условиях:

| | |
|-------------|-------------|
| 94° — 5 мин | } 35 циклов |
| 94° — 1 с | |
| 55° — 1 с | |
| 72° — 1 с | |
| 72° — 5 мин | |
| 4° — ∞ | |

Эндонуклеазная рестрикция ампликонов. После амплификации продукт ПЦР величиной 280 п.н. подвергался расщеплению с помощью специфической эндонуклеазы MboI. К 10 мкл амплифицированных образцов добавляли по 5 мкл премикса для рестрикции: 1,5 мкл буфера Tango/Tag, 0,1 мкл рестриктазы MboI и 3,4 мкл стерильной деионизованной воды на каждый образец. Далее пробирки помещали на 8 ч (на ночь) в термостат при температуре 37 °С.

Электрофорез в агарозном геле. Продукты рестрикции наносили на 2 % агарозный гель, содержащий этидиум бромид (0,0001 %). Разделение рестрикционных фрагментов величиной 280 п.н. (Т аллель) и 147 + 133 п.н. (С аллель) производили в аппарате для горизонтального гель-электрофореза в 1хТАЕ буфере при напряжении 100 В. Полученную электрофореграмму фиксировали с помощью системы гель-документирования *VilberLourmat* (Франция) (рисунок 3).



pUC19 — маркер длин ДНК «pUC19 ДНК/ MspI»; TT, TC, CC — генотипы полиморфного локуса MDR1C3435T; слева — размеры амплифицированных фрагментов; справа — размеры фрагментов маркера длин ДНК pUC19/MspI

Рисунок 3. — Электрофореграмма продуктов амплификации

4. Протокол генотипирования полиморфных локусов *GSTM1(del)* и *GSTT1(del)*

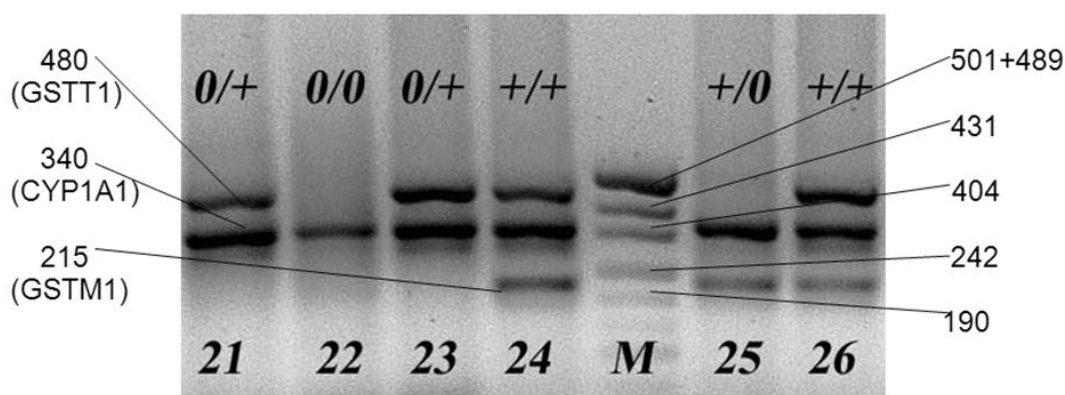
Аллельное состояние генов *GSTM1* и *GSTT1* определялось в мультиплексной реакции; внутренним контролем нативности ДНК-образца служила амплификация в той же пробирке гена *CYP1A1*.

Реакционная смесь для амплификации объемом 25 мкл содержала по 10 пмоль прямого и обратного праймера для каждого из генов, 1 мкл $MgCl_2$, 2,5 мкл смеси *dNTP*, 2,5 буфера (*Диалат, Москва*), 0,5 мкл Taq-полимеразы (*Диалат, Москва*), 1,5 мкл раствора ДНК. Амплификация производилась при следующих условиях:

| | | |
|-------------|---|----------|
| 94° — 5 мин | } | 33 цикла |
| 94° — 30 с | | |
| 58° — 45 с | | |
| 72° — 1 мин | | |
| 72° — 4 мин | | |

Ген *GSTM1* картирован на длинном плече хромосомы 1 (1q13). В тканях человека обнаружены три аллельных варианта этого гена: *GSTM1A* и *GSTM1B*, которые кодируют ферменты со сходной активностью, и *GSTM10*, отличающийся от остальных наличием протяженной делеции (около 8 т.п.н.), что проявляется в полном отсутствии синтеза белкового продукта. Этот так называемый нулевой аллель (генотип 0/0) весьма широко распространен (до 100 % в некоторых популяционных группах). Ген *GSTT1* локализован на 22 хромосоме (22q11.23). Как и в случае с геном *GSTM1*, с высокой частотой обнаруживается большая делеция в структурной части этого гена (около 30 % европеоидов гомозиготны по данной делеции).

