

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц



Минск 20 *15* г.

Регистрационный № *40-1115*

**КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ТЯЖЕЛЫХ
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.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

Данная инструкция по применению «Комплексный метод диагностики тяжелых осложняющихся форм алкогольной зависимости» (далее – инструкция) может быть использована в комплексе оказания медицинских услуг для диагностики синдрома алкогольной зависимости. В настоящей инструкции по применению 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.

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

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 экспрессионного анализа методом ДНК-биочипов

Наименование оборудования	Назначение оборудования	Количество
Сканербиочипов 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 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 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 стекла 22×22 мм	Подсчет клеток и гибридизация	1 упаковка
Центрифуга на 1000 об/мин	Выделение мононуклеарных лейкоцитов периферической крови	1

Таблица 2 - Реактивы для исследования методом ДНК-биочипов

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

смеси для реакции обратной транскрипции; 2. флуоресцентно меченые нуклеотиды с пиком свечения флуорохрома 555 нм; 3. 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 мононуклеарных лейкоцитов с плотностью 1077-1078 г/л	Выделение мононуклеарных 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

Приготовление растворов

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

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 3.

Таблица 3 – Перечень необходимых зондов для ДНК-чипа

Код (Униген)	Код (ГенБанк)	Символ	Название
Hs.4	NM_000668	ADH1B	Алкогольдегидрогеназа 1В класс, бета 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	Микросомальнаяглутатион-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 полноаннотированных нуклеотидных последовательностей, представленных в электронных базах данных: ГенБанк (GenBank), УниГен (UniGene), ГолденПат (GoldenPath), РефСек (RefSeq) и АйсВьюв (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 100 000.

8. Повторяемость результатов от чипа к чипу $\pm 20\%$.

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 минут при 1000 об\мин.

4. Собрать клетки в интерфазе, суспендировать в 10 мл физиологического р-ра.

5. Центрифугировать 10 минут при 1000 об/мин.

6. Поместить клетки в 1000 мкл физиологического раствора.

7. Посчитать клетки в счетной камере с сеткой Горяева:

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

8. Отмерить 10млн клеток, осадить их центрифугированием и убрать супернатант.

9. Клетки готовы для выделения РНК.

Выделение общей РНК

1. Взвесь мононуклеарных лейкоцитов смешать с 1000 мкл реактива для фенольно-хлороформной экстракции РНК инкубировали 10 минут при комнатной температуре.
2. Добавить 200 мкл хлороформа и инкубировать 2 минуты при комнатной температуре.
3. Центрифугировать 12000 об/мин 15 минут при 4 °С.
4. Фракцию РНК собирают и вносят в холодный изопропанол 500 мкл.
5. Препитировать 20 мин на льду холодильнике.
6. Центрифугировать при 12000g 8 минут при 4 °С.
7. Осадок РНК промывают 750 мкл 70 % этанола и центрифугируют (12000 об/мин 8 минут).
8. Растворяют осадок РНК в 20 мкл дистиллированной безнуклеазной воды.

Получение флуоресцентно меченой кДНК

1. В микропробирке смешать компоненты (таблица 4).

Таблица 4 – Набор реагентов для первой стадии получения флуоресцентно-меченой кДНК

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

2. Инкубировать пробирки при 70°C – 10 мин, затем охладить на льду– 1 мин и более.

3. Добавить компоненты (таблица 5).

Таблица 5 – Набор реагентов для второй стадии получения меченой кДНК

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

Далее перемешать и открутить на центрифуге.

4. Инкубация пробирок на 46°C в темноте 2 часа.

5. Остановить реакцию добавлением 15 мкл 0,1М NaOH.

6. Инкубировать микропробирку при 70°C – 30 мин для гидролиза РНК.

7. Добавить 15 мкл 0,1М HCL для нейтрализации и аккуратно перемешиваем.

Очистить меченую пробу кДНК по следующей схеме:

1. Добавить 700 мкл отмывочного буфера.

2. Перенести смесь кДНК- в колонки с фильтром.

3. Центрифугировать 3.300g -1 мин.

4. Удалить жидкость со дна «собирающей» пробирки.

5. Поместить колонку с фильтром в ту же «собирающую» пробирку, добавляем 600 мкл отмывочного буфера.

6. Центрифугировать на скорости 12 000 об/мин 30 сек.

