

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Б.Н.Андросюк

05.11. 2021 г.

Регистрационный № 057 – 0621

**МЕТОД ОЦЕНКИ ВЕРОЯТНОСТИ ПРЕДНАМЕРЕННОГО
САМОПОВРЕЖДЕНИЯ**

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: к.м.н. Давидовский С.В., д.м.н., профессор Скугаревская М.М.,
к.б.н. Ибрагимова Ж.А., Марчук С.И., Гончарик А.В., к.х.н. Бабенко А.С.,
к.м.н. Ходжаев А.В.

Минск, 2021

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод оценки вероятности преднамеренного самоповреждения на основе выявления полиморфизма rs6295 (G/C) гена HTR1A и (или) полиморфизма rs25531 (T/C) гена 5HTT(SLC6A4) у лиц, у которых выявлены психосоциальные факторы риска суицидального поведения. Данный метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику совершения истинного суицидального действия.

Инструкция предназначена для врачей-психиатров, врачей-психотерапевтов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь в стационарах и (или) амбулаторных условиях, и (или) в условиях отделения дневного пребывания.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Преднамеренное самоповреждение (код по МКБ-10 – X60-X84).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

Нет.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И ДР.

Проведение исследований с помощью метода, изложенного в инструкции, требует наличия стандартного оборудования и расходных материалов для ПЦР. Для работы необходимы:

1. Пробирки для забора крови с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) емкостью 1-2 мл (вакутайнеры с ЭДТА).
2. Высокоскоростная центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» 1,5 мл со скоростью вращения ротора 8–13000 об./мин.
3. Микроцентрифуга-вортекс со скоростью вращения ротора 1,5–3000 об./мин.
4. Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» 1,5 мл,

поддерживающий температуру до +99°C.

5. Программируемый термоциклер с оптическим блоком (амплификатор) для проведения ПЦР в режиме реального времени.
6. Холодильник на 2–8 °С с морозильной камерой (-20°C).
7. ПЦР-бокс с ультрафиолетовой лампой.
8. 2 набора дозаторов переменного объема: для выделения ДНК (объем дозаторов 5 – 50 мкл, 20 – 200 мкл, 200 мкл – 1000 мкл) и приготовления реакционной смеси для ПЦР (объем дозаторов 0,5 – 10 мкл, 5 – 50 мкл, 20 – 200 мкл).
9. Штативы для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 -2,0 мл.
10. Штативы для ПЦР-пробирок 0,2 мл
11. Штативы для наконечников 10 мкл, 200 мкл и 1000 мкл.
12. Пробирки микроцентрифужные типа «Эппендорф» объемом 1,5 -2,0.
13. ПЦР-пробирки 0,2 мл (в стрипах по 8 шт. или отдельные) с оптическими крышками.
14. Одноразовые наконечники с фильтрами 10 мкл, до 200 мкл и 1000 мкл.
15. Емкость для сброса использованных наконечников.
16. Одноразовые перчатки без талька.
17. Набор для выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из цельной крови человека.
18. Праймеры (синтетические олигонуклеотиды) и зонды (модифицированные синтетические олигонуклеотиды, несущие на 5' и 3'концах флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции FAM-BHQ1, HEX-BHQ1, ROX-BHQ2, должны быть синтезированы в организациях, лицензированных для их производства, в соответствии с приведенным составом в таблице 1; должны храниться при низкой температуре (-20°C).

Таблица 1 – Последовательность праймеров и зондов и их положение

Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Метка, 5'	Метка, 3'
6295_F	GAATGGGAAGGTGAACAGT		
6295_R	CGAGAACGGAGGTAGCTT		
6295_W	CGAGTGTGT[LNA-C]TTCGTTTTTAAA	FAM	BHQ1
6295_M	CGAGTG TGT[LNA-C]TTCCTTTTTAAA	ROX	BHQ2
25531_F	GGAGATCCTGGGAGAGGTG		
25531_R	CTCCTGCATCCCCATTAT		
25531_t	GCAGGGGGGATGCTGGG	FAM	BHQ1
25531_c	GCAGGGGGGATGCCGG	HEX	BHQ1

19. Вода для молекулярно-биологических исследований (дистиллированная вода по ГОСТ 6709-72 с последующей обработкой диэтилпиокарбонатом).

20. Термостабильный фермент ДНК-полимераза с концентрацией 5 ед/мкл (должна обладать 5'-3' экзонуклеазной активностью).

21. Буферный раствор (концентрат 10x) для ДНК-полимеразы.

22. 50 мМ раствор хлорида магния (MgCl₂) для ПЦР.

23. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) для ПЦР, концентрат 50x (10мМ каждый – дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ).

