

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть

23 мая 2008 г.

Регистрационный № 100-1006

**БИОХИМИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ КОНОВАЛОВА–ВИЛЬСОНА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-
практический центр «Мать и дитя»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. К.У. Вильчук, канд. биол. наук Н.Б. Гусина,
канд. биол. наук, С.В. Дубовик, Е.С. Будейко

Минск 2008

Болезнь Коновалова–Вильсона (БКВ) — наследственный дефект транспорта меди, приводящий к аккумуляции токсичного иона и повреждению паренхимы внутренних органов и нейронов головного мозга. Широчайший клинический полиморфизм БКВ предопределяет необходимость наличия четких лабораторных критериев, отражающих основной метаболический дефект и патогенез заболевания. Диагностика БКВ и терапия без учета этих критериев абсолютно неприемлемы. Адекватность медь-элиминирующей терапии должна поддерживаться постоянным лабораторным мониторингом 24-часовой экскреции меди с мочой. В то же время методы биохимической диагностики и лабораторного мониторинга БКВ доступны далеко не каждой клинико-диагностической лаборатории.

Наличие патогенетического лечения делает особенно важной возможность адекватной и как можно более ранней диагностики БКВ. Наши исследования спектра мутаций АТР7В у белорусских пациентов с БКВ показали, что мутация Н1069G встречается в 63% мутантных аллелей. У большинства пациентов с преимущественным поражением печени выявлены гомозиготное или компаундное гетерозиготное носительство данной мутации. Все пациенты, умершие от фульминантного вильсоновского гепатита, оказались гомозиготными носителями Н1069G.

Молекулярно-генетические исследования при БКВ в настоящее время реальны для жителей Беларуси и существенно расширяют возможности лабораторной диагностики заболевания. Для семей пациентов с известным генотипом впервые появилась возможность установления носительства среди родственников и пренатальной диагностики. Включение современных биохимических и молекулярно-генетических технологий в существующие программы обследования пациентов при подозрении БКВ будет способствовать решению многих проблем диагностики, прогнозирования эффективности лечения и исхода заболевания.

Метод направлен на раннее выявление БКВ с целью дифференциальной диагностики, лечения и лабораторного мониторинга заболевания.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-генетиков и консультантов медико-генетических центров.

Уровень внедрения: областной, республиканский.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Обследованию подлежат все пациенты в возрасте 3–45 лет с заболеванием печени неизвестного генеза, изолированным или в сочетании с проявлениями со стороны других систем организма (табл.). Инфекционная патология как причина заболевания печени должна быть предварительно исключена.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказаний к применению не имеется.

Полиорганные клинические проявления у пациентов
с болезнью Коновалова–Вильсона

| Системные клинические проявления | Симптомы |
|----------------------------------|---|
| Печеночные | Бессимптомная гепатомегалия Изолированная спленомегалия Постоянное повышение активности трансаминаз сыворотки Жировой гепатоз Псевдоаутоиммунный гепатит Цирроз (компенсированный и некомпенсированный) Молниеносная печеночная недостаточность |
| Неврологические | Нарушения двигательной функции (тремор, произвольные движения) Дизартрия Ригидная дистония Псевдобульбарный паралич Судороги Мигренеподобные боли Инсомния |
| Психиатрические | Депрессия Неврозы Изменения личности Психозы |
| Со стороны других систем | Аномалии почек: аминокацидурия и нефролитиаз Скелетные аномалии: ранний остеопороз и артрит Кардиомиопатия, дизритмии Панкреатит Гипопаратиреоз Нарушения менструального цикла, бесплодие, спонтанные аборты |

Клинические и биохимические характеристики фульминантного (молниеносного) вильсоновского гепатита:

- Кумбс-негативная гемолитическая анемия с признаками острого внутрисосудистого гемолиза;
- коагулопатия, нечувствительная к парентеральному введению витамина К;

- быстрое прогрессирование почечной недостаточности;
- относительно невысокий подъем сывороточных трансаминаз с начала появления клинических признаков;
- нормальная или сниженная (менее 40 Ед/л) активность сывороточной щелочной фосфатазы;
- соотношение пола пациентов 2:1 в сторону женского.

