

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

28.11.2012

Регистрационный номер №124-0912

**МЕТОД КОМПЛЕКСНОЙ КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКИ ПЕРВИЧНОГО ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ВЛЕЧЕНИЯ К
АЛКОГОЛЮ У ЛИЦ МУЖСКОГО ПОЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ДАННЫХ О ГЕНЕТИЧЕСКОМ ПОЛИМОРФИЗМЕ ГЕНА ФЕРМЕНТА
КАТЕХОЛ-О-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ (COMT/RS4680/)**

инструкция по применению

Учреждения-разработчики:

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

ГУ «РНПЦ психического здоровья»

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Авторы:

Доц., канд. мед. наук Копытов А.В., проф., д-р мед. наук Скугаревский О.А.,
доц., канд. мед. наук Обьедков В.Г., канд. биол. наук Голоенко И. М.

Минск 2012

Настоящая инструкция по применению предназначена для врачей психиатров-наркологов, медицинских генетиков и др. специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с проблемами алкогольной зависимости.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Лица, страдающие алкогольной зависимостью в подростковом и молодом возрасте;
2. Преобладание компульсивного и постоянного первичного патологического влечения к алкоголю (ППВА);
3. Наличие в анамнезе:
 - Родственников, страдающих алкогольной зависимостью
 - низкой эффективности психотерапевтических и социально-ориентированных реабилитационных программ
 - консервативно-тревожного типа личности с консервативными установками
4. Генетический скрининг наследственной предрасположенности к алкогольной зависимости с первичным патологическим влечением к алкоголю;
5. Профилактическая, лечебно-реабилитационная практика врачей психиатров-наркологов;
6. В качестве заключительного этапа для окончательной экспертизы о предрасположенности к алкогольной зависимости после реализации психометрических методов, проведения клинического анализа и генеалогического метода.

Противопоказания отсутствуют.

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

Перечень необходимого оборудования, реактивов

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

Таблица 1

Оборудование для проведения 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 мутации гена *SOMT(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 ч при 56°С, 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 5M ацетата аммония и двойного объема 96% этанола, охлажденного до -20°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 50°С 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.

Проведение полимеразной цепной реакции.

Генотипирование по полиморфным аллелям исследованных локусов проводилось с применением ПЦР-анализа. Для генотипирования использованы праймеры: [F] - 5'-tactgtggctactcagctgtgc-3'; [R] – 5'-gtgaacgtggtggaacacc-3'.

Условия для амплификации. Амплификационная смесь объемом 15 мкл содержала 30 – 40 нг ДНК-матрицы, по 1 мкл каждого из праймеров (концентрация праймеров 10 пкмоль/мкл), 2,6 mM $MgCl_2$, 0,25 mM $dNTP$, 1,5 мкл 10x буфера (750 ммоль/л *Tris-HCl* (pH 8.8), 200 ммоль/л $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% Тритон X-100, 10 ммоль/л Тартразин, 5% Фикол 400), 0,5 мкл деионизированного формамида, 1,25 единицы *taq*-ДНК-полимеразы (Dialat) и 7,45 мкл стерильной деионизированной воды. Амплификация проводилась при следующих условиях:

94° - 3 мин	} 35 циклов.
94° - 30 с	
61° - 20 с	
72° - 30 с	
72° - 5 мин	
4° - ∞	

Эндонуклеазная рестрикция ампликонов. После амплификации продукт ПЦР величиной 237 п.н. подвергался 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* (*Fermentas*, Латвия) и 3,2 мкл стерильной деионизированной воды на каждый образец. Далее пробирки с помещали на 8 ч (на ночь) в термостат при температуре 37°C .

Электрофорез в акриламидном геле. Продукты рестрикции наносили 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 100 В. Полученную электрофореграмму фиксировали с помощью системы гель-документирования *Vilber Lourmat* (Франция). Гомозиготные генотипы «НН» и «LL» определяются по наличию на электрофореграмме фрагментов длиной 144 и 98+18 п.н. соответственно. Гетерозиготный генотип «НL» определяется на электрофореграмме присутствием всех фрагментов (рис. 1).

