

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра



Д.Л. Пиневич

« 5 » 2013 г.

Регистрационный номер № 180-7123

**Метод прогноза экстрапирамидных расстройств (ЭПР) при терапии шизофрении лекарственными средствами галоперидол (Haloperidol) и флуфеназин (Fluphenazine) по результатам генотипирования полиморфного локуса *CYP2D6\*4* системы цитохрома P-450**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

ГУ «РНПЦ психического здоровья»

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

АВТОРЫ: доцент, к.м.н. Обьедков В.Г., профессор, д.м.н. Скугаревский О.А.,  
к.б.в. Голоенко И.М.

Минск, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц

05.12.2013

Регистрационный № 180-1113

**МЕТОД ПРОГНОЗА ЭКСТРАПИРАМИДНЫХ РАССТРОЙСТВ (ЭПР)  
ПРИ ТЕРАПИИ ШИЗОФРЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СРЕДСТВАМИ  
ГАЛОПЕРИДОЛ (HALOPERIDOL) И ФЛУФЕНАЗИН (FLUPHENAZINE)  
ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПОЛИМОРФНОГО ЛОКУСА  
*CYP2D6\*4* СИСТЕМЫ ЦИТОХРОМА P-450**

инструкция по применению

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

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

Минск 2013

Данная инструкция по применению «Метод прогноза экстрапирамидных расстройств (ЭПР) при терапии шизофрении лекарственными средствами галоперидол (Haloperidol) и флуфеназин (Fluphenazine) по результатам генотипирования полиморфного локуса *CYP2D6\*4* системы цитохрома P-450» (далее — инструкция) предназначена для врачей-психиатров и врачей лабораторной диагностики. Инструкция направлена на рациональное применение лекарственных средств (ЛС) из группы антипсихотиков при лечении шизофрении, позволяющее получить экономический эффект.

**Краткая характеристика фермента *CYP2D6*.** Фермент *CYP2D6* представляет собой белок, состоящий из 497 аминокислотных остатков, имеющий молекулярную массу 55 кДа. Ген *CYP2D6* находится в 22 хромосоме, локусе 22q13.1. Экспрессия гена *CYP2D6* определяется вскоре после рождения человека и в течение всей жизни активность фермента *CYP2D6* не меняется. Ген *CYP2D6* метаболизирует более 20% всех лекарственных препаратов, включая часть ЛС из группы антипсихотиков, в т.ч. **галоперидол и флуфеназин**. Около 19,85% европейского населения являются носителями аллеля *CYP2D6\*4* (однонуклеотидная замена *G1846A*). Для них прием ЛС с узкой субстратной специфичностью к данному сегменту системы цитохрома P-450 невозможен из-за осложнений, возникающих в результате медленного типа метаболизма этих ЛС. У лиц с пониженной активностью цитохрома P-450 2D6 при применении стандартных доз ЛС наблюдается медленный тип их метаболизма ЛС, что приводит к развитию нежелательных лекарственных реакций.

## ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Перечень необходимого оборудования и реактивов представлен в табл. 1–4.

Таблица 1 — Оборудование для проведения ПЦР

Наименование оборудования	Необходимое количество
Амплификатор	1
Миницентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50 мкл; 20–200; 200–1000 мкл)	1
Холодильник с морозильной камерой	1
Хладоэлемент	1

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

Наименование оборудования	Необходимое количество
pH-метр	1
Водяная баня/СВЧ-печь	1

Источник питания с постоянным током	1
Камера для горизонтального электрофореза	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 200–1000 мкл)	1
Набор пластиковых кювет для геля	1
Набор планшетов для смешивания образцов с краской	1
Набор посуды для приготовления агарозного геля	1
Трансиллюминатор	1

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 <sub>2</sub> 25 mM	Донор ионов Mg <sup>2+</sup> , необходимых для работы taq-полимеразы	0,9 мкл
Смесь dNTP 25 mM (дезокси-рибонуклеотидтрифосфатов)	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

Расходные материалы: резиновые перчатки, наконечники для дозаторов (до 10, 200, 1000 мкл), пробирки Eppendorf (1,5 мл), ПЦР-пробирки (0,2 мл), штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда.

Материалом для выделения ДНК и выявления мутаций гена *CYP2D6* являются высушенные пятна цельной венозной крови на фильтровальных носителях.

### ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Наличие клинических показаний для назначения галоперидола и флуфеназина в терапии шизофрении.

### ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

### ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

#### 1. Условия для амплификации

Амплификационная смесь объемом 15 мкл должна содержать 30–40 нг ДНК-матрицы, по 1 мкл каждого из праймеров (концентрация праймеров 10 пмоль/мкл) (табл. 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 моль/л Тартразин, 5% Фикол 400), 0,15 мкл (0,75 ед.) *taq*-ДНК-полимеразы и 8,15 мкл стерильной деионизованной воды. Амплификация проводится при следующих условиях:

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

#### 2. Эндонуклеазная рестрикция ампликонов

После амплификации продукт ПЦР величиной 309 п.н. подвергается расщеплению с помощью специфической эндонуклеазы *Mva* I. К 10 мкл амплифицированных образцов добавляется по 5 мкл премикса для рестрикции: 1,5 мкл буфера Tango/Tag, 0,3 мкл рестриктазы *Mva* I и 3,2 мкл стерильной деионизованной воды на каждый образец. Далее пробирки помещают на 8 ч (на ночь) в термостат при температуре 37°C.

### 3. Электрофорез в агарозном геле

Продукты рестрикции наносят на 2% агарозный гель, содержащий этидий 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) проводят в аппарате для горизонтального гель-электрофореза в 1xTAE буфере при напряжении 100 В.

