

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2017 г.

Регистрационный № 097-1117



**МЕТОД ПЕРСОНАЛИЗАЦИИ ФАРМАКОТЕРАПИИ РАССТРОЙСТВ
ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА ПУТЕМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ CYP2D6,
CYP1A2, CYP2C9**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр психического здоровья»,

Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»

АВТОРЫ:

д.м.н. Докукина Т.В., к.х.н. Гилеп А.А., к.б.н. Голубева Т.С., Махров М.В.,
Гайдукевич И.В., Марчук С.А., Шеремет Е.А.

Минск, 2017

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
01.12.2017
Регистрационный № 097-1117

**МЕТОД ПЕРСОНАЛИЗАЦИИ ФАРМАКОТЕРАПИИ И РАССТРОЙСТВ
ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА ПУТЕМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр психического здоровья», ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»

АВТОРЫ: д-р мед. наук Т.В. Докукина, канд. хим. наук А.А. Гилеп, канд. биол. наук Т.С. Голубева, М.В. Махров, И.В. Гайдукевич, С.А. Марчук, Е.А. Шеремет

Минск 2017

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью повышения эффективности лечения пациентов с шизофренией, шизотипическими или бредовыми расстройствами за счет индивидуализированного подхода к назначению лекарственных средств (типичных и атипичных антипсихотиков) — субстратов изоферментов цитохромов CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9 — на основании выявления наличия/отсутствия полиморфизмов CYP2D6*4, CYP1A2*1F, CYP2C9*2, CYP2C9*3 генов CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9.

Настоящая инструкция предназначена для врачей-психиатров-наркологов, врачей лабораторной диагностики организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим шизофренией, шизотипическими или бредовыми расстройствами в амбулаторных и стационарных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Перечень необходимых медицинских изделий, материалов, реактивов и оборудования представлен в таблицах 1–5.

Таблица 1. — Оборудование, материалы и реактивы для выделения ДНК

Наименование	Количество
Ламинарный бокс	1
Настольная микроцентрифуга	1
Вортекс	1
Комплект автоматических дозаторов переменного объема (20–200; 200–1000 мкл)	1
Холодильник с морозильной камерой	1
Настольный термостат для пробирок типа «Эппендорф» (1,5 мл)	1
Набор для выделения ДНК из клеток буккального эпителия или из слюны с использованием мини-спин колонок.	1

Таблица 2. — Оборудование, материалы для проведения ПЦР и рестрикции

Наименование оборудования	Количество
Амплификатор с нагревающейся крышкой	1
Миницентрифуга	1
Вортекс	1
Комплект полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема (0,5–10; 2–20; 20–200; 200–1000 мкл)	1
Стерильный ламинарный бокс	1
Хладоэлемент	1

Таблица 3. — Реактивы для проведения ПЦР и рестрикции

Наименование реактива	Назначение
Вода milli-Q	
10x буфер для PCR	Смесь реактивов для создания

	оптимальных условий для работы Taq ДНК-полимеразы
25 mM MgCl ₂	Источник Mg ²⁺ ионов для работы Taq ДНК-полимеразы
Смесь dNTP (дезоксирибонуклеотидтрифосфатов) (концентрация каждого dNTP 2,5 mM)	Мономер для синтеза ДНК
Олигонуклеотидные праймеры	«Затравка» для синтеза новой цепочки ДНК
Taq ДНК-полимераза (5 ед./мкл)	Фермент, осуществляющий синтез ДНК
Образец геномной ДНК	Матрица для синтеза ДНК
10x буфер для рестриктазы	Смесь реактивов для создания оптимальных условий для работы рестриктаз
Рестриктаза BstNI, ApaI, AvaII, KpnI,	Эндонуклеазы, осуществляющие расщепление цепочки ДНК в определенных местах для детекции полиморфизмов CYP2D6*4, CYP1A2*1F, CYP2C9*2, CYP2C9*3 соответственно

Таблица 4. — Оборудование для электрофореза

Наименование оборудования	Количество
pH-метр	1
Печь СВЧ	1
Источник питания с постоянным током	1
Камера для горизонтального/вертикального электрофореза	1
Форма для заливки геля	1
Набор пластиковых гребенок	1
Посуда для приготовления агарозного геля и буферов	
Комплект полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема (0,5–10; 2–20; 20–200; 200–1000 мкл)	1
Система гель-документации	1

