

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

кабета 20 15 г.

Регистрационный № 169-1115

МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,

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

Государственное научное учреждение «Институт цитологии и генетики НАН Беларуси»,

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии».

АВТОРЫ: д.м.н. Копытов А.В., д.м.н., проф., член-корреспондент НАН Беларуси, иностранный член РАН Титов Л.П., к.б.н. Голоенко И. М., Павлов К.И.

Минск, 2015

В настоящей инструкции по применению «Метод оценки риска развития алкогольной зависимости» (далее – инструкция) изложен метод оценки риска формирования алкогольной зависимости, основанный на выявлении аллельных форм гена-рецептора гамма-аминомасляной кислоты A2, связанных с появлением клинико-психологических синдромов гиперактивности и личностной тревожности, развивающихся и прогрессирующих в течение всей жизни пациента и приводящих к формированию неосложненных, малопрогрессирующих форм течения алкогольной зависимости и требующих медикаментозной поддержки в период ремиссии.

Инструкция предназначена для врачей-психиатров-наркологов и других врачей-специалистов, оказывающих помощь пациентам с синдромом алкогольной зависимости и при употреблении алкоголя с вредными последствиями.

Показания к применению

1. Синдром алкогольной зависимости (F10.2).
2. Синдром алкогольной зависимости (F10.2) при низкой эффективности психотерапевтических и социально-ориентированных реабилитационных программ.

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 количество
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
Хладозаэлемент	1

Таблица 2 - Оборудование для детекции результатов ПЦР путем электрофоретического разделения амплифицированных фрагментов

Наименование оборудования	Необходимое 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 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 dNTP25 mM	Мономер для синтеза ДНК	1,8 мкл

(дезокси-рибонуклеотидтрифосфатов)		
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 Эпендорф 1,5 мл (Eppendorf), ПЦР-пробирки (0,2 мл), штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда.

Выделение ДНК из лейкоцитов

Для выделения тотальной ДНК из пятен крови используется принцип депротенинизации с протеиназой К и фенол-хлороформной обработкой (метод широко применяется в криминалистике). Из присланных на анализ проб вырезали 1-2 пятна крови и помещают в микроцентрифужную пробирку, содержащую 500–600 мкл лизирующего буфера (состав буфера: 10mMEDTA, 10 mMтрис-HCl, 50mMNaCl, 2% SDS, pH 7,5]. Добавляют в каждую пробирку по 15 мкл раствора протеиназыК в концентрации 10 мг/мл (до конечной концентрации 0,3 мг/мл), инкубируют 3 часа при 56⁰С, после чего проводят депротенинизацию 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 используют в качестве соосадителя раствор линейного полиакриламида (10-20 мкг на пробу) – добавляют 50-70 мкл 0,25% раствора LPA. ДНК пробы высушивают в термостате при 50⁰С и растворяют в стерильной деионизованной воде.

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

Протоколы генотипирования

Генотипирование по полиморфным аллелям исследованных локусов проводится с применением ПЦР-анализа. Для проведения генотипирования полиморфного локуса rs279826 гена GABRA2A используются специфические праймеры следующего дизайна:

[F] – 5'-ACTTCAGTGTTTGGATTAGCCCT-3'

[R] – 5'-CCAGTTCCATAGAATCCAAGAGT-3'

Условия для амплификации. Полимеразная цепная реакция проводится на стандартном амплификаторе. Полиморфные участки генов

амплифицируются в 15 мкл реакционной среды, содержащей 10 – 20 нг геномной ДНК, по 10 пмоль каждого из праймеров, 1,5 мкл 10х буфера для амплификации (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), 1,0 мкл $MgCl_2$ (25 mM), 1,5 мкл смеси *dNTP* (2,5 mM), 1 единицу ДНК-полимеразы *Taq* (Dialat), 1 мкл DMSO. Амплификация проводилась при следующих условиях:

95° - 4 минут.	} 30 циклов
95° - 30 секунд.	
52° - 30 секунд.	
72° - 1 минута.	
72° - 2 минуты.	

Эндонуклеазная рестрикция ампликонов. После амплификации продукт ПЦР величиной 390 п.н. подвергается расщеплению с помощью специфической эндонуклеазы *MnlI*: к 10 мкл ампликона добавляют по 1,5 мкл буфера Грин (Green), 1,5 единицы (0,15 мкл) рестриктазы *MnlI* и 3,35 мкл стерильной деионизованной воды на каждый образец. Помещают на 8 часов в термостат при температуре 37°C.

Электрофорез в агарозном геле. Для приготовления агарозного геля следует смешать необходимые объемы 1х буфера 50х и дистиллированной воды 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 1х буфером. Продукты рестрикции наносят на 2.5% агарозный гель,

содержащий этидий бромид (0,0001%). Разделение фрагментов рестрикции величиной 276+115 п.н. (А аллель) и 133+143 п.н. (G аллель) проводят в аппарате для горизонтального гель-электрофореза в 1хТАЕ буфере при напряжении 100В. Полученную электрофореграмму фиксируют с помощью системы гель-документирования.