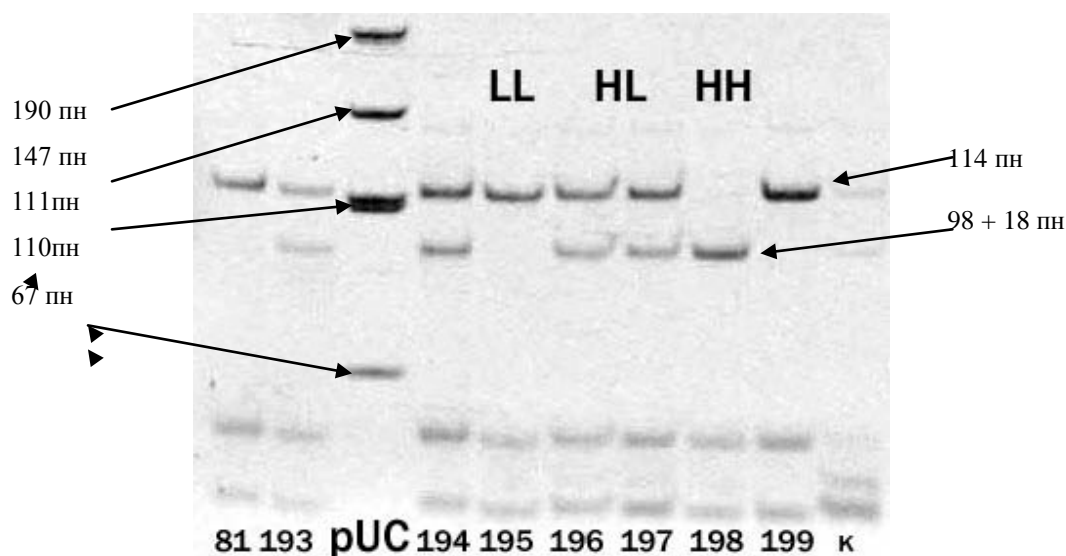


Рисунок 1. Электрофореграмма продуктов амплификации

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*

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 ППВА, больше субъектов имеют семейную отягощенность по зависимости от алкоголя. Анализ связи вариантов полиморфизмов гена COMT(rs4680) проводили с клиническими признаками алкогольной зависимости (ППВА). Среди вариантов ППВА выделяют навязчивый (психологический, когнитивный), компульсивный (биологический), постоянный. ППВА в группе подростков и молодых людей, страдающих АЗ, встречается реже, чем у взрослых с АЗ. При наличии ППВА в группе подростков и молодых людей преобладают навязчивое и компульсивное ППВА. Компульсивное ППВА в группе молодых людей напрямую связано со стажем АЗ, а его формирование более интенсивно происходит при наличии отягощенной наследственности по АЗ. ППВА связано с полиморфным локусом гена COMT (rs4680). Подростки и молодые люди мужского пола, имеющие генотип *HH* или аллель *H* гена COMT, подвержены высокому относительному риску наличия компульсивного и постоянного ППВА. В результате интерпретации выявленного генотипа у конкретного пациента (индивидуума) делается вывод о вероятности наличия и степени выраженности биологической врожденной предрасположенности к развитию первичного патологического влечения к алкоголю и неблагоприятный прогноз варианта развития болезни.

По результатам генотипирования устанавливается генотип данного индивидуума (пациента) по полиморфному локусу COMT (rs4680). Возможны 3 варианта генотипа: NN, NL, LL.

Аллель «N», генотип «NN». Достоверный фактор риска наличия первичного патологического компульсивного и постоянного влечения к алкоголю, обусловленного биологическими механизмами. Развитие алкогольной зависимости в этих случаях неблагоприятное.

Аллель «L», генотип «LL». Их носительство более характерно для варианта алкогольной зависимости с отсутствием первичного патологического влечения к алкоголю. Развитие алкогольной зависимости более доброкачественное.

Таблица 5

Таблица фенотипических признаков характерных для различных вариантов полиморфного локуса COMT (rs4680) у подростков и молодых людей мужского пола

Фенотипические факторы	Генотипы		
	NN	NL	LL
Скорость формирования (годы)	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 личносиних черт	невротичность, акцентуации личносиних черт	акцентуации личносиних 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	менее	не свойственно	свойственно

детстве	свойственно		
Склонность к депрессии	свойственно	свойственно	не свойственно
Эффекты алкоголя	повышение уверенности	повышение настроения, улучшение коммуникаций	повышение 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

Таким образом, по совокупности фенотипических проявлений признаков, представленных в таблице, можно обрисовать клинический "портрет" носителей различных аллелей и генотипов по гену COMT (rs4680) и предложить шкалу для интерпретации факта носительства маркера биологической предрасположенности.

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.

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

Перечень возможных ошибок, ограничений и пути их устранения

Метод ПЦР требует строгого соблюдения правил при организации и проведении всех этапов анализа ПЦР-лаборатории. При нарушении 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 как молекулярно-генетические, так и клинико-генеалогические, социально-психологические методы. Тот факт, 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 и психологических исследований.