Качество используемых реагентов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения молекулярно-генетических исследований.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ МЕТОДА

Все этапы работы (выделение ДНК из образцов биологического материала и проведение ПЦР) проводятся в отдельных помещениях согласно правилам организации ПЦР-лаборатории (инструкция по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13 ноября 2008 г. № 090-1008 «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)»).

Для оценки вероятности преднамеренного самоповреждения проводится молекулярно-генетическое исследование образцов ДНК. Предложенный метод предусматривает последовательное выполнение следующих этапов.

1 этап. Выделение геномной ДНК из цельной крови пациентов.

2 этап. Генотипирование целевых полиморфных сайтов с помощью ПЦР в режиме реального времени.

3 этап. Анализ результатов.

Этап 1. Выделение геномной ДНК из цельной крови пациентов.

Выделение геномной ДНК из цельной крови пациентов осуществляется согласно методике производителя наборов для выделения ДНК, из цельной крови. Полученные пробы ДНК можно хранить при температуре от +2 до +8°C не более 1 недели или при температуре -20°C не более 6 мес. (или срок, который указан производителем набора) в аликвотах, избегая многократного размораживания.

При выделении ДНК из образцов биологического материала необходимо соблюдать меры безопасности как при работе с потенциально инфицированным материалом.

Этап 2. Постановка ПЦР в режиме реального времени для генотипирования целевых полиморфных сайтов.

Каждый образец ДНК пациентов анализируется методом аллельной дискриминации однонуклеотидных замен с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real Time ПЦР). Перечень исследуемых генов и название полиморфизмов приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Исследуемые гены и полиморфные сайты (полиморфизмы)

№ п/п	Название гена	Полиморфный сайт
1	HTR1A	rs 6295 (G/C)
2	5HTT(SLC6A4)	rs25531 (T/C)

Постановка Real Time ПЦР начинается с подготовки рабочей амплификационной смеси.

За 20–30 мин. до приготовления реакционной ПЦР-смеси нужно извлечь все реагенты и исследуемые образцы ДНК, кроме Taq ДНК-полимеразы, из морозильника, разморозить их содержимое при комнатной температуре, перемешать на вортексе и осадить капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием.

Рекомендуется готовить общую рабочую смесь (для определения каждого полиморфного сайта), содержащую все компоненты, за исключением образцов исследуемой ДНК. В отдельной пробирке вместимостью 0,5-1,5 мл (на льду) приготовить рабочую смесь для амплификации из расчета на (N+1) пробы и одного отрицательного контроля (таблица 3). При приготовлении рабочей амплификационной смеси каждый компонент добавляется отдельным наконечником с аэрозольным барьером (фильтром).

Таблица 3 – Компоненты реакционной смеси для Real Time ПЦР.

Компоненты	Объем для 1 пробы (мкл)	Объем для (N+1) проб (мкл)
Вода для ПЦР	15,8	15,8 x (N+1)
MgCl ₂ (50 мМ)	1	x (N+1)
Смесь дНТФ (10 мМ каждый)	0,25	0,25 x (N+1)
Смесь праймеров и зондов (25 пМ/мкл каждого)	0,2	0,2 x (N+1)
Буфер ПЦР (10X)	2,5	2,5 x (N+1)
ДНК-полимераза (5 ед./мкл)	0,25	0,25 x (N+1)
Объем смеси на 1 пробирку	20	20 x (N+1)
Исследуемая ДНК	5	

Рабочие смеси следует готовить непосредственно перед амплификацией. Готовая смесь после перемешивания разливается по ПЦР-пробиркам, а затем в каждую пробирку добавляется соответствующий образец ДНК или отрицательный контроль отдельными наконечниками с аэрозольным барьером (фильтром).

После внесения образца пробирки плотно закрываются крышками и сразу помещаются в реакционный модуль программируемого термостата (амплификатора) для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (таблица 4).

Таблица 4 – Программа амплификации.

Этап	Температура	Продолжительность	Кол-во циклов	Регистрация
Денатурация первичная	95	3 мин		
Денатурация	95	10 сек	40	
Отжиг и элонгация	60	59 сек		FAM/ ROX/HEX+

После завершения всех циклов амплификации необходимо перейти к анализу результатов оптических измерений, используя тип анализа «аллельная дискриминация» (Bio Rad CFX Connect, CFX 96, CFX 96touch).

Интерпретация оптических данных флуоресценции производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора. Заключение о генотипе индивидуума осуществляется исходя из анализа полученных данных.

Результаты программного обсчета данных (сравнительные данные флуоресценции из таблицы 5) соотносятся с их графическим изображением, иллюстрирующим варианты распределения облаков генотипов (рисунок 1).

Для описания полученных данных использованы следующие обозначения:

Аллель 1 (соответствует флуоресцентному красителю Fam/Rox) обозначает мажорную аллель (дикого типа) в гомозиготном состоянии (гомозиготный организм по данному полиморфизму).

