

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра



_____ Д.Л. Пиневич

_____ 2015 г.

Регистрационный номер № 167-1115

Метод оценки эффективности лечения алкогольной зависимости
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

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

АВТОРЫ: д.м.н. Копытов А.В., к.м.н. Максимчук В.П., Шпаковская О.Г.,
Линкевич-Николенко О.В.

Минск, 2015

Данная инструкция по применению «Метод оценки эффективности лечения алкогольной зависимости» (далее – инструкция) может быть использована в комплексе оказания медицинских услуг для диагностики и оценки эффективности лечения алкогольной зависимости.

Инструкция предназначена для врачей-психиатров-наркологов и других врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с алкогольной зависимостью при низкой эффективности психотерапевтических и социально-ориентированных реабилитационных программ.

Показания к применению

1. Синдром алкогольной зависимости (F10.2).
2. Употребление алкоголя с вредными последствиями (F10.1).

Противопоказания

Отсутствуют.

Перечень медицинских изделий, лекарственных средств, реактивов и т.д.

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

Таблица 1 - Оборудование для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Наименование оборудования	Необходимое к-во
Амплификатор	1
Миницентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 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 к-во
рН-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 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	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 (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	Кол-во 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.

Выделение ДНК

Материалом для выделения ДНК и выявления мутаций генов SLC6A4 (5HTTLPR), COMT(rs4680) являются высушенные пятна цельной венозной крови на фильтровальных носителях.

Для выделения тотальной ДНК из пятен крови используется принцип депротенинизации 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: 10mM EDTA, 10 mM трис-HCl, 50mM 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 часа при 56⁰С, после чего проводят депротеинизацию последовательно 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 LPA (линейного полиакриламида), который используется в качестве соосадителя (10-20 мкг на пробу). ДНК пробы высушиваются в термостате при 50⁰С и растворяются в стерильной деионизованной воде.

Полученные в результате образцы нативной высокоочищенной ДНК хранятся при -20⁰С.

Выделение ДНК целесообразно проводить с использованием готовых наборов.

Проведение полимеразной цепной реакции

Генотипирование по полиморфным аллелям исследованных локусов проводится с применением ПЦР-анализа. Для проведения генотипирования используются праймеры:

COMT(rs4680):

[F] - 5'-ТАСТГТGGCTACTCAGCTGTGC-3';

[R] – 5'-GTGAACGTGGTGTGAACACC-3'.

SLC6A4 (5HTTLPR):

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

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

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: 10mM EDTA, 10 mM трис-HCl, 50mM 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 часа при 56⁰С, после чего проводят депротеинизацию последовательно 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 LPA (линейного полиакриламида), который используется в качестве соосадителя (10-20 мкг на пробу). ДНК пробы высушиваются в термостате при 50⁰С и растворяются в стерильной деионизованной воде.

Полученные в результате образцы нативной высокоочищенной ДНК хранятся при -20⁰С и пригодны для ПЦР-анализа в течение многих лет.

Выделение ДНК целесообразно проводить с использованием готовых коммерческих наборов.

Условия для амплификации

COMT(rs4680). Амплификационная смесь объемом 15 мкл содержит 30 – 40 нг ДНК-матрицы, по 1 мкл каждого из праймеров (концентрация праймеров 10 пикомоль/мкл), 2,6 mM MgCl₂ , 0,25 mM dNTP, 1,5 мкл 10x буфера (750 ммоль/л Tris-HCl (pH 8.8), 200 ммоль/л (NH₄)₂SO₄, 0.1% Тритон X-100, 10 моль/л Тартразин, 5% Фикол 400), 0,5 мкл деионизированного формамида, 1,25 единицы taq-ДНК-полимеразы (Dialat) и 7,45 мкл стерильной деионизованной воды. Амплификация проводится при следующих условиях:

94° - 3 минуты.	} 35 циклов.
94° - 30 секунд.	
61° - 20 секунд.	
72° - 30 секунд.	
72° - 5 минут.	
4° - ∞	

SLC6A4 (5HTTLPR). Амплификационная смесь объемом 15 мкл должна содержать: 1,5 мкл 10x буфера (750 ммоль/л Tris-HCl (pH 8.8), 200 ммоль/л (NH₄)₂SO₄, 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 MgCl₂ (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 минут.	} 33 цикла
95° - 30 секунд.	
61° - 45 секунд.	
72° - 1 минута.	
72° - 10 минут.	
4° - ∞	

COMT(rs4680)

Эндонуклеазная рестрикция ампликонов. После амплификации продукт ПЦР величиной 237 пн подвергается расщеплению с помощью специфической эндонуклеазы NlaIII. К 10 мкл амплифицированных

образцов добавляли по 5 мкл премикса для рестрикции: 1,5 мкл буфера Tango/Tag, 0,3 мкл рестриктазы NlaIII и 3,2 мкл стерильной деионизованной воды на каждый образец. Далее пробирки помещают на 8 часов (на ночь) в термостат при температуре 37°C.

Электрофорез в акриламидном геле. Продукты рестрикции наносятся на 8% акриламидный гель. Разделение рестрикционных фрагментов величиной 144 п.н. («Н» или «Val» аллель) и 98 + 18 п.н. («L» или «Met» аллель) проводили в аппарате для вертикального гельэлектрофореза в 1xTBE буфере при напряжении 100В. Полученную электрофореграмму фиксировали с помощью системы геледокументирования. Гомозиготные генотипы «НН» и «LL» определяются по наличию на электрофореграмме фрагментов длиной 144 п.н. и 98+ 18 п.н. соответственно. Гетерозиготный генотип «НL» определяется на электрофореграмме присутствием всех фрагментов (рис. 1).

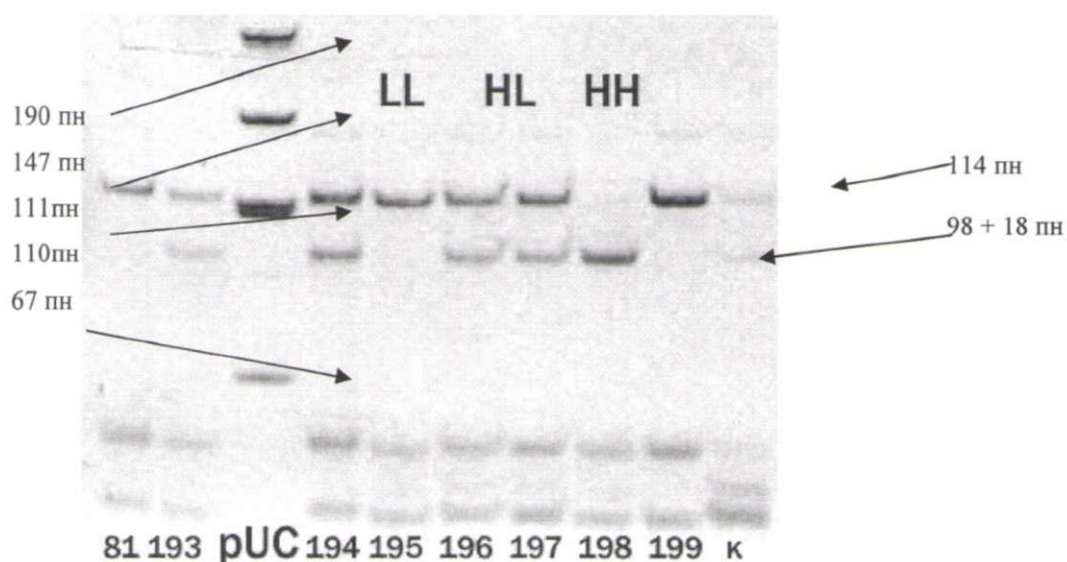


Рисунок 1 - Электрофореграмма продуктов амплификации
 Примечания: 81, 193 -199 – номера проб; pUC19 – ДНК/ MspI маркер; вверху – аллельное состояние гена COMT; справа – размеры амплифицированных фрагментов (114 п.н. для LL генотипа и 98 + 18 п.н.

для HH генотипа); слева – размеры фрагментов маркера длин ДНК
pUC19/MspI

SLC6A4 (5HTTLPR)

Проведение электрофоретического разделения продуктов амплификации. После амплификации продукты ПЦР величиной 484 п.н. (S аллель) и 528 п.н. (L аллель) наносятся на 2% агарозный гель, содержащий этидий бромид (0,0001%). Разделение фрагментов проводится в аппарате для горизонтального гель-электрофореза в 1xTAE 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	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

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 минут 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 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 минут, 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 480 п.н. Гетерозиготный генотип «SL» определяется присутствием обоих фрагментов (рис. 2).

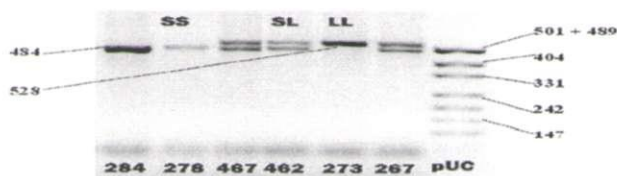


Рисунок 2 - Электрофореграмма продуктов амплификации

Примечания к рис. 1. : 284, 278, 467, 462, 273, 267 – номера проб; pUC – маркер длин ДНК pUC/MspI; вверху – 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

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

Клиническая значимость результатов

1. Назначение терапии лицам, страдающим алкогольной зависимостью, при наличии выраженного первичного патологического влечения к алкоголю.

Фенотипические признаки носительства «патологического» полиморфного варианта гена COMT(rs4680) представлены в таблице 6.

Таким образом, по совокупности фенотипических проявлений признаков, представленных в таблице 6, обрисовывается клинический портрет носителей различных аллелей и генотипов по гену COMT (rs4680).

Наличие генотипа «НН» не является детерминирующим фактором, однозначно приводящим к злокачественной форме заболевания, но все же его наличие необходимо, но недостаточно, для развития компульсивного и постоянного ППВА, так как в формировании АЗ играют роль генетические пороговые эффекты. Для реализации последних необходимо присутствие социальных и поведенческих факторов.

Таблица 6 - Фенотипические признаки, характерные для различных вариантов полиморфного локуса COMT (rs4680)

Фенотипические факторы	Генотипы		
	НН	НL	LL
Скорость формирования (лет)	3,34±0,5	2,92±0,2	2,72±0,4
Влечение к спиртному	Компульсивное, постоянное	не выражено, навязчивое	не выражено
Желание оказания помощи	сомнительное	да	нет
Способность противостоять алкогольному окружению	нет	да	да
Психические девиации	акцентуации личностных черт	невротичность, акцентуации личностных черт	акцентуации личностных черт, невротичность
Поведение	деликвентное	без особенностей	девиантное
Чувство подавленности	характерно	менее характерно	не характерно
Чувство тревоги	характерно	не характерно	не характерно
Гипервозбудимость в детстве	не характерна	менее характерна	характерна
Склонность испытывать скуку	свойственно	менее свойственно	менее свойственно
Плаксивость в детстве	менее свойственно	не свойственно	свойственно
Склонность к депрессии	свойственно	свойственно	не свойственно
Эффекты алкоголя	повышение	повышение	повышение

	уверенности	настроения, улучшение коммуникаций	уверенности
Тип темперамента	флегматик, холерик	меланхолик	сангвиник, холерик
Наследственная отягощенность по алкогольной зависимости (%)			
по линии отца	18,2	55,7	22,1
по линии матери	25,0	47,2	27,8
по двум линиям	9,5	61,9	28,6
Личностные характеристики	практичность напряженность консерватизм неартистичность	практичность расслабленность консерватизм артистичность	игривость напряженность любопытство артистичность

Применение патогенетической фармакотерапии с носительством однонуклеотидных полиморфизмов генов дофаминовой нейромедиаторной системы (генотипа НН гена COMT (rs4680) при назначении лекарственных средств, влияющих на обмен дофамина (кутипин, кветиапин) обеспечивает достоверно более длительные ремиссии по сравнению с другими группами лиц, где патогенетические механизмы не учитывались.

2. Назначение терапии лицам, страдающим быстропрогредиентной алкогольной зависимостью.

В результате интерпретации выявленного генотипа у конкретного пациента (индивидуума) делается 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 быстрому варианту формирования алкогольной зависимости. Развитие зависимости быстропрогредиентное, злокачественное.

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

Таблица 7 - Фенотипические признаки, характерные 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

Перечень возможных ошибок, ограничений и пути их устранения

Проведение метода ПЦР 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 рекомендуется соблюдать правила работы в молекулярно-генетической лаборатории.

Для выявления степени риска развития ППВА могут быть использованы молекулярно-генетические методы исследования наряду с клинико-генеалогическими, социально-психологическими. Учитывая, что при формировании ППВА, 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.

Назначение лекарственных средств должно проводиться по общепринятым схемам в поддерживающих дозах с учетом индивидуальных клинических особенностей субъектов.

Назначение лекарственных средств, влияющих на обмен дофамина (из группы нейролептиков) при отсутствии генетических полиморфизмов генов дофаминовой нейромедиаторной системы (аллеля *H* и генотипа *HH* гена *COMT* (rs4680)) приводило к субъективно значимому усилению первичного патологического влечения к алкоголю.