1. Биохимическая диагностика БКВ

Определение оксидазной активности церулоплазмينا в сыворотке крови

Оборудование и материалы:

- Лабораторный термостат с возможностью поддержания температуры до $37 \pm 0,5$ °С;
- спектрофотометр или микропланшетный ридер с фильтром 540 нм и длиной оптического пути 10 мм;
- о-дианизидин гидрохлорид кристаллический высокой степени очистки либо перекристаллизованный в условиях лаборатории.

Биологический материал:

- сыворотка крови (может храниться замороженной при -20 °С до 1 года).

Реагенты:

- 0,1 М ацетатный буфер рН 5,0; ионная сила — 0,1;
- 7,88 ммоль/л раствор о-дианизидина гидрохлорида на воде, хранится в темной посуде при $+2-8$ °С до 3 месяцев;
- 9 М водный раствор серной кислоты.

Последовательность действий:

- в 2 пробирки объемом 5-10 мл, маркированные 5 и 15 мин, добавляли 0,75 мл ацетатного буфера и 0,05 мл сыворотки;
- пробирки инкубировали 5 мин при 37 °С;
- с секундомером через равные промежутки времени во все пробирки добавляли 0,2 мл предварительно подогретого до 37 °С раствора о-дианизидина;
- ровно через 5 и 15 мин инкубации соответственно маркированные пробирки извлекали из термостата и заливали в них 2,0 мл серной кислоты, тщательно перемешивали;
- оптическую плотность раствора измеряли при 540 нм и длине оптического пути 10 мм;
- оксидазная активность церулоплазмينا рассчитывалась по формуле:

$$\text{оксидазная активность в Ед/л (U/l)} = (\text{O.D.15}' - \text{O.D.5}') \times 625.$$

Микромодификация метода определения оксидазной активности церулоплазмينا для капиллярной крови:

- капля капиллярной крови (50–100 мкл) помещалась в пластиковую центрифужную микропробирку, сыворотку получали центрифугированием при 1500 об./мин;
- непосредственно в ячейки микропланшета помещали 5 мкл сыворотки, 75 мкл ацетатного буфера и 20 мкл раствора о-дианизидина и инкубировали при 37 °С на инкубаторе-шейкере для микропланшетов 5 и 15 мин соответственно;
- реакцию останавливали добавлением 200 мкл 0,2 М раствора серной кислоты;
- оптическую плотность раствора измеряли на микропланшетном ридере при 540 нм и длине оптического пути 10 мм;
- оксидазная активность церулоплазмينا рассчитывалась по формуле:

оксидазная активность в Ед/л (U/l) = (O.D.15' - O.D.5') x 625.

Интерпретация результатов

Область нормальных значений, определенная нами при обследовании 200 доноров крови обоего пола, составляет 170–270 Ед/л.

При БКВ (40 пациентов) оксидазная активность церулоплазмينا резко снижена и составляет 20–90 Ед/л.

Возможные ошибки и затруднения

Тест рекомендуется проводить у пациентов старше 3-х лет, так как оксидазная активность церулоплазмينا в норме снижена у новорожденных и детей первых лет жизни.

При интерпретации результатов необходимо учитывать, что к существенному снижению оксидазной активности церулоплазмينا приводят высокая азотемия (более 100 г/л), а также повышенный уровень общего билирубина (более 160 мг/л).

Уровень церулоплазмينا как белка острой фазы повышен при инфекциях, беременности, приеме эстрогенов, что может повлиять на результаты теста у пациентов с БКВ.

До 20% здоровых гетерозиготных носителей БКВ имеют субнормальный уровень оксидазной активности церулоплазмينا.

Дифференциация больных и носителей БКВ возможна при изучении экскреции меди с мочой и ДНК-исследовании членов семьи.

Противопоказания к применению

Возраст пациента моложе 3-х лет, высокая степень гипербилирубинемии.

Определение 24-часовой экскреции меди с мочой

Оборудование и материалы:

- спектрофотометр или фотоколориметр с фильтром 420–450 нм и длиной оптического пути 10 мм;
- мерные цилиндры с шлифованными пробками объемом 50 мл;

- свинец уксуснокислый высокой степени очистки;
- диэтилдитиокарбамат натрия высокой степени очистки;
- медь сернокислая 5-водная особой чистоты;
- углерод четыреххлористый химически чистый.

Биологический материал:

- моча, собранная за 24 ч, с добавлением 10 мл концентрированной соляной кислоты для перевода меди в ионное состояние.

Реагенты:

- реактив на медь (раствор диэтилдитиокарбамата свинца в четыреххлористом углероде).