Присутствие хотя бы одного неделетированного аллеля гена *GSTM1* (генотипы +/+ и +/-) определялось по наличию на электрофореграмме фрагмента длиной 215 п.н.; его отсутствие свидетельствовало о гомозиготности по нулевому аллелю (генотип 0/0). Соответствующий размер для гена *GSTT1* — 480 п.н. Успешность амплификации определялась по присутствию фрагмента гена *CYP1A1* размером 340 п.н. (рисунок 4).



21–26 — номера проб; M — маркер длин ДНК pUC/MspI; вверху — аллельное состояние генов *GSTM1/GSTT1*; слева — размеры амплифицированных фрагментов и названия соответствующих им генов; справа — размеры фрагментов маркера длин ДНК pUC19/MspI. Размеры даны в парах нуклеотидов

Рисунок 4. — Электрофореграмма продуктов амплификации

Таблица 1. — Субстратная специфичность лекарственных средств из группы антипсихотиков

| Код АТС/D DD | Лекарственные средства из группы антипсихотиков | Семейства системы ферментов CYP 450 | | | |
|--------------|--|--|--------|--------|---------|
| | | CYP2D6 | CYP3A4 | CYP1A2 | CYP2C19 |
| N05AA | Phenothiazines aliphatic side-chain | | | | |
| N05AA | Chlorpromazine | ++ | + | + | – |
| N05AB | Phenothiazines piperazine | | | | |
| N05AB | Fluphenazine | ++ | – | – | – |
| N05AB | <u>Perphenazine</u> | ++ | ++ | ++ | ++ |
| N05AB | Trifluoperazine | – | – | ++ | – |
| N05AC | Phenothiazines piperidine | | | | |
| N05AC | Periciazine | ++ | ++ | – | – |
| N05AC | Thioridazine | ++ | ++ | ++ | ++ |
| N05AD | Butyrophenone derivatives | | | | |
| N05AD | Haloperidol | ++ | ++ | + | + |
| N05AE | Indole derivatives | | | | |
| N05AE | Sertindoli | ++ | ++ | – | – |
| N05AF | Thioxanthene derivatives | | | | |
| N05AF | Thiothixene | – | – | ++ | – |
| N05AF | Zuclopenthixol | ++ | – | – | – |
| N05AG | Diphenylbutylpiperidine derivatives | | | | |
| N05AG | Pimozide | – | ++ | ++ | – |
| N05AH | Diazepines, oxazepines, thiazepines and oxepines | | | | |
| N05AH 02 | Clozapine | + | ++ | ++ | + |
| N05AH 03 | Olanzapine | ++ | – | ++ | – |
| N05AH 04 | Quetiapine | + | ++ | – | – |
| N05AL | Benzamides | | | | |
| N05AL | Sulpiride | ++ | – | – | – |
| N05AX | Other antipsychotics | | | | |
| N05AX | Aripiprazole | ++ | + | – | – |
| N05AX | Paliperidone | ++ | ++ | – | – |
| N05AX | Risperidone | ++ | + | – | – |
| | | «++» — основной метаболический путь; «+» — дополнительный, запасной (второстепенный) метаболический путь. | | | |

