

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич



20 18 г.

Рекомендательный № 180 1116

**КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ
ТЯЖЁЛЫХ ОСЛОЖНЯЮЩИХСЯ ФОРМ ТЕЧЕНИЯ
СИНДРОМА АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр психического здоровья»;

государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»;

государственное научное учреждение «Институт цитологии и генетики НАН Беларуси»

АВТОРЫ: д-р мед. наук А. В. Копытов; д-р мед. наук, проф., чл. корр. НАН Республики Беларусь, иностранный член РАН Л. П. Титов; канд. биол. наук И. М. Голженко К. И. Павлов

Минск 2016.

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
27.11.2015

Регистрационный № 170-1115

**КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ
ТЯЖЕЛЫХ ОСЛОЖНЯЮЩИХСЯ ФОРМ ТЕЧЕНИЯ
СИНДРОМА АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук А.В. Копытов, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Беларуси, ин. чл. РАН Л.П. Титов, канд. биол. наук И.М. Голоенко, К.И. Павлов

Минск 2016

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод выявления тяжелых психических и метаболических нарушений, возникающих при синдроме алкогольной зависимости, требующих постоянной медикаментозной терапии в период ремиссии на основе детекции экспрессионных маркеров микросомальной глутатион-трансферазы (MGST1) и мышечной пируваткиназы (PKM2) с использованием технологии ДНК-биочипов.

Инструкция предназначена для врачей-психиатров-наркологов и других врачей-специалистов, оказывающих помощь пациентам с синдромом зависимости от алкоголя и аддиктивным типом личности.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Таблица 1. — Оборудование

Наименование оборудования	Назначение оборудования	Количество
Сканер биочипов с программным обеспечением	Сканирование биочипов	1
Центрифуга для слайдов	Сушка чипов после отмывки	1
Кассета для гибридизации	Гибридизация чипов	1
Ультрацентрифуга для микропробирок с охлаждением	Выделение РНК и синтез кДНК	1
Твердофазный термостат	Синтез кДНК	1
Миницентрифуга-вортекс	Выделение РНК и синтез кДНК	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 200–1000 мкл)	Выделение РНК и синтез кДНК, гибридизация чипов	1
Холодильник с морозильной камерой	Хранение образцов	1
Хладоэлемент	Выделение РНК и синтез кДНК, гибридизация чипов	1
Микроспектрофотометр	Контроль качества РНК	1
Счетная камера с сеткой Горяева	Подсчет клеток	1
Покровные стёкла 22×22 мм	Подсчет клеток и гибридизация	1 упаковка
Центрифуга на 1000 об./мин	Выделение мононуклеарных лейкоцитов периферической крови	1

Таблица 2. — Реагенты

Наименование реагента	Назначение реагента	Количество
Набор для синтеза флуоресцентно меченой кДНК, включающий: - компоненты реакционной	Синтез кДНК	1 набор на 30 исследований

смеси для реакции обратной транскрипции; - флуоресцентно меченые нуклеотиды с пиком свечения флуорохрома 555 нм; - колонки с фильтром для очистки кДНК в комплекте с промывочным раствором		
Реактив для фенольно-хлороформной экстракции РНК	Выделение РНК	1 флакон на 200 выделений
Градиент для выделения моноклеарных лейкоцитов с плотностью 1077–1078 г/л	Выделение моноклеарных лейкоцитов	1 флакон (500 мл)
Гибридизационный буфер для ДНК-биочипов	Гибридизация чипов	1 флакон на 75 гибридизаций
Набор отмывочных растворов А-С	Отмывка чипов	по 200 мл каждого
Физиологический раствор хлорида натрия	Отмывка клеток	1 л
Фосфатно-солевой буфер	Разведение крови	1 л

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Синдром алкогольной зависимости (F10.2), протекающий с осложненными состояниями отмены (F10.4, F10.5, F10.6, F10.7).
2. Употребление алкоголя с вредными последствиями (F10.1).
3. Синдром алкогольной зависимости при низкой эффективности психотерапевтических и социально-ориентированных реабилитационных программ.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Приготовление растворов

Растворы готовят согласно приведенным ниже прописям и хранят до использования при температуре +2–8°C не более 1 мес.

