

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

« 5 » 2013 г.

Регистрационный номер № 180-1123 .

Метод прогноза экстрапирамидных расстройств (ЭПР) при терапии шизофрении лекарственными средствами галоперидол (Haloperidol) и флуфеназин (Fluphenazine) по результатам генотипирования полиморфного локуса *CYP2D64 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.н. Голоенко И.М.

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 Р-450» (далее - инструкция) предназначена для врачей психиатров-наркологов и врачей лабораторной диагностики. Инструкция направлена на более эффективное применение ЛС (лекарственных средств) из группы антипсихотиков при лечении шизофрении, уменьшение экстрапирамидных осложнений и получение экономического эффекта за счет сокращения сроков госпитализации.

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 том числе **галоперидол (Haloperidol) и флуфеназин (Fluphenazine)**. 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 Р-450 невозможен из-за осложнений, возникающих в результате медленного типа метаболизма этих ЛС. У лиц с пониженной активностью цитохрома Р450 2D6 при применении стандартных доз ЛС нарушается равновесная концентрация, что приводит к развитию нежелательных лекарственных реакций.

Показания к применению

Наличие клинических показаний для назначения Haloperidol и/или Fluphenazine при первом психотическом эпизоде с симптомами пизофрении и при появлении экстрапирамидных симптомов при терапии шизофрении ЛС Haloperidol и/или Fluphenazine.

Противопоказания

Противопоказаний нет.

Перечень необходимого оборудования, реактивов

Исследование биологического материала проводится в клинико-диагностической (генетической) лаборатории.

Перечень необходимого оборудования и реактивов представлен в таблицах 1-4.

Таблица 1. - Оборудование для проведения ПЦР

Наименование оборудования	Необходимое к-во
Амплификатор	1
Миницентрифуга-вортекс	1
Комплект шприцочных дозаторов (0.5-10 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 200-1000 мкл)	1
Холодильник с морозильной камерой	1
Хладоэлемент	1

Таблица 2. - Реактивы для проведения ПЦР

Наименование реактива	Назначение реактива	Кол-во на 1 исслед.
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 dNTP 25 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	0,6 мкл

	денатурацию исходной ДНК-матрицы	
Стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз вода	Растворитель	4.2 мкл

Таблица 3. - Оборудование для детекции результатов ПЦР путем электрофоретического разделения амплифицированных фрагментов

Наименование оборудования	Необходимое к-во
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 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 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
Транслюминатор	1

Таблица 4. - Реактивы для проведения электрофоретического разделения продуктов амплификации

Наименование реагента	Назначение реагента	Кол-во на 1 исследование
Агароза	Компонент агарозного геля	2 г
Трис-основание	Компонент ТАЕ (трис-ацетатного 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.

Материал для исследования

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

Этапы постановки реакции

1. Амплификация

Амплификационная смесь объемом 15 мкл должна содержать 30 – 40 нг ДНК-матрицы, по 1 мкл каждого из праймеров[F] - 5'-TGCCGCCTTCGCCAACCAC-3', [R] - 5'-TCGCCCTGCAGAGACTCCTC-3' (концентрация праймеров 10 пикомоль/мкл) (концентрация праймеров 10 пикомоль/мкл) (таблица 2), 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 единицы) *taq*-ДНК-полимеразы и 8,15 мкл стерильной деионизованной воды. Амплификация проводится при следующих условиях:

94° - 8 минут.

62° - 2 минуты.

94° - 30 секунд.

63° - 30 секунд.

72° - 20 секунд.

72° - 10 минут.

4° - ∞

} 30 циклов.

2. Эндонуклеазная рестрикция ампликонов

После амплификации продукт ПЦР величиной 309 пн 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/Taq, 0,3 мкл рестриктазы Mva I и 3,2 мкл стерильной деионизованной воды на каждый образец. Далее пробирки помещают на 8 часов (на ночь) в термостат при температуре 37°C.

3. Электрофорез в агарозном геле

Продукты рестрикции наносят 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) проводят в аппарате для горизонтального геле-электрофореза в 1xTAE буфере при напряжении 100В.

