

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневиц

« 27 » _____ 2014 г.

Регистрационный номер № 104-1014.

МЕТОД ОЦЕНКИ СОЦИАЛЬНЫХ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ У ПА-
ЦИЕНТОВ С ШИЗОФРЕНИЕЙ С УЧЕТОМ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И СРЕ-
ДОВЫХ ФАКТОРОВ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,

ГУ «РНПЦ психического здоровья»

АВТОРЫ:

Хоменко Н.В., доцент, к.м.н. Скугаревская М.М., доцент, д.м.н. Копытов

А.В., доцент, к.м.н. Обьедков В.Г., к.б.н. Голоенко И.М., профессор, д.м.н.

Скугаревский О.А.

Минск, 2014

Настоящая инструкция по применению (далее – инструкция) разработана с целью оценки нарушений социальных когнитивных функций у пациентов с шизофренией, в том числе на ранних этапах развития заболевания.

Данная инструкция предназначена для врачей психиатров-наркологов и других врачей-специалистов, сталкивающихся в своей работе с проблемами расстройств шизофренического спектра, в том числе при решении экспертных вопросов, что позволит улучшить качество терапевтических мероприятий при оказании психиатрической помощи.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

- психиатрическое освидетельствование;
- наличие в анамнезе родственников, страдающих шизофренией;
- психопатологическая оценка поведения, психических симптомов при шизофрении.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

- отказ пациента от проведения исследования.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ

1. Нейропсихологическая батарея тестов PennCNP для оценки эмоционального восприятия (работает в on-line режиме <https://penncnp.med.upenn.edu/>), модуль «Эмоции» (Emotions).
2. Перечень оборудования и реактивов для генотипирования по полиморфному локусу COMT (rs4680) представлен в таблицах 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 (дезоксирибонуклеотидтрифосфатов)	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 вода	Растворитель	4,2 мкл

ная свободная от нуклеаз вода		
-------------------------------	--	--

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.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Этап 1. На первом этапе происходит отбор лиц, страдающих шизофренией, а так же имеющих высокий риск развития расстройств шизофренического спектра на основании подробного сбора анамнестических сведений и патопсихологического обследования.

При сборе анамнеза важно выявление:

1. *генетического риска* развития психоза – наличие кровных родственников, страдающих расстройствами шизофренического спектра;

2. *клинического риска* развития психоза, который может быть обнаружен путем целенаправленного расспроса о наличии перцептивных симптомов и когнитивных нарушений – вмешивающихся мыслей, персевераций, наплывов и блокад мыслей, нарушений рецептивной и экспрессивной речи, нарушений способности различать фантазии и истинные воспоминания, нестабильных идей отношения, дереализации, зрительных и слуховых нарушений перцепции, неспособности разделять внимание, нарушений абстрактного мышления.

Выявление риска развития психоза, а так же сформированного расстройства шизофренического спектра является основанием для дальнейшего исследования.

Этап 2. предполагает выявление потенциально неблагоприятных средовых воздействий перинатального и детского периодов. Наиболее информативными вопросами для прогнозирования дефицита социальных когнитивных функций являются:

1. сведения о течении беременности и родов матери – прием медикаментов, их принадлежность к фармакологическим группам, перенесенные заболевания, в т.ч. инфекционные, течение родового периода, акушерская патология (маточные кровотечения, резус-конфликт, преэклампсия, гипоксия плода, перинатальные повреждения ЦНС, наложение акушерских щипцов, оперативное родоразрешение – кесарево сечение);

2. сведения о социально-психологическом функционировании родительской семьи – отсутствие эмоциональной поддержки матери во время беременности, переживаемые матерью стрессовые события, смены места жительства во время беременности и первые 5 лет после рождения ребенка, воспитание без отца.

Следует иметь в виду, что степень риска развития нейрокогнитивных нарушений увеличивается при выявлении вышеописанных средовых факторов.

Этап 3. Нейропсихологическое исследование особенностей эмоционального восприятия с применением нейропсихологической батареи тестов PennCNP, модуль «Эмоции», тест «Распознавание основных эмоций» (Penn Emotion Recognition Task). При выполнении данного теста последовательно предъявляются 40 фотографий (20 мужских и 20 женских), после чего необходимо определить эмоцию, которую переживает человек из 5 предложенных вариантов (счастье, грусть, злость, страх, без эмоций). Кроме того, данный тест позволяет оценить и допущенные в результате выполнения ошибки (т.е. неправильную интерпретацию эмоциональных сигналов). Оценка результатов происходит по категориям: точность (количество правильных и неправильных ответов), скорость (медианное время для правильных ответов).

Этап 4. Выявление особенностей генетического полиморфизма гена фермента катехол-о-метилтрансферазы (COMT/RS4680).

1. Выделение ДНК.

Материалом для выделения ДНК и выявления мутации гена 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 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 -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.

2. Проведение полимеразной цепной реакции.

Генотипирование по полиморфным аллелям исследованных локусов проводится с применением ПЦР-анализа. Для проведения генотипирования используются праймеры: [F] - 5'-tactgtggctactcagctgtgc-3'; [R] - 5'-gtgaacgtgggtgaacacc-3'.

Условия для амплификации. Амплификационная смесь объемом 15 мкл должна содержать 30 – 40 нг ДНК-матрицы, по 1 мкл каждого из праймеров (концентрация праймеров 10 пикомоль/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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 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. Амплификацию целесообразно проводить при следующих условиях:

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

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

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

Электрофорез в акриламидном геле. Продукты рестрикции нанести на 8% акриламидный гель. Разделение рестрикционных фрагментов величиной 144 п.н. («Н» или «Val» аллель) и 98 + 18 п.н. («L» или «Met» аллель) проводить в аппарате для вертикального гельэлектрофореза в 1хТВЕ буфере при напряжении 100В. Полученную электрофореграмму фиксировать с помощью системы гель-документирования *Vilber Lourmat* (Франция), рис. 1.