Таблица 5. — Реактивы для электрофореза

Наименование реактива	Назначение
Вода milli-Q	
Агароза	Компонент агарозного геля
Трис-основание	Компонент TAE буфера
Ледяная уксусная кислота	Компонент TAE буфера
ЭДТА	Компонент TAE буфера, компонент буфера для внесения образца
Водный раствор NaOH	Компонент TAE буфера

Глицерин	Компонент буфера для внесения образца
Бромфеноловый синий	Компонент буфера для внесения образца
Маркер молекулярного веса	Определение размера фрагментов ДНК

Расходные материалы: одноразовые нитриловые неопудренные перчатки, наконечники для дозаторов (от 0,5 до 1000 мкл), пробирки типа «Eppendorf» на 1,5 мл, ПЦР-пробирки вместимостью 0,2 мл (отдельные и в стрипах по 8 шт.), штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда.

Материал для исследования: геномная ДНК, выделенная из слюны или буккального соскоба.

ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Шизофрения, шизотипические или бредовые расстройства (МКБ-10 F2).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Проведение полимеразной цепной реакции и рестрикции амплифицированных фрагментов ДНК

Для определения полиморфизмов целевых генов необходимо применять метод ПЦР с последующим анализом длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ(RFLP)).

Для амплификации участков ДНК, содержащих полморфные позиции, необходимо использовать олигонуклеотидные праймеры, последовательности которых представлены в таблице 6.

Таблица 6. — Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации целевых фрагментов ДНК

Полиморфизм	Последовательность олигонуклеотидного праймера
СУР2D6*4	F gTgATgggCAgAAgggCAC
	R gCAAATCCTgCTCTCCgA
СУР1A2*1F	F CATCACAggCTATTTgAACCAg
	R CTgAgggTTgAgATggAgAC
СУР2C9*2	F gTATTTTggCCTgAAACCCATA
	R ACCCTTggTTTTTCTCAACTC
СУР2C9*3	F gCACgAggTCCAgAggTAC
	R ACAAACTTACCTTgggAATgAgA

1.1. Определение полиморфизма СУР2D6*4

Реакционная смесь объемом 25 мкл должна содержать: 1х буфер для амплификации, 1 mM MgCl₂, 200 мкМ дНТФ, 0,6мкМ каждого праймера, 1 единицу Taq-ДНК-полимеразы, 10 нг ДНК.

Температурный режим амплификации должен состоять из следующих этапов: 1) 95°C — 3 мин; 2) 40 циклов: 94,5°C — 30 с, 62,6°C — 30 с, 72°C — 40 с; 3) 72°C — 5 мин. В результате амплификации получают продукты длиной 334 п.н.

Продукты амплификации необходимо обработать эндонуклеазой BstNI при температуре 37°C в течение 6 ч.

*1.2. Определение полиморфизма CYP1A2*1F*

Реакционная смесь объемом 25 мкл должна содержать: 1x буфер для амплификации, 1,5 mM MgCl₂, 200 мкМ дНТФ, 0,6 мкМ каждого праймера, 1 единицу Taq-ДНК-полимеразы, 10 нг ДНК.

Температурный режим амплификации должен состоять из следующих этапов: 1) 95°C — 5 мин; 2) 40 циклов: 94,5°C — 30 с, 65°C — 30 с, 72°C — 40 с; 3) 72°C — 5 мин. В результате амплификации получают продукты длиной 467 п.н.

Продукты амплификации обрабатывают эндонуклеазой ApaI при температуре 37°C в течение 6 ч.

*1.3. Определение полиморфизма CYP2C9*2 / CYP2C9*3*

Реакционная смесь объемом 25 мкл должна содержать: 1x буфер для амплификации, 2 mM MgCl₂, 200 мкМ дНТФ, 0,6 мкМ каждого праймера, 1 единицу Taq-ДНК-полимеразы, 10 нг ДНК.

Температурный режим амплификации должен состоять из следующих этапов: 1) 95°C — 3 мин; 2) 40 циклов: 94,5°C — 30 с, 61°C — 30 с, 72°C — 45 с; 3) 72°C — 5 мин. В результате амплификации получают продукты длиной 454 п.н. для CYP2C9*2 и 104 п.н. для CYP2C9*3.

Продукты амплификации CYP2C9*2 обрабатывают эндонуклеазой AvaII при температуре 37°C в течение 6 ч.