Отмывочный раствор А:

- 10 мл 20X SSC
- 4 мл 10% SDS
- 186 мл дистиллированной воды.

Отмывочный раствор В:

- 1 мл 20X SSC
- 4 мл 10% SDS
- 195 мл дистиллированной воды.

Отмывочный раствор С:

- 1 мл 20X SSC
- 199 мл дистиллированной воды.

Характеристики используемого ДНК-чипа

Чип должен соответствовать следующим характеристикам:

1. Должен содержать набор зондов к генам, указанным в таблице 1.

Таблица 3. — Перечень необходимых зондов для ДНК-чипа

Код (Униген)	Код (ГенБанк)	Символ	Название
Hs.4	NM_000668	ADH1B	Алкогольдегидрогеназа 1В класс, β-полипептид
Hs.12907	NM_000773	CYP2E1	ЦитохромР450, семейство 2Е, полипептид 1
Hs.494496	NM_000507	FBP1	Фруктозо-1,6-бифосфотаза 1
Hs.534770	NM_002654	PKM2	Пируваткиназа, мышечная
Hs.406515	NM_000903	NQO1	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат-дегидрогеназа
Hs.389700	NM_020300	MGST1	Микросомальная глутатион-трансфераза
Hs.534255	NM_004048	B2M	Бета-2-микроглобулин
Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Гипоксантин фосфорибозилтрансфераза 1
Hs.592355	NM_002046	GAPDH	Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа
Hs.466471	NM_000175	GPI	Глюкозофосфатизомераза
Hs.520640	NM_001101	ACTB	Бетаактин

2. Олигонуклеотиды для чипа должны быть иммобилизованы на слайде размером 1×25×76 мм и созданы на основе полно аннотированных нуклеотидных последовательностей, представленных в электронных базах данных: ГенБанк (GenBank), УниГен (UniGene), ГолденПат (GoldenPath), РефСек (RefSeq) и АйсВью (AceView).

3. Зонды должны содержать длинные олигонуклеотидные элементы (35–50).

4. Чип должен быть готовым к использованию (выполнено удаление излишков зондов после печати и блокировка слайда).

5. Каждый ген отпечатан в тройном экземпляре (три спота) для оптимальной статистической обработки.

6. Содержать штриховой код.

7. Предел учета — 1 мРНК на 100000.

8. Повторяемость результатов от чипа к чипу ±20%.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов периферической крови

Для исследования необходимо 4 мл гепаринизированной венозной крови, содержащей мононуклеарные лейкоциты с высокой жизнеспособностью.

Выделение мононуклеаров из периферической крови

1. 4 мл крови развести в 2 раза вФСБ.

2. На 3 мл градиента (1077 г/л) наслоить 4 мл разведенной крови.
3. Центрифугировать 20 мин при 1000 об./мин.
4. Собрать клетки в интерфазе, суспендировать в 10 мл физиологического раствора.
5. Центрифугировать 10 мин при 1000 об./мин.
6. Поместить клетки в 1000 мкл физиологического раствора.
7. Посчитать клетки в счетной камере с сеткой Горяева:

$$C [\text{cell/ml}] = 4 \times 10^6 \times (\text{количество клеток в одном малом квадрате}).$$

8. Отмерить 10 млн клеток, осадить их центрифугированием и убрать супернатант.
9. Клетки готовы для выделения РНК.