7. Удалить жидкость со дна «собирающей» пробирки, при этом, нужно следить за тем, чтобы между стенкой отмывающей пробирки и колонки не было жидкости.

8. Поместить колонку с фильтром в ту же собирающую пробирку, центрифугировать на максимальной скорости 30 сек, чтоб максимально убрать отмывочный буфер. Далее выбросить сборную пробирку.

9. Поместить колонку с фильтром в пробирку для сбора кДНК и добавляем 20 мкл H_2O в центр и оставляем на 1 минуту.

10. Центрифугировать на максимальной скорости 1 мин. На дне – меченая кДНК. Замораживаем ее на $-20^{\circ}C$ до недели перед гибридизацией.

Гибридизация и отмывка биочипов

1. Поместить гибридизационную кассету в твердофазный термостат с установленной температурой $65^{\circ}C$ 10 минут.

2. Извлечь из коробки биочип и поместить его на кассету.

3. Поместить 16 мкл гибридизационного буфера и 4 мкл пробы в разные пробирки.

4. Прогреть до $65^{\circ}C$ в твердотельном термостате.

5. Смешать и центрифугировать минуту при 12 000 об/мин (18 000 g).

6. Нанести пробу на область биочипа, содержащую зонды.

7. Накрыть образец покровным стеклом.

8. Нанести по 10 мкл воды в лунки гибридизационной камеры.

9. Закрыть крышку гибридизационной камеры.

10. Поместить в термостат при 65 градусах на 3 часа.

11. Достать кассету из термостата.

12. Отмыть биочип 5 минут в отмывочном буфере А 1X при $42^{\circ}C$.

13. Отмыть 5 минут в отмывочном буфере В 1X при $20^{\circ}C$.

14. Отмыть 1 минуту в отмывочном буфере С 1Х при комнатной.
15. Высушить на центрифуге для стекол.

Сканирование и интерпретация результатов

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

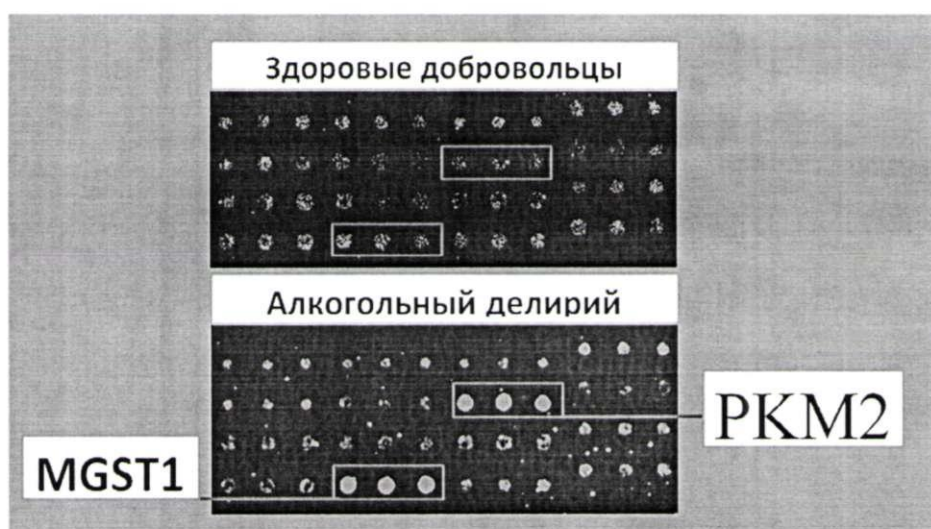


Рисунок 1 – Появление сверхфоновой флюоресценции для спотов, соответствующих генам микросомальной глутатион-трансферазы (microsomalglutathionetransferase 1 (MGST1) и мышечной пируваткиназы (musclepyruvatekinase (PKM2)

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 ошибок, ограничений 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 флюоресценция 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 °С
Высокая фоновая флюоресценция	Низкое качество отмывки чипов	Повторить процедуру отмывки
Высокая флюоресценция контрольных спотов	Низкое качество блокировки чипа	Повторить процедуру блокировки
Отсутствие совместимости сканируемого изображения и иGAL-файла	Ошибки в записи GAL-файла	Открыть файл в текстовом режиме и проверить единообразие аннотации