Продукты амплификации CYP2C9*3 обрабатывают эндонуклеазой KpnI при температуре 37°C в течение 6 ч.

2. Электрофорез и визуализация продуктов рестрикции

Разделение продуктов рестрикции CYP2D6*4, CYP1A2*1F, CYP2C9*2 рекомендуется проводить методом горизонтального гель-электрофореза в 2 % агарозном геле, содержащем бромистый этидий или его аналог. Для приготовления геля смешать 100 мл 1x TAE, 2 г агарозы, 5 мкл бромистого этидия. Нагреть смесь в микроволновой печи до полного растворения агарозы, остудить до комнатной температуры, залить форму для геля и вставить гребенки для формирования лунок. После застывания геля перенести его в камеру для электрофореза, содержащую 1x TAE. Смешать продукты рестрикции с 5 мкл буфера для внесения образцов и добавить по 25 мкл полученной смеси в гель. В первую лунку каждого ряда внести 3 мкл стандарта (кат. № SM0241, Thermo Fisher Scientific). Электрофорез проводить в течение 60 мин при напряжении 120 В.

Разделение продуктов рестрикции CYP2C9*3 рекомендуется проводить в 10 % полиакриламидном геле. Для приготовления разделяющего геля смешать 1,68 мл 30 % раствора мономеров (акриламид – NN'-метилен-бис-акриламид) с 2,02 мл воды и 1,25 мл 4x TBE-буфера, добавить 2,5 мкл TEMED и 25 мкл 10 %

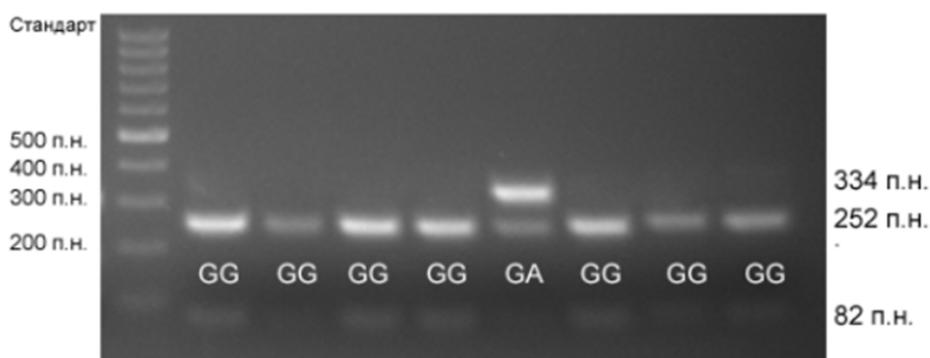
раствора персульфата аммония. Раствор залить в пространство между стеклами формы для геля, не доходя 0,5 см до нижнего края зубцов гребенки, сверху наложить воду. После полимеризации разделяющего геля воду слить. Сверху наложить раствор фокусирующего геля, (0,3 мл 30 % раствора мономеров, 1,2 мл воды, 0,5 мл 4x TBE-буфера, 7,5 мкл TEMED и 30 мкл 10 % раствора персульфата аммония), вставить в него гребенку и оставить полимеризоваться на 20 мин.

Для внесения продуктов рестрикции в гель использовать 6x загрузочный буфер, содержащий 15 % (w/v) фикола 400, 100 мМ Трис-НСl, 125 мМ ЭДТА, рН 8,0, 0,25 % краситель бромкрезоловый зеленый, и вносить по 8 мкл полученной смеси в лунку. В качестве стандартов длин ДНК-фрагментов использовать маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp DNA Ladder (кат. № SM0241, Thermo Fisher Scientific). Электрофорез проводить при напряжении 100 В в течение 80 мин в 1x TBE-буфере. После завершения электрофореза гель выдержать в 100 мл 1x TBE-буфера, содержащего 50 мкл красителя GelGreen (Biotium, США).

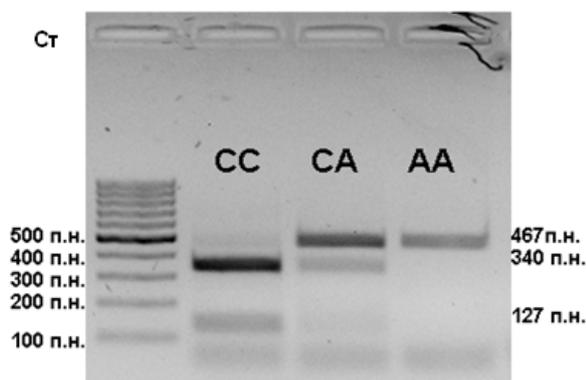
Агарозные/акриламидные гели анализировать в проходящем ультрафиолетовом свете с помощью гель-документирующей системы.