Выделение общей РНК

1. Взвесь мононуклеарных лейкоцитов смешивают с 1000 мкл реактива для фенольно-хлороформной экстракции РНК, инкубируют 10 мин при комнатной температуре.
2. Добавляют 200 мкл хлороформа и инкубируют 2 мин при комнатной температуре.
3. Центрифугируют при 12000 об./мин 15 мин при 4°C.
4. Фракцию РНК собирают и вносят в холодный изопропанол — 500 мкл.
5. Препитируют 20 мин на льду в холодильнике.
6. Центрифугируют при 12000g 8 мин при 4°C.
7. Осадок РНК промывают в 750 мкл 70% этанола и центрифугируют (12000 об./мин 8 мин).
8. Растворяют осадок РНК в 20 мкл дистиллированной безнуклеазной воды.

Получение флуоресцентно меченой кДНК

1. В микропробирке смешивают компоненты (таблица 4).

Таблица 4. — Набор реагентов для первой стадии получения флуоресцентно меченой кДНК

Компонент	Объем, мкл
5–20 мкг общей РНК	12
Политимидилированный праймер (dT)20	2
Гексомерные праймеры	1

2. Инкубируют пробирки при 70°C 10 мин, затем охлаждают на льду 1 мин и более.
3. Добавляют компоненты (таблица 5).
Далее перемешивают и откручивают на центрифуге.
4. Инкубируют пробирки при 46°C в темноте 2 ч.
5. Останавливают реакцию добавлением 15 мкл 0,1М NaOH.
6. Инкубируют микропробирку при 70°C 30 мин для гидролиза РНК.
7. Добавляют 15 мкл 0,1М HCL для нейтрализации pH и аккуратно перемешивают.

Таблица 5. — Набор реагентов для второй стадии получения меченой кДНК

Компонент	Объем, мкл
0,1 М Дитиотреитол	3
Флуоресцентно меченые нуклеотиды с пиком свечения флуорохрома 555 нм	3
Ингибитор РНКазы (40 МЕ/мкл)	1
Фермент обратная транскриптаза (400 МЕ/мкл)	2

Очищают меченую пробу кДНК по следующей схеме:

1. Добавляют 700 мкл отмывочного буфера.
2. Переносят смесь кДНК в колонки с фильтром.
3. Центрифугируют при 3.300g 1 мин.
4. Удаляют жидкость со дна «собирающей» пробирки.
5. Помещают колонку с фильтром в ту же «собирающую» пробирку, добавляют 600 мкл отмывочного буфера.
6. Центрифугируют на скорости 12000 об./мин 30 с.
7. Удаляют жидкость со дна «собирающей» пробирки, при этом необходимо следить за тем, чтобы между стенкой отмывающей пробирки и колонкой не было жидкости.
8. Помещают колонку с фильтром в ту же «собирающую» пробирку, центрифугируют на максимальной скорости 30 с, чтобы максимально убрать отмывочный буфер. Далее выбрасывают сборную пробирку.
9. Помещают колонку с фильтром в пробирку для сбора кДНК и добавляют 20 мкл H₂O в центр, оставляют на 1 мин.
10. Центрифугируют на максимальной скорости 1 мин. На дне образуется меченая кДНК. Ее замораживают при -20°C сроком до 1 недели перед гибридизацией.

Гибридизация и отмывка биочипов

1. Помещают гибридизационную кассету в твердофазный термостат с установленной температурой 65°C на 10 мин.
2. Извлекают из коробки биочип и помещают его на кассету.
3. 16 мкл гибридизационного буфера и 4 мкл пробы разливают в разные пробирки.
4. Прогревают до 65°C в твердотельном термостате.
5. Смешивают и центрифугируют 1 мин при 12000 об./мин (18000 g).
6. Наносят пробу на область биочипа, содержащую зонды.
7. Накрывают образец покровным стеклом.
8. Наносят по 10 мкл воды в лунки гибридизационной камеры.
9. Закрывают крышку гибридизационной камеры.
10. Помещают в термостат при 65° на 3 ч.
11. Достают кассету из термостата.
12. Отмывают биочип 5 мин в отмывочном буфере А 1X при 42°C.
13. Отмывают 5 мин в отмывочном буфере В 1X при 20°C.
14. Отмывают 1 мин в отмывочном буфере С 1X при комнатной температуре.