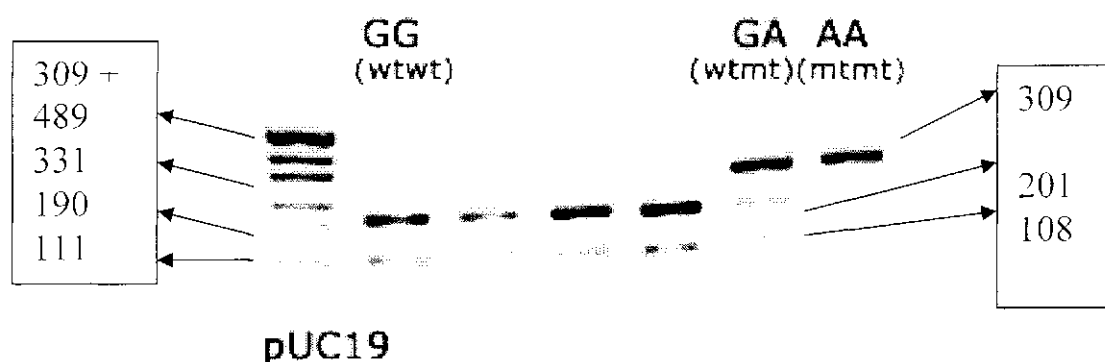


Рисунок - Электрофореграмма продуктов амплификации

Примечания: pUC19 – маркер длин ДНК «pUC19 ДНК/ MspI»; вверху -- аллельное состояние гена CYP2D6; справа – размеры амплифицированных фрагментов (309 п.н. для AA(mtmt) генотипа и 201 и 108 п.н. для GG(wtmt) генотипа); слева – размеры фрагментов маркера длин ДНК pUC19/MspI

4. Проведение электрофоретического разделения продуктов амплификации

Для проведения детекции результатов амплификации фрагментов гена CYP2D6 является применение pUC19 маркера 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	Кол-во
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	
Трис-основание	242 г
Ледяная уксусная кислота	57 мл
ЭДТА-Na ₂ 0,5 моль/л (pH 8,0)	100 мл
Дистиллированная вода	До 1 л
ЭДТА-Na₂ 0,5 моль/л (pH 8,0)	
ЭДТА	186,1 г
Водный раствор NaOH	До pH 8,0
Дистиллированная вода	До 1 л
Загрузочный буфер	
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 минут 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 осуществлять 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 пар нуклеотидов. Электрофоретическое разделение продуктов осуществляется в течение 40-50 минут, после чего гель следует извлечь из камеры и промыть дистиллированной водой. Промытый гель поместить в проходящий УФ свет.

Технологические особенности постановки реакции

1. При амплификации следует использовать образец тотальной ДНК, выделенной **фенольным методом**. Фенольный метод заключается в депротеинизации с протеиназой К и обработкой фенол-хлороформом. Из взятых на анализ проб вырезаются 1-2 пятна крови и помещаются в микроцентрифужную пробирку, содержащую 500–600 мкл лизирующего буфера (состав буфера: 10mMEDTA, 10 mMтрис-HCl, 50mMNaCl, 2% SDS, pH 7,5]. В каждую пробирку добавляют 15 мкл раствора протеиназы К в концентрации 10 мг/мл (до конечной концентрации 0,3 мг/мл), инкубируют 3 часа при 56⁰С, после чего последовательно проводят депротеинизацию фенолом, смесью фенол/хлороформ 1:1, смесью хлороформ: изоамиловый спирт 24:1. ДНК осаждают добавлением к водному раствору 10% объема 5М ацетата аммония и двойного объема 96% этанола, охлажденного до -20⁰ С. Для визуализации ДНК в каждую

пробирку добавляется 50-70 мкл 0,25% раствора ГРА (линейного полиакриламида), который используется в качестве соосадила (10-20 мкг на пробу). ДНК пробы высушиваются в термостате при 50°C и растворяются в стерильной деионизованной воде.

2. При амплификации следует использовать праймеры: [F] - 5'-TGCCGCCTTCGCCAACCAC - 3', [R] - 5'-TCGCCCTGCAGAGACTCCTC - 3'.

3. При электрофоретическом разделении продуктов амплификации следует использовать рUC19 – маркер длин ДНК «**рUC19 ДНК/ MspI**».

Клиническое использование результатов теста

Тест применяется пациентам с первым психотическим эпизодом до начала лекарственной терапии. Генотипирование полиморфного локуса *CYP2D6*4* системы цитохрома Р-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 Р-450 не назначается галоперидол (Haloperidol) и/или флуфеназин (Fluphenazine).

Тест применяется так же к пациентам с шизофренией, получающим галоперидол (Haloperidol) и/или флуфеназин (Fluphenazine), и у которых развились экстрапирамидные расстройства во время лечения. При наличии у них полиморфного локуса *CYP2D6*4* системы цитохрома Р-450 галоперидол (Haloperidol) и/или флуфеназин (Fluphenazine) заменяются другими ЛС. Генотипирование полиморфного локуса *CYP2D6*4* системы цитохрома Р-450 должно быть исполнено в течение 1-2 дней после забора материала для исследования.

Перечень возможных ошибок, ограничений и пути их устранения

Исполнение метода 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 требует строгого соблюдения правил при организации и проведении всех этапов анализа ИЦР-лаборатории. Во избежание диагностических ошибок необходимо соблюдать основные правила работы в молекулярно-генетической лаборатории и следовать описанным выше технологическим особенностям постановки реакции на 1 и 4 этапах.