Приготовление реактива на медь:

- 0,1 г свинца уксуснокислого растворяют в 50–100 мл дистиллированной воды, переносят в делительную воронку вместимостью 500 мл и добавляют 0,1 г растворенного в 100 мл воды диэтилдитиокарбамата натрия — образуется белая взвесь нерастворимого в воде диэтилдитиокарбамата свинца;
- в делительную воронку добавляют 250 мл четыреххлористого углерода и круговыми движениями взбалтывают, взвесь растворяется в четыреххлористом углероде, а водный слой просветляется;
- нижний слой раствора диэтилдитиокарбамата свинца в четыреххлористом углероде фильтруют через сухой бумажный фильтр в мерную колбу объемом 500 мл и добавляют хлористый углерод до метки.

Реактив может храниться в темной посуде в холодильнике до 4 месяцев.

Основной стандартный раствор меди (1 мл раствора содержит 100 мкг меди): 0,393 г меди сернокислой 5-водной ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) растворяют в мерной колбе объемом 1 л в дистиллированной воде, подкисленной серной кислотой (1 мл разбавленной 1:5 на 1 л раствора меди).

Рабочий раствор меди (1 мкг в 1 мл): готовится непосредственно перед проведением анализа разведением основного в 100 раз.

Последовательность действий

- в 2 мерных цилиндра объемом 50 мл вносят 30–40 мл мочи;
- в один цилиндр добавляют 8 мл реактива на медь (опытная проба);
- в другой цилиндр добавляют 8 мл четыреххлористого углерода (контроль пробы);
- одновременно ставят стандартную пробу и контроль на нее: в мерный цилиндр объемом 50 мл вносят 8 мл рабочего раствора меди, 0,5 мл 2 М раствора соляной кислоты, дистиллированной воды до объема пробы мочи и 8 мл реактива;
- в цилиндр с контролем стандарта вносят 30–40 мл дистиллированной воды, 0,5 мл 2 М соляной кислоты и 8 мл реактива на медь;
- все 4 цилиндра закрывают пробками, энергично перемешивают (20 раз) и оставляют для расслоения эмульсии на 30–40 мин;

- жидкость над слоем реактива отсасывают, а нижний слой переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 5 мин при 1500 об./мин;
- слой над реактивом отсасывают, а сам реактив фильтруют через маленький бумажный фильтр;
- фотометрируют пробу против контроля пробы, стандарт — против контроля стандарта при 420–450 нм и длине оптического пути 10 мм;
- экскреция меди за 24 ч определяется по формуле:

$$\frac{O.D. \text{ пробы}}{O.D. \text{ стандарта}} \times \text{концентрация стандарта (0,001 мг/мл)} \times \text{объем мочи, собранной за 24 ч, мл} = \text{экскреция меди за 24 ч/мг.}$$

Интерпретация результатов

В норме суточная экскреция меди, определенная нами при обследовании 520 детей и взрослых обоего пола, не превышает 0,045 мг за 24 ч. При БКВ (40 пациентов) экскреция меди за 24 ч резко повышена.

Возможные ошибки и затруднения

При сборе мочи следует подкислять ее, как указано в инструкции, что необходимо для перевода меди в ионное состояние. В щелочной моче медь может осаждаться в виде гидроокиси, в нейтральной — образовывать комплекс с белками, клеточными элементами.

Противопоказания к применению

Противопоказаний к применению не имеется.

2. Молекулярно-генетическая диагностика БКВ

Идентификация мутации Н1069Q гена АТР7В

Оборудование и материалы:

- программируемый нагревательный блок (амплификатор);
- термостат для микропробирок;
- пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл;
- микропипетки с одноразовыми наконечниками;
- камера для вертикального электрофореза;
- стекла для фореза соответствующего размера;
- прокладки и гребенка соответствующей толщины;
- источник постоянного тока;
- UV трансиллюминатор;
- камера для фотографирования гелей;
- фотобумага.

Реактивы:

- Таq-полимераза 5 Ед/мкл;
- дезоксирибонуклеотиды (dGTP, dCTP, dATP, dTTP) 100 ммоль/л;
- 10x Таq буфер с KCl;
- раствор MgCl₂ 25 ммоль/л;
- маркер молекулярного веса ROX350;

- рестриктаза Alw 21 I с соответствующим 10x буфером;
- бромфеноловый синий;
- ксиленцианол;
- сахароза 40%;
- акриламид;
- N,N'-метиленбисакриламид;
- трис, ЭДТА, борная кислота;
- персульфат аммония;
- ТЕМЕД;
- бромистый этидий.

Последовательность действий

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов с помощью готовых наборов либо методом фенольно-хлороформной экстракции.

Выделение ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции:

- к выделенным стандартным методом лейкоцитам добавляли 0,1 объема 10% SDS (додецилсульфат натрия), 150 мкл бидистиллированной воды и протеиназу К до конечной концентрации 1 мг/мл;
- ингредиенты перемешивали и инкубировали в течение ночи при 37 °С либо в течение 3 ч при 55 °С;
- к смеси добавляли 0,5 объема фенола и 0,5 объема смеси изоамилового спирта с хлороформом в пропорции 1:24. Компоненты медленно перемешивали в течение 5–10 мин переворачиванием пробирок;
- центрифугировали 7 мин при 7 000 об./мин;
- верхнюю фазу отбирали в пробирки, добавляли 1 объем смеси изоамилового спирта с хлороформом в пропорции 1:24;
- центрифугировали 7 мин при 7 000 об./мин;
- верхнюю фазу отбирали в пробирки, добавляли 0,1 объема ацетата натрия (рН 5,2) и 2–3 объема этанола 96%;
- видимый высокомолекулярный сгусток ДНК переносили в другую пробирку, отмывали 500 мкл этанола 70%;
- ДНК высушивали и растворяли в 200–300 мкл бидистиллированной воды.

Проведение полимеразной цепной реакции

1 мкл препарата ДНК использовали для ПЦР: амплифицировали участок геномной ДНК, содержащий мутацию Н 1069Q.

Для определения мутации Н1069Q проводили две последовательные амплификации образцов ДНК. Составляли общую реакционную смесь, которая в одной пробирке содержала все необходимые компоненты, кроме исследуемой ДНК: амплификационный буфер (1x), смесь дНТФ 2 мкМ каждого, 2 мМ MgCl₂, 1 Ед. Таq-полимеразы, 10 нМ каждого праймера (3348

и 3349 для первой амплификации, 3348 и MUT 1070 для второй амплификации). Реакционный объем на 1 реакцию — 25 мкл: 24 мкл реакционной смеси и 1 мкл исследуемой ДНК.

Для ПЦР были использованы следующие праймеры:

| | | |
|----------|---|-------------------------------|
| 3348 | - | cag cta cca gag aag gac atg g |
| 3349 | - | agt tct gcc tca gga gtg tga c |
| MUT 1070 | - | tgc gca ggc sag sag tga gc |

Амплификационная программа: 94 °С в течение 4 мин, 33 цикла со следующими параметрами: денатурация при температуре 94 °С в течение 20 с, отжиг праймеров при температуре 58 °С в течение 30 с, элонгация при 72 °С в течение 25 с. Конечная элонгация при 72 °С продолжалась 5 мин. Продукт первого раунда амплификации (330 п.о.) использовался как матрица во втором раунде. В результате второй амплификации в нормальной, но не в мутантной ДНК создавался сайт рестрикции для рестриктазы Alw 21I.

Проведение рестрикции продуктов амплификации

В пробирку объемом 0,5 мл добавляли 5 мкл амплификата, 5 ЕД рестриктазы Alw 21 I и соответствующий 1х рестрикционный буфер. Общий объем доводили до 20 мкл H₂O. Пробирки помещали в термостат 37 °С на 16–18 ч. После окончания рестрикции пробы помещали в холодильник.

Проведение электрофоретического разделения рестрикционных фрагментов

Приготовление растворов:

- 30% раствор полиакриламида: 29 г акриламида, 1 г N,N'-метиленабисакриламида, H₂O до 100 мл;
- 10х TBE буфер: 3,72 г ЭДТА, 27,5 г борной кислоты, 54 г триса, H₂O до 500 мл;
- 20% персульфат аммония: 0,2 г персульфата, H₂O до 1 мл.

Собирали стекла для заливки геля.

Приготовление геля:

6 мл 9% геля смешивали: 1,5 мл 30% полиакриламида, 0,5 мл 10х TBE, 3,5 мл H₂O, 24 мкл 20% персульфата аммония, 7–9 мкл TEMED.

Раствор тщательно перемешивали, быстро заливали между стеклами и вставляли гребенку, стараясь не занести пузырьков воздуха. Оставляли для полимеризации на 15–20 мин. После полимеризации акриламида удаляли гребенку, промывали образовавшиеся лунки 1х TBE.

Собирали камеру для электрофореза, заполняли резервуары 1х TBE.

В пробирки, содержащие рестрикционные фрагменты, добавляли погружающий буфер в пропорции 1:6.

В лунки геля микропипеткой наносили 10-20 мкл пострестрикционной смеси. В крайнюю лунку наносили маркер молекулярного веса.

Камеру подключали к источнику тока. Электрофоретическое разделение проводили в течение 30 мин при 360 В.

Визуализация результатов электрофоретического разделения

Приготовление раствора бромистого этидия 10 мг/мл: 1 г бромистого этидия, 100 мл H₂O размешивали на магнитной мешалке в течение нескольких часов, хранили в темноте в плотно закупоренном сосуде.

После окончания электрофоретического разделения разбирали камеру для электрофореза, пластинку геля извлекали из стекол и помещали в раствор бромистого этидия на 10–15 мин. Для окраски ДНК 100 мкл раствора бромистого этидия 10 мг/мл растворяли в 500 мл 1x TBE. Помещали пластинку геля на стекло UV трансиллюминатора и визуализировали результаты электрофоретического разделения в проходящем ультрафиолетовом свете. С целью документального фиксирования результатов электрофоретического разделения использовали камеру для фотографирования гелей.

Интерпретация результатов

Интерпретация результатов представлена на рис. 1.

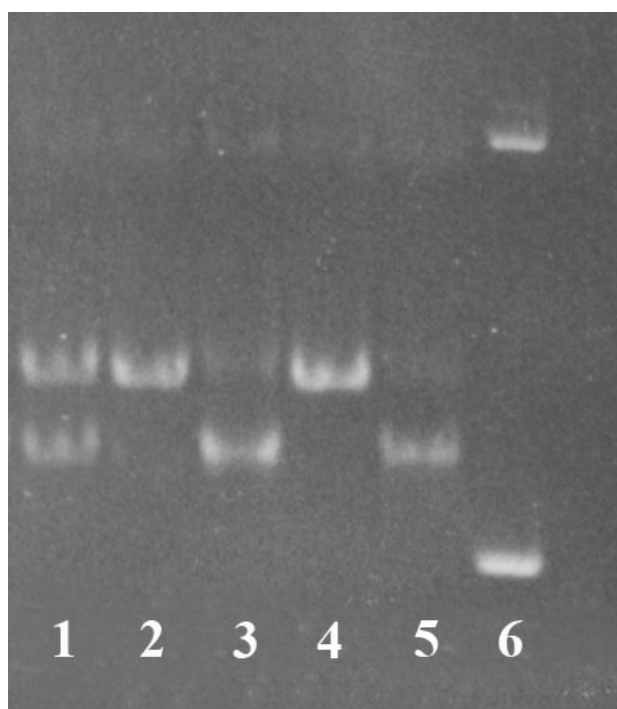


Рис. Электрофоретическое разделение рестрикционных фрагментов для определения мутации H1069G гена АТР7В:

колонка 1 — сигналы на уровне 150 и 125 п. о. — гетерозиготное носительство мутации H1069G;

колонки 2 и 4 — сигнал на уровне 150 п. о. — гомозиготное носительство мутации H1069G;

колонка 3 — сигнал на уровне 125 п. о. — искомая мутация не обнаружена;

колонка 5 — образец ДНК здорового человека;

колонка 6 — ДНК-маркер молекулярного веса.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Учитывая крайне высокую чувствительность метода ПЦР, необходимо избегать загрязнения исследуемых образцов инородным биологическим материалом.

Для предотвращения диагностических ошибок надо соблюдать следующие правила:

- использовать только химически чистую и желательнее стерильную посуду;
- после работы с каждым объектом инструмент и используемые поверхности лабораторных столов протирать этанолом;
- использовать одноразовые пробирки и наконечники для пипеток;
- стерилизовать применяемые растворы (если допустима их стерилизация) и хранить их разлитыми небольшими порциями;
- работать только с минимально необходимыми объемами растворов;
- перед открыванием крышек пробирок осаждать растворы со стенок центрифугированием;
- в каждую серию проб включать в качестве контроля пробирку с поэтапным внесением всех применяемых растворов, но без ДНