

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич
13.04.2012
Регистрационный 044-0312

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ БЫСТРОПРОГРЕДИЕНТНОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ
ЗАВИСИМОСТИ У ЛИЦ МУЖСКОГО ПОЛА МОЛОДОГО
И ПОДРОСТКОВОГО ВОЗРАСТА НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА
ПЕРЕНОСЧИКА СЕРОТОНИНА**

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: канд. мед. наук, доц. А.В. Копытов, канд. мед. наук, доц. В.Г. Обьедков,
канд. биол. наук, ст. науч. сотр. И.М. Голоенко

Минск 2012

Данная инструкция по применению (далее — инструкция) предназначена для врачей-психиатров-наркологов, медицинских генетиков и иных специалистов, сталкивающихся в своей работе с проблемами алкогольной зависимости.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

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

Таблица 1 — Оборудование для проведения ПЦР

Наименование оборудования	Количество
Амплификатор	1
Миницентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 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	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 гребенок	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 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 рМ	«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.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Лица, страдающие алкогольной зависимостью в подростковом и молодом возрасте.
2. Лица с ранним началом употребления алкоголя.
3. Наличие в анамнезе:
 - родственников страдающих алкогольной зависимостью;
 - быстрая прогрессивность алкогольной зависимости;
 - низкая эффективность психотерапевтических и социально-ориентированных реабилитационных программ;
 - эмоционально-неустойчивый тип личности со склонностью к тревожно-депрессивным реакциям.

4. Преобладание атактической, гиперактивистической алкогольной мотивации.

5. Генетический скрининг наследственной предрасположенности к развитию алкогольной зависимости.

6. Профилактическая, лечебно-реабилитационная практика врачей-психиатров-наркологов.

7. В качестве заключительного этапа для окончательной экспертной оценки о предрасположенности к алкогольной зависимости после реализации психометрических методов, клинического анализа и генеалогического метода.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказаний для использования описываемого метода исследования не установлено.

Метод может и должен применяться по желанию граждан после объяснения его сути и прогностического значения.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Выделение ДНК

Материалом для выделения ДНК и выявления мутации гена *SLC6A4* являются высушенные пятна цельной венозной крови на фильтровальных носителях.

Для выделения тотальной ДНК из пятен крови используется принцип депротеинизации с протеиназой К и фенол-хлороформной обработкой. Из взятых на анализ проб вырезаются 1–2 пятна крови и помещаются в микроцентрифужную пробирку, содержащую 500–600 мкл лизирующего буфера (состав буфера: 10 mM EDTA, 10 mM трис-HCl, 50 mM NaCl, 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 ч при 56°C, 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 5M ацетата аммония и двойного объема 96% этанола, охлажденного до -20°C. Для визуализации ДНК в каждую пробирку добавляется 50–70 мкл 0,25% раствора LPA (линейного полиакриламида), который используется в качестве соосадителя (10–20 мкг на пробу). ДНК пробы высушиваются в термостате при 50°C и растворяются в стерильной деионизованной воде.

Полученные в результате образцы нативной высокоочищенной ДНК хранятся при -20°C и пригодны для ПЦР-анализа в течение многих лет.

Выделение ДНК целесообразно проводить с использованием готовых коммерческих наборов.

Полимеразная цепная реакция

Диагностика аллельного состояния гена переносчика серотонина включает определение инсерции или делеции величиной 44 п.н. Анализ аллельного состояния полиморфного локуса *5-HTTLPR* гена *SLC6A4* осуществляется методом ПЦР со специфическими праймерами:

[F]-5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATTGC-3';

[R]-5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCCAC-3'.