Аллель 2 (соответствует флуоресцентному красителю Hex) обозначает аллель мутантного типа в гомозиготном состоянии (гомозиготный организм по данному полиморфизму).

Гетерозигота указывает на гетерозиготный генотип по данному полиморфизму (одна аллель дикого типа, другая – мутантного).

Таблица 5 – Образец регистрации молекулярно-генетического исследования генотипов гена 5HTR2A, rs6313 (G/A), полученные при проведении Real Time ПЦР.

Allelic Discrimination Data

Well	Sample	Call	Type	RFU1	RFU2
A01		Heterozygote	Auto	443	295
A02		Heterozygote	Auto	474	309
A03		Allele 2	Auto	372	447
A04		Allele 1	Auto	687	159
A05		Heterozygote	Auto	567	308
A06		Heterozygote	Auto	545	312
B01		Allele 1	Auto	557	60.0
B02		Allele 1	Auto	654	173
B03		Allele 2	Auto	343	426
B04		Allele 1	Auto	633	149
B05		Allele 1	Auto	656	156
B06		Allele 1	Auto	713	155
C01		Allele 2	Auto	320	405
C02		Heterozygote	Auto	481	303
C03		Allele 1	Auto	568	54.5
C04		Allele 2	Auto	285	378
C05		Heterozygote	Auto	444	269
C06		Allele 1	Auto	651	155
D01		Allele 1	Auto	556	55.8
D02		Heterozygote	Auto	490	282
D03		Allele 1	Auto	616	61.9
D04		Heterozygote	Auto	429	268
D05		Heterozygote	Auto	479	285
D06		Heterozygote	Auto	490	275
E01		Allele 1	Auto	592	46.2
E02		Allele 1	Auto	575	61.2
E03		Heterozygote	Auto	463	298
E04		Heterozygote	Auto	435	267
E05		Allele 2	Auto	311	387
E06		Allele 1	Auto	601	143

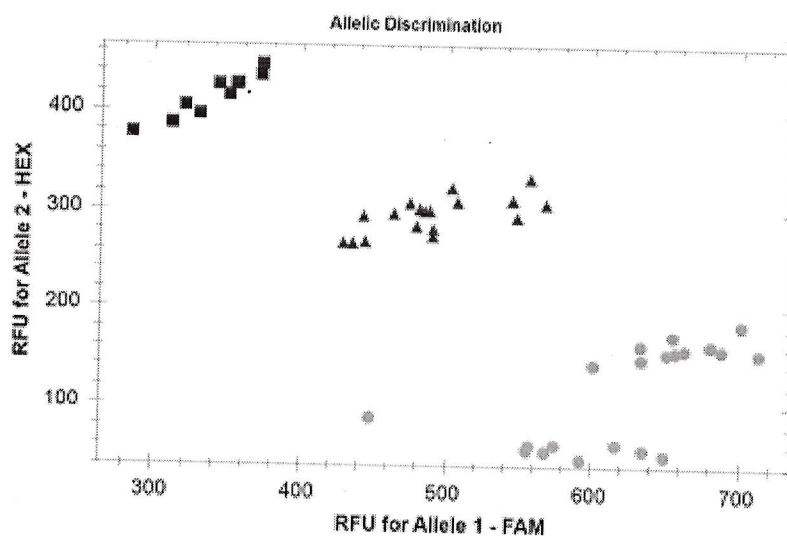


Рисунок 1 – Образец графической регистрации молекулярно-генетического исследования генотипов гена 5HTR2A, rs6313 (G/A).

Этап 3. Анализ результатов.

Определение вероятности совершения преднамеренного самоповреждения осуществляется согласно оценке результатов определения полиморфизма генов.

О вероятности совершения преднамеренного самоповреждения будут свидетельствовать:

- наличие полиморфизма rs 6295 (G/C) гена HTR1A (генотип (G/G));
- наличие полиморфизма rs25531 (T/C) гена 5HTT(SLC6A4) (генотип (T/C)).

Оценка результатов.

У лиц, у которых выявлены психосоциальные факторы вероятности преднамеренного самоповреждения (наличие самоповреждений или психических расстройств в анамнезе, воспитание в неполной семье, эмоционально-лабильные расстройства личности), носительство варианта генотипа (G/G) гена HTR1A (полиморфизм rs 6295 (G/C)) и/или носительство варианта генотипа (T/C) гена 5HTT(SLC6A4) (полиморфизм rs25531 (T/C)) сопряжено с вероятностью развития суицидальной реакции в ситуации переживаемого психосоциального стресса.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При соблюдении правил технологического процесса при постановке методик ошибки при использовании метода отсутствуют.