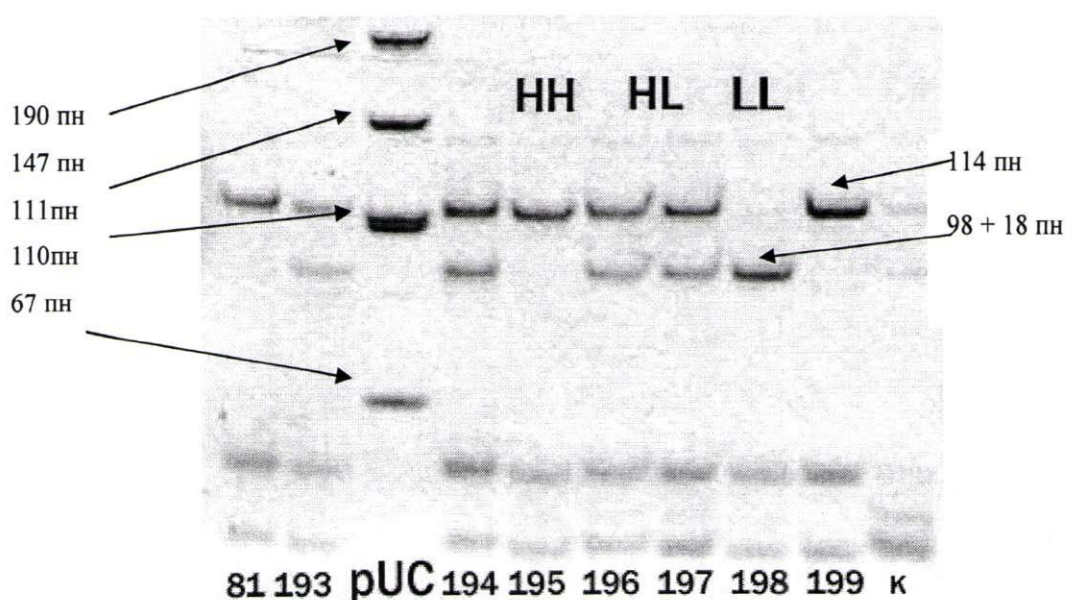


Рисунок 1. - Электрофореграмма продуктов амплификации

Примечания: 81, 193 -199 – номера проб; pUC19 – ДНК/ MspI маркер; вверху – аллельное состояние гена COMT; справа – размеры амплифицированных фрагментов (114 п.н. для HH генотипа и 98 + 18 п.н. для LL генотипа); слева – размеры фрагментов маркера длин ДНК pUC19/MspI.

Гомозиготные генотипы «HH» и «LL» определяются по наличию на электрофореграмме фрагментов длиной 144 п.н. и 98+ 18 п.н. соответствен-

но. Гетерозиготный генотип «NL» определяется на электрофореграмме присутствием всех фрагментов.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наследственная отягощенность по шизофрении является весомым и клинически подтвержденным предиктором нейрокогнитивного дефицита при шизофрении. Неблагоприятные средовые воздействия перинатального и детского периодов, а так же социально-психологическое неблагополучие родительской семьи увеличивают риск нарушенного нейрокогнитивного функционирования.

Особенностями восприятия эмоций при шизофрении являются: снижение точности определения эмоций по выражению лица, при этом большинство неправильных ответов отмечается при определении грусти и злости; склонность к неправильной атрибуции отсутствия эмоций и грусти при совершении ошибок.

По результатам генотипирования устанавливается генотип данного индивидуума (пациента) по полиморфному локусу **COMT** (rs4680). Возможны 3 варианта генотипа: *val/val*, *val/met*, *met/met*. При этом носительство аллеля *met* (генотипы *val/met* и *met/met*) является предиктором эффективного социального нейрокогнитивного процессинга.

Уравнение регрессии для модели раннего выявления дефицита социальных когнитивных функций:

$$P = 22,45 + 5,74x - 5,74y - 7z,$$

где x – носительство аллеля «*met*» гена **COMT**, y – преэклампсия матери во время беременности, z – смены места жительства в возрасте до пяти лет. Наличие признака кодируется числом 1, отсутствие – 0. Меньшему значению P соответствуют более выраженные нарушения социальных когни-

тивных функций, и наоборот, большему значению Р – отсутствие дефицита в сфере социальных нейрокогний.

РЕКОМЕНДАЦИИ

Подробный сбор анамнеза и выявление особенностей полиморфизма гена СОМТ позволяют раскрыть генно – средовые взаимодействия, лежащие в основе социального когнитивного дефицита при шизофрении. Результаты выполнения метода являются основой для понимания психопатологической картины и паттернов поведения пациентов, а так же способствуют индивидуализации терапевтических и реабилитационных программ.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК, ОГРАНИЧЕНИЙ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проведение представленного метода раннего дефицита у пациентов с шизофренией требует подробного сбора анамнестических сведений. Эти данные следует объективизировать информацией из других источников (родители, родственники). На нейрокогнитивное функционирование могут также оказывать влияние дополнительные социальные и биологические факторы.

Пациенты на продромальном этапе, как правило, не предъявляют активно жалоб на психическое здоровье, поэтому необходим целенаправленный расспрос.

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.