В результате рестрикционного анализа образуются фрагменты следующих длин:

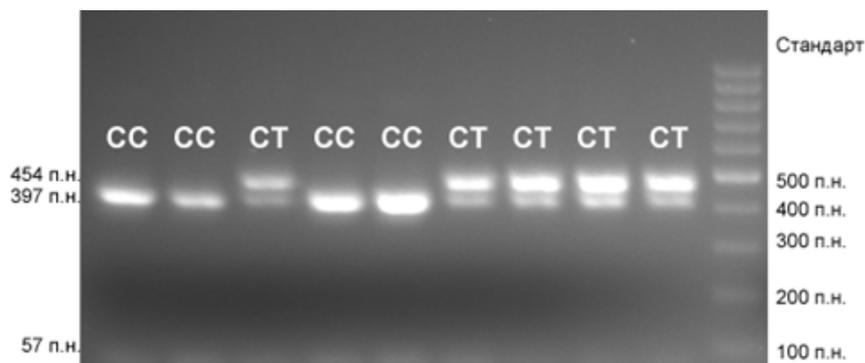
CYP2D6*4: GG генотип (дикий тип) (252 и 82 п.н.), GA генотип (334, 252 и 82 п.н.), AA генотип (334 п.н.)



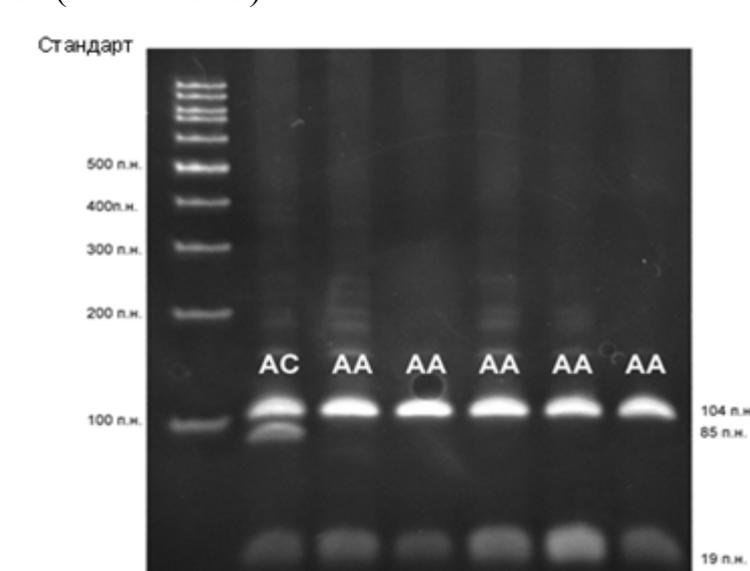
CYP1A2*1F: CC генотип (дикий тип) (340 и 127 п.н.), CA генотип (467, 340 и 127 п.н.), AA генотип (467 п.н.)



CYP2C9*2: CC генотип (дикий тип) (397 и 57 п.н.), CT генотип (454, 397 и 57 п.н.), TT генотип (454 п.н.).



CYP2C9*3: AA генотип (дикий тип) (104 п.н.), AC генотип (104, 85 и 19 п.н.), CC генотип (85 и 19 п.н.).



3. Интерпретация результатов и клинические рекомендации

В зависимости от скорости метаболизма лекарственных средств среди лиц, получающих лекарственную терапию, выделяют следующие группы:

- активные метаболизаторы (активность ферментов не изменена — большинство населения);

- «медленные» метаболизаторы, которым следует назначать лекарственные средства в меньшей дозе;

- «сверхактивные» или «быстрые» метаболизаторы, для которых доза лекарственного средства должна быть выше среднетерапевтической.

Пути метаболизма антипсихотических лекарственных средств представлены в таблице 7.