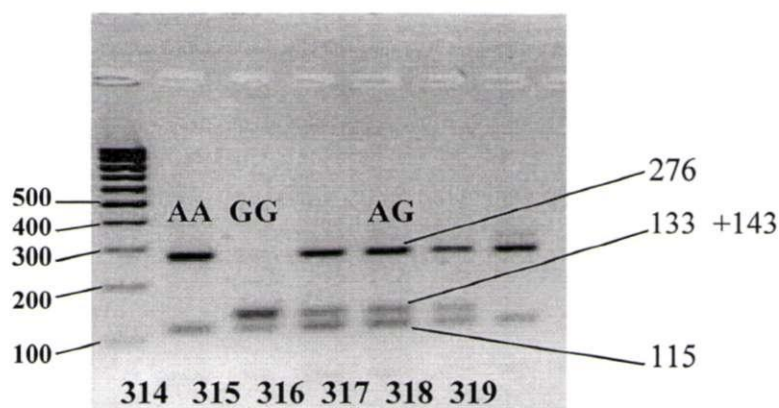


Рисунок 1 – Электрофореграмма. Примечания: 314, 315, 316, 317, 318, 319 – номера проб; вверху – аллельное состояние гена *MTHFR*; слева – размеры амплифицированных фрагментов (276 п.н. для *AA* генотипа; 133 + 143 п.н. и 115 п.н. для *GG* генотипа); справа – размеры фрагментов маркера длин ДНК 100bp.

Клиническая значимость результатов

По результатам генотипирования устанавливается генотип данного индивидуума (пациента) по полиморфному локусу rs279826 гена *GABRA2A*. Из 3-х вариантов генотипа (*AA*, *AG*, *GG*), носительство аллели G (генотипов *GG* и *AG*) вместе с клиникой личностной тревожности и гипервозбудимости является фактором риска развития алкогольной зависимости (таблица 5).

Таблица 5 – Клиническое значение генотипов по полиморфному локусу rs279826 гена *GABRA2A*

Генотип	Клиническое значение	Способ воздействия
AA	Низкий риск развития алкогольной зависимости	Не требуется
AG	Вместе с клиникой личностной тревожности и гипервозбудимости является фактором риска развития алкогольной зависимости	Желательно проводить фармакотерпию с применением лекарственных средств, влияющих на ГАМК-систему в сочетании с психотерапевтической коррекцией.
GG	При наличии эпизодов жестокого обращения в детстве является фактором высокого риска развития алкогольной зависимости	Психотерапия, направленная на формирование стрессоустойчивости и фармакотерпия с применением селективных антагонистов опиоидных рецепторов (селинкро, налмефен) и лекарственных средств, влияющих на ГАМК-систему (топиrol, топирамат)

Высокий уровень личностной депрессивности, оказывающей влияние на клинику АЗ, наблюдается при носительстве генотипа GG гена GABRA2A (rs 279826) воспитывающихся в условиях с безразличным отношением со стороны родителей.

Таблица 6 - Фенотипических признаков характерных для различных вариантов полиморфизмов rs279826 гена GABRA2A

Фенотипические факторы	Генотипы		
	AA	AG	GG
Скорость формирования (лет)	13,4±0,6	11,3±0,6	10,5±0,4
Влечение к спиртному	Отсутствует	Отсутствует	Периодически (через 2-3 месяца)

			навязчивое
Психоз	менее вероятен	менее вероятен	менее вероятен
Психические девиации	отсутствует	акцентуации	акцентуации
Психическое развитие	норма	задержки	задержки
Поведение	без особенностей	без особенностей	девиантное
Чувство подавленности	не свойственно	не свойственно	свойственно
Чувство тревоги	не свойственно	не свойственно	свойственно
Склонность к агрессии	свойственно	свойственно	На высоте аффекта
Суицид мысли	свойственно	не свойственно	свойственно
Аффективные реакции	не свойственно	свойственно	свойственно
Гиперактивность в детском возрасте	не свойственно	свойственно	свойственно
Гипервозбудимость	не свойственно	не свойственно	свойственно
Стрессоустойчивость	без особенностей	низкая	низкая
Склонность к асоциальным поступкам	не свойственна	сомнительна	свойственно
Алекситимия	не свойственна	тенденции	свойственно
Психосоматические расстройства	не свойственны	свойственны	свойственно
Личностные характеристики			
Теплота-равнодушие	теплота	равнодушие	равнодушие
Общительность-замкнутость	не выражены	замкнутость	замкнутость
Экстраверсия-интроверсия	не выражены	интраверсия	интроверсия

Наличие генотипов «AG» и «GG» является фактором риска формирования аддиктивного типа личности. При носительстве обоих генотипов для профилактики формирования алкогольной зависимости желательно проводить фармакотерапию с применением лекарственных средств, влияющих на ГАМК-систему в сочетании с психотерапевтической коррекцией.

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 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.