Таблица 2. — Фармакокинетические параметры лекарственных средств из группы антипсихотиков

| Код АТС/ DDD | Лекарственные средства из группы антипсихотиков | Фармакокинетические параметры | | | |
|--------------|--|-------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| | | Биодоступность (%) | Время полужизни (ч) | Активные метаболиты | Пути элиминации |
| N05A | Phenothiazines aliphatic side-chain | | | | |
| N05A | Chlorpromazine | 50 | 30 | Есть | Почки, кишечник |
| N05A | Phenothiazines piperazine | | | | |
| N05A | Fluphenazine(depo) | 65 | 7–10 дней | Нет | Почки, печень |
| N05A | <u>Perphenazine</u> | 70 | 8–12 | Нет | Почки |
| N05A | Trifluoperazine | 35 | 15–30 | Нет | Почки, кишечник |
| N05A | Phenothiazines piperidine | | | | |
| N05A | Periciazine | 90 | 12–30 | Нет | Почки, кишечник |
| N05A | Thioridazine | 50 | 6–40 | Есть | Почки, кишечник |
| N05A | Butyrophenone derivatives | | | | |
| N05A | Haloperidol | 60 | 12–37 | Нет | Почки, кишечник |
| N05A | Indole derivatives | | | | |
| N05A | Sertindoli | 75 | 72 | Есть | Кишечник |
| N05A | Zuclopenthixol | 44 | 32 | Нет | Почки, кишечник |
| N05A | Diazepines, oxazepines, thiazepines and oxepines | | | | |
| N05A H02 | Clozapine | 50–60 | 8–12 | Нет | Почки, кишечник |
| N05A H03 | Olanzapine | 60 | 21–54 | Нет | Почки, кишечник |
| N05A H04 | Quetiapine | 83 | 7 | Есть | Почки, кишечник |
| N05A | Benzamides | | | | |
| N05A | Sulpiride | 27 | 6–8 | Нет | Почки |
| N05A | Amisulpiride | 48 | 3–4 | Нет | Почки |
| N05A | Other antipsychotics | | | | |
| N05A | Aripiprazole | 87 | 75 | Нет | Почки, кишечник |
| N05A | Paliperidone | 28 | 23 | Нет | Почки, кишечник |
| N05A | Risperidone | 70–94 | 20 | Есть | Почки, кишечник |

Таблица 3. — Профиль действия антипсихотических лекарственных средств на рецепторы головного мозга

| ЛС из группы антипсихотиков | Рецепторы головного мозга | | | | | | | | |
|-----------------------------|---------------------------|------|-----|-----|--------|--------|------------|-----|-----|
| | D1 | D2 | D3 | D4 | 5-НТ2а | 5-НТ2с | $\alpha 1$ | M | H1 |
| Clorpromazine | - | +++ | +++ | + | +++ | ? | +++ | ++ | ++ |
| Clorprotixen | + | ++ | ? | ? | +++ | ? | +++ | ++ | - |
| Fluphenazine | ++ | +++ | ? | ? | ++ | + | ++ | - | + |
| Flupenthixol | ++ | ++ | ? | ? | + | ? | + | - | - |
| Zuclopenthixol | + | +++ | ? | ? | + | ? | ++ | - | - |
| Haloperidol | + - | ++++ | +++ | +++ | + | - | ++ | - | - |
| Sulpiride | - | ++ | ? | - | - | ? | - | - | - |
| Amisulpiride | - | ++ | ? | - | - | ? | - | - | - |
| Risperidone | + - | ++ | ++ | ++ | ++++ | + | +++ | - | + |
| Sertindoli | + - | ++ | ++ | ++ | ++++ | +++ | +++ | - | - |
| Ziprasidoni | - | +++ | ++ | + | +++ | ++ | ++ | - | + - |
| Clozapine | + - | ++ | + - | + | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ |
| Olanzapine | - | ++ | - | - | ++ | + | - | - | - |
| Quetiapine | + - | + | + | - | ++ | + - | +++ | - | ++ |
| Aripiprasole | +++ | ++++ | ++ | ++ | +++ | ++ | - | ? | ? |

Примечания:

- 1) D — дофаминовые;
- 2) 5-НТ — серотониновые;
- 3) $\alpha 1$ — адреналовые;
- 4) M — мускариновые;
- 5) H1 — гистаминовые рецепторы;
- 6) «-» — отсутствие активности;
- 7) «+ -» — активность сомнительна;
- 8) «+» — слабая активность;
- 9) «++» — умеренная активность;
- 10) «+++» — выраженная активность;
- 11) «++++» — максимальная активность;
- 12) «?» — отсутствие данных.