Таблица 7. — Пути метаболизма антипсихотических лекарственных средств

Группа лекарственных средств	Лекарственное средство	Изофермент системы цитохромов печени		
		CYP 1A2	CYP 2D6	CYP 2C9
Атипичные антипсихотики	Рisperидон		+	
	Оланзапин	+		
	Кветиапин			
	Арипипразол	+	+	
	Сертиндол	+	+	
	Зипрасидон	+		
	Азенапин	+		
	Клозапин	+		
Типичные антипсихотики	Амисульприд			
	Галоперидол	+	+	
	Трифлуоперазин	+		
	Хлорпромазин	+	+	
	Флуфеназин	+	+	
	Флупентиксол	+	+	
	Зуклопентиксол			
	Хлорпротиксен	+	+	
	Перициазин	+	+	
Сульпирид				

Примечание — + – субстрат фермента.

Генетические особенности пациентов, ассоциированные с изменениями фармакологического ответа, определяются при проведении фармакогенетического тестирования.

Наличие гомозиготного или гетерозиготного носительства аллельных вариантов CYP2D6*4, CYP2C9*2, CYP2C9*3 генов CYP2D6, CYP2C9 обуславливает замедление биотрансформации лекарственных средств-субстратов ферментов CYP2D6, CYP2C9 и повышение риска нежелательных лекарственных реакций.

Наличие гомозиготного носительства аллельного варианта CYP1A2*1F гена CYP1A2 обуславливает ускорение биотрансформации лекарственных средств-субстратов фермента CYP1A2 и снижает эффективность фармакотерапии.

3.1. Интерпретация результатов фармакогенетического тестирования при выявлении аллельных вариантов гена CYP2D6

3.1.1. При выявлении гомозиготного носительства «медленного» аллельного варианта CYP2D6*4 не применять галоперидол, хлорпромазин, флуфеназин, флупентиксол, зуклопентиксол, хлорпротиксен, перициазин, рisperидон, арипипразол, сертиндол. Рекомендуется выбрать клозапин, оланзапин, кветиапин, зипрасидон, азенапин, амисульприд, трифлуоперазин или сульпирид.

3.1.2. При выявлении гетерозиготного носительства «медленного» аллельного варианта CYP2D6*4 выбрать клозапин, оланзапин, кветиапин, зипрасидон, азенапин, амисульприд, трифлуоперазин или сульпирид, либо применять рисперидон, арипипразол, сертиндол, галоперидол, хлорпромазин, флуфеназин, флупентиксол, зуклопентиксол, хлорпротиксен или перициазин в дозировках на 30–50 % ниже регламентируемых клиническими протоколами.

3.1.3. При выявлении генотипа CYP2D6*1/*1 антипсихотики использовать в дозах, регламентированных клиническими протоколами.

3.2. Интерпретация результатов фармакогенетического тестирования при выявлении аллельных вариантов гена CYP1A2

Наличие быстрого аллельного варианта CYP1A2*1F (гомозиготное носительство) обуславливает снижение антипсихотического действия оланзапина, арипипразола, сертиндола, зипрасидона, азенапина, клозапина, галоперидола, трифлуоперазина, хлорпромазина, флуфеназина, флупентиксола, зуклопентиксола, хлорпротиксена, перициазина. В связи с этим данные лекарственные средства назначать в дозировках на 30–50 % выше регламентируемых клиническими протоколами либо те, которые не являются субстратами CYP1A2 (рисперидон, кветиапин, амисульприд, сульпирид).

3.3. Интерпретация результатов фармакогенетического тестирования при выявлении аллельных вариантов гена CYP2C9

При наличии медленных аллельных вариантов CYP2C9*2, CYP2C9*3 гена CYP2C9 применять фенитоин, карбамазепин, топирамат в дозировках на 30–50 % ниже регламентируемых клиническими протоколами.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Получение ложноположительных результатов может быть обусловлено загрязнением исследуемых образцов инородным биологическим материалом. Пути устранения:

- соблюдение принципов зонирования лаборатории для молекулярно-генетических исследований;
- использование спецодежды (стерильные перчатки, халат, бахилы, шапочка);
- использование стерильной одноразовой посуды, расходных материалов и растворов;
- использование отрицательных (не содержащих ДНК) контрольных образцов в каждой серии исследований;
- проведение исследования в повторе.

Получение ложноположительных результатов может быть обусловлено снижением или полной утратой активности используемых рестриктаз. Путь устранения: использование положительных (с известной последовательностью ДНК) контрольных образцов, лучше гетерозигот, в каждой серии.