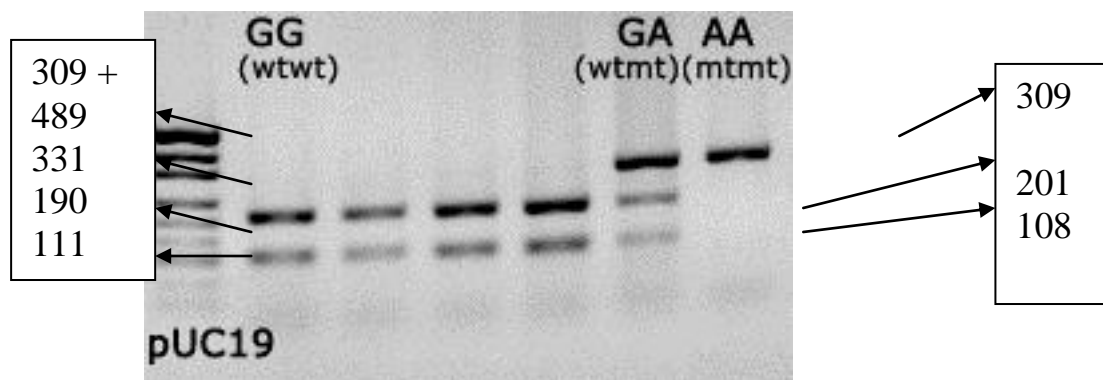


Рисунок — Электрофореграмма продуктов амплификации: pUC19 — маркер длин ДНК «pUC19 ДНК/ MspI»; сверху — аллельное состояние гена *CYP2D6*; справа — размеры амплифицированных фрагментов (309 п.н. для AA(*mtmt*) генотипа и 201 и 108 п.н. для GG(*wtwt*) генотипа); слева — размеры фрагментов маркера длин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

### 4. Проведение электрофоретического разделения продуктов амплификации

Для проведения детекции результатов амплификации фрагментов гена *CYP2D6* применяют pUC19 маркер длин ДНК «pUC19 ДНК/MspI» в горизонтальном электрофоретическом разделении в 2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий с последующей визуализацией в проходящем УФ-свете.

Таблица 6 — Состав растворов для проведения горизонтального агарозного гель-электрофореза

Раствор/компонент	Количество
<b>2% агароза</b>	
Агароза	2 г
ТАЕ буфер 50x	2 мл
Дистиллированная вода	До 100 мл
Бромистый этидий	До конечной концентрации 0,0001%
<b>Трис-ацетатный (ТАЕ) буфер 50x</b>	
Трис-основание	242 г
Ледяная уксусная кислота	57 мл
ЭДТА-Na <sub>2</sub> 0,5 моль/л (рН 8,0)	100 мл

Дистиллированная вода	До 1 л
<b>ЭДТА-Na<sub>2</sub> 0,5 моль/л (pH 8,0)</b>	
ЭДТА	186,1 г
Водный раствор NaOH	До pH 8,0
Дистиллированная вода	До 1 л
<b>Загрузочный буфер</b>	
Бромфеноловый синий	0,125 г
Сахароза	20 г
Дистиллированная вода	До 50 мл

### **5. 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 чего нужно 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.

### **6. Внесение образцов в гель**

Перед внесением следует смешать 5–7 мкл продукта амплификации с 2 мкл загрузочного буфера. Внесение образцов в лунки геля осуществляют с помощью пипеточного дозатора, используя индивидуальные наконечники для каждого образца. Для определения размеров полученных фрагментов следует 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 п.н.

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 помещают в проходящий УФ-свет.

### **Клиническое использование результатов теста**

Тест применяется у пациентов с первым психотическим эпизодом до начала лекарственной терапии. Генотипирование полиморфного локуса *CYP2D6\*4* системы цитохрома P-450 должно быть исполнено в течение 1-2 дней после забора материала для исследования.

При наличии у пациентов с первым психотическим эпизодом полиморфного локуса *CYP2D6\*4* системы цитохрома P-450 не назначается галоперидол и/или флуфеназин.

Тест применяется у пациентов с шизофренией, получающих галоперидол и/или флуфеназин, и у лиц с развитием экстрапирамидных расстройств во время лечения. При наличии у них полиморфного локуса *CYP2D6\*4* системы цитохрома P-450 галоперидол и/или флуфеназин заменяются другими ЛС. Генотипирование

полиморфного локуса *CYP2D6\*4* системы цитохрома Р-450 должно быть исполнено в течение 1–4 дней после забора материала для исследования.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Исполнение метода прогноза экстрапирамидных расстройств при терапии шизофрении лекарственными средствами галоперидол и флуфеназин по результатам генотипирования полиморфного локуса *CYP2D6\*4* системы цитохрома Р-450 требует строгого соблюдения правил при организации и проведении всех этапов анализа ПЦР-лаборатории. При нарушении проведения ПЦР могут быть неверные — ложноположительные или ложноотрицательные — результаты. Во избежание диагностических ошибок необходимо соблюдать основные правила работы в молекулярно-генетической лаборатории и следовать следующим технологическим приемам: на 1 этапе постановки реакции использовать образец тотальной ДНК, выделенной **фенольным методом**; на 4 этапе — pUC19 — маркер длин ДНК «**pUC19 ДНК/ MspI**»; на 4 этапе постановки реакции предпочтительно использовать систему гель-документирования *Vilber Lourmat*. При работе с бромистым этидием необходимо соблюдать условия стерильности и использовать только одноразовые стерильные перчатки.