15. Высушивают на центрифуге для стекол.

Сканирование и интерпретация результатов

Появление сверхфоновой флуоресценции спотов, соответствующих генам микросомальной глутатион-трансферазы 1 (MGST1) и мышечной пируваткиназы (PKM2) в виде: MGST1 > PKM2 (рисунок), свидетельствует о формировании экспрессионных маркеров тяжелых форм алкогольной зависимости у носителей дефицитных аллелей генов GABRA2A и переносчика серотонина SLC6A4.

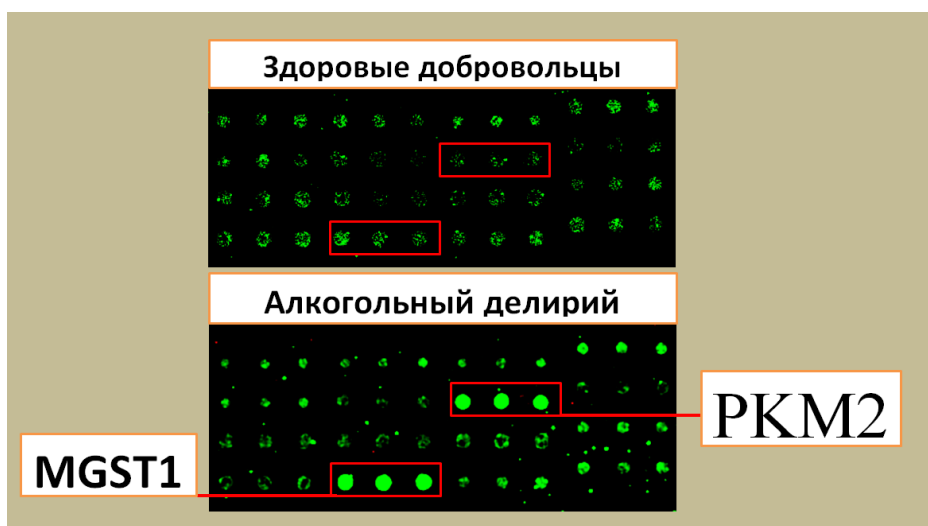


Рисунок — Появление сверхфоновой флуоресценции для спотов, соответствующих генам микросомальной глутатион-трансферазы (microsomal glutathione transferase 1 (MGST1) и мышечной пируваткиназы (muscle pyruvatekinase (PKM2))

Наличие стойких экспрессионных метаболических маркеров у индивидов-носителей дефицитных форм аллелей генов-переносчиков и рецепторов нейротрансмиттеров говорит о реализации наследственной предрасположенности, в последующем с установленным диагнозом алкогольной зависимости (F10.2), протекающих с осложненными состояниями отмены (F10.4, F10.5, F10.6, F10.7) и нуждающимися в необходимости постоянной медикаментозной терапии в период ремиссии.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

В таблице 6 представлены проблемы и методические ошибки, которые могут возникнуть при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения.

Таблица 6. — Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Низкая флуоресценция меченой кДНК	Низкое содержание исходной РНК	Использовать только свежие образцы для выделения РНК
	Деградация РНК	Использовать полученную РНК сразу после выделения
	Низкое качество обратной транскрипции	Использовать ингибитор РНКазы (40 МЕ/мкл). Хранить фермент обратную транскриптазу только в морозильной камере при -20°C
Высокая фоновая флуоресценция	Низкое качество отмывки чипов	Повторить процедуру отмывки
Высокая флуоресценция контрольных спотов	Низкое качество блокировки чипа	Повторить процедуру блокировки
Отсутствие совместимости сканируемого изображения и iGAL-файла	Ошибки в записи GAL-файла	Открыть файл в текстовом режиме и проверить единообразие аннотации