Амплификационная смесь объемом 15 мкл должна содержать: 1,5 мкл 10х 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), 7 мкл стерильной деионизованной воды, по 1 мкл каждого из праймеров (концентрация праймеров 10 пикомоль/мл), 0,7 мкл $MgCl_2$ (25 mM), 1,5 мкл смеси *dNTP* (2,5 mM), 1 мкл диметилсульфоксида (DMSO), 0,3 мкл (1,5 единицы) *taq*-ДНК-полимеразы. Приготовление амплификационной смеси осуществляется в пробирке Eppendorf (1,5 мл). В пробирки для ПЦР предварительно вносится 1 мкл (30–40 нг) растворенной ДНК-матрицы и 14 мкл амплификационной смеси, после чего пробирки следует поместить в амплификатор.

Амплификация проводится при следующих условиях:

95° — 5 мин

95° — 30 с

61° — 45 с, 33 цикла

72° — 1 мин

72° — 10 мин

4° — ∞

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации

После амплификации продукты ПЦР величиной 484 п.н. (S аллель) и 528 п.н. (L аллель) наносятся на 2% агарозный гель, содержащий этидиум бромид (0,0001%). Разделение фрагментов проводится в аппарате для горизонтального гель-электрофореза в 1хТАЕ буфере при напряжении 100В с последующей визуализацией в проходящем УФ-свете. Полученная электрофореграмма фиксируется с помощью системы гель-документирования.

Таблица 5 — Состав растворов для проведения горизонтального агарозного гель-электрофореза

Раствор/компонент	Количество
2% агароза	
Агароза	2 г
ТАЕ буфер 50х	2 мл
Дистиллированная вода	До 100 мл
Бромистый этидий	До конечной концентрации 0,0001%
Трис-ацетатный (ТАЕ) буфер 50х	
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-Na_2 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

Приготовление геля

Для приготовления агарозного геля следует смешать необходимые объемы ТАЕ буфера 50x и дистиллированной воды (таблица 5) 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.

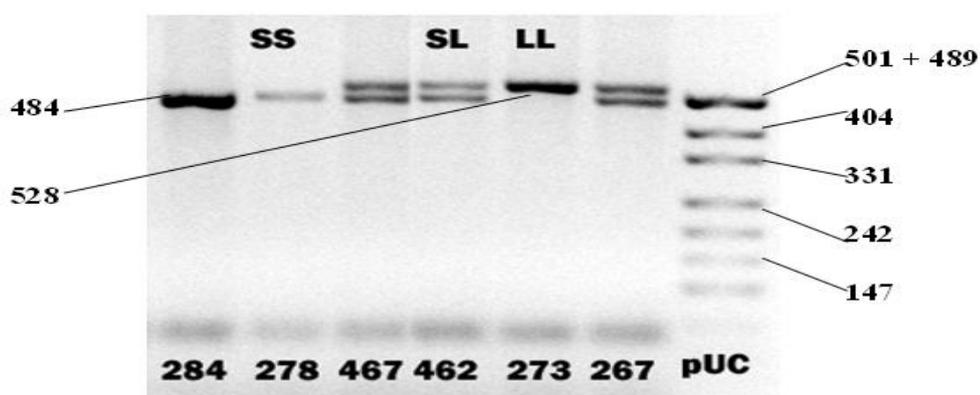
Внесение образцов в гель

Перед внесением следует смешать 5–7 мкл продукта амплификации с 2 мкл загрузочного буфера. Внесение образцов в лунки геля необходимо 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. Наиболее удобными будут 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.

Интерпретация данных

Гомозиготный генотип по длинному аллелю «LL» определяется по наличию на электрофореграмме фрагмента длиной 528 п.н., короткому аллелю «SS» — фрагмента 484 п.н. Гетерозиготный генотип «SL» определяется присутствием обоих фрагментов (рисунок 1).



284, 278, 467, 462, 273, 267 — номера проб; pUC — маркер длин ДНК *pUC/MspI*; сверху — аллельное состояние гена *SLC6A4*; слева — размеры амплифицированных фрагментов (484 п.н. для SS генотипа и 528 п.н. для LL генотипа); справа — размеры фрагментов маркера длин ДНК *pUC19/MspI*

Рисунок 1 — Электрофореграмма продуктов амплификации

При генотипах LL или SL возникает риск наследственной недостаточности метаболизма серотонина, употребления алкоголя с целью стимуляции нейротрансмиссии медиаторной системы серотонина и дальнейшим развитием алкогольной зависимости.

Клиническая значимость результатов

Семейная отягощенность по алкогольной зависимости является весомым и клинически подтвержденным признаком высокой биологической предрасположенности и повышенного риска к развитию болезни. Среди лиц, страдающих АЗ, больше субъектов имеют семейную наследственность по зависимости от алкоголя. Однако встречаемость генотипа «LL» в основной группе и контроле достоверно не отличаются. Проводили анализ связи вариантов полиморфизмов гена 5-HTTLPR с клиническими признаками алкогольной зависимости. В результате интерпретации выявленного генотипа у конкретного пациента (индивидуума) делали вывод о вероятности наличия и степени выраженности биологической врожденной предрасположенности к развитию быстропрогредиентной алкогольной зависимости и неблагоприятный прогноз варианта развития болезни.

По результатам генотипирования устанавливается генотип данного индивидуума (пациента) по полиморфному локусу 5-HTTLPR.

Возможны 3 варианта генотипа: SS, LS, LL.

Аллель «L», генотип «LL». Достоверный маркер предрасположенности к быстропрогредиентному варианту формирования СЗА. Развитие зависимости быстропрогредиентное, злокачественное.

Аллель «S», генотип «SS». Выступает протективным маркером в отношении быстрой прогредиентности алкогольной зависимости. Развитие зависимости медленнопрогредиентное, более доброкачественное.

Таблица фенотипических признаков характерных для различных вариантов полиморфизмов гена 5-HTTLPR

Фенотипические факторы	Генотипы		
	SS	LS	LL
Возраст первого употребления (лет)	16,4±0,4	15,9±0,3	15,8±0,2
Скорость формирования (лет)	5,5±0,4	5,3±0,6	3,4±0,6
Влечение к спиртному	навязчивое	навязчивое, компульсивное	постоянное
Психоз	менее вероятен	вероятен	менее вероятен
Эффекты алкоголя	улучшение коммуникабельности	повышение настроения	повышение настроения, уверенности
Психические девиации	отсутствует	акцентуации	невротичность
Психическое развитие	норма	норма	задержки
Поведение	норма	деликвентное	девиантное
Чувство подавленности	не свойственно	не свойственно	свойственно

Чувство тревоги	не свойственно	не свойственно	свойственно
Склонность к агрессии	не свойственно	не свойственно	свойственно
Суицид мысли	не свойственно	не свойственно	свойственно
Гипервозбудимость	свойственно	свойственно	не свойственно
Плаксивость в детстве	свойственно	не свойственно	свойственно
Эмоциональная лабильность	свойственно	не свойственно	свойственно
Асоциальное поведение	свойственно	не свойственно	свойственно
Скорость опьянение	медленная	медленная	быстрая
Психосоматические расстройства	свойственны	свойственны	не свойственно
Склонность к поиску впечатлений	свойственны	свойственны	не свойственно
Наследственная отягощенность по алкогольной зависимости, %			
Общая	9,5	40,1	50,3
По линии отца	13,1	39,3	47,6
По линии матери	2,9	40,0	57,1
По двум линиям	0	47,6	52,4
Личностные характеристики			
Теплота-равнодушие	равнодушие	теплота	теплота
Общительность-замкнутость	общительность	общительность	замкнутость
Экстраверсия-интроверсия	экстраверсия	экстраверсия	интроверсия

Таким образом, по совокупности фенотипических проявлений признаков представленных в таблице, можно обрисовать клинический «портрет» носителей различных аллелей и генотипов по гену 5-HTTLPR и предложить шкалу для интерпретации факта носительства маркера биологической предрасположенности.

Наличие генотипа «LL» не является детерминирующим фактором, однозначно приводящим к быстрой манифестации заболевания, но все же его наличие необходимо, но не достаточно, для развития быстропрогредиентной зависимости, т.к. в формировании АЗ играют роль генетические пороговые эффекты. Для реализации последних необходимо присутствие социальных и поведенческих факторов.

Для определения степени риска развития быстропрогредиентной АЗ молекулярно-генетические методы исследования могут быть использованы наряду с клинико-генеалогическими, клиническими, экспериментально-психологическими и нейрофизиологическими методами исследования.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Метод ПЦР требует строгого соблюдения правил при организации и выполнении всех этапов анализа ПЦР-лаборатории. При нарушении проведения ПЦР могут быть неверные (ложноположительные или ложноотрицательные) результаты. Во избежание диагностических ошибок рекомендуется соблюдать правила работы в молекулярно-генетической лаборатории.

Для выявления степени риска развития быстропрогредиентной зависимости от алкоголя могут быть использованы молекулярно-генетические методы исследования

наряду с клинико-генеалогическими, социально-психологическими. Учитывая, что при формировании АЗ предполагается участие нескольких генов, рекомендуется с большой осторожностью относиться к интерпретации того или иного «аллеля риска» и рассматривать данные генодиагностики только в комплексе с результатами клинических, психологических исследований.

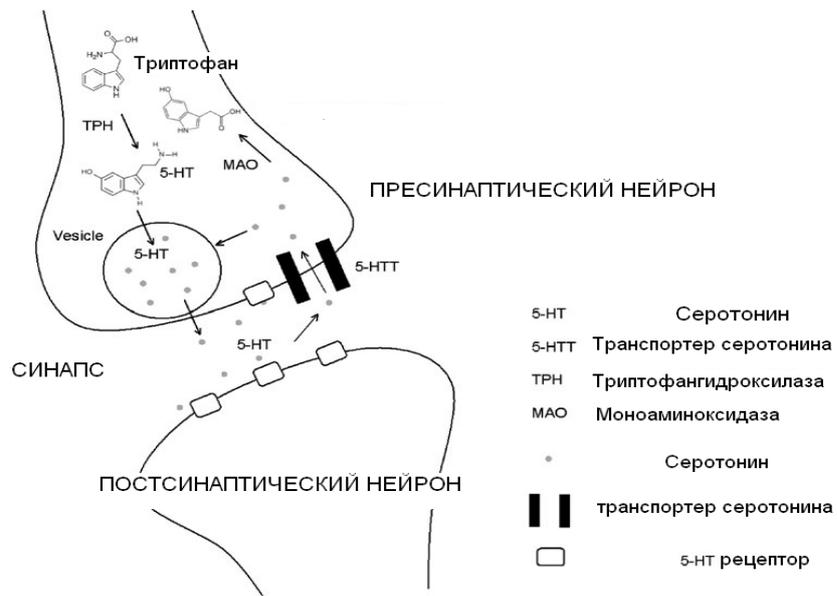


Рисунок 2 — Серотонинергический синапс

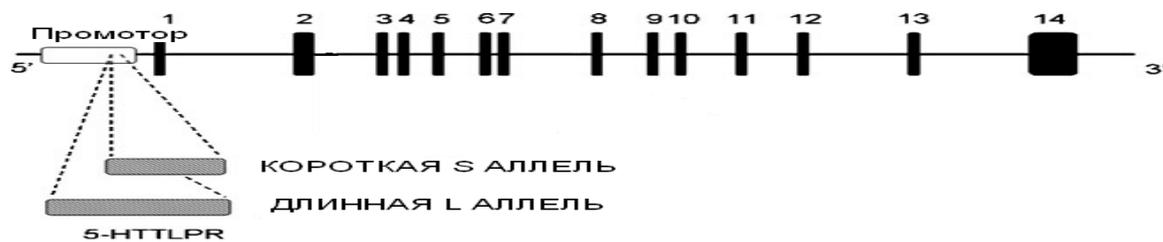


Рисунок 3 — Аллельный полиморфизм промоторной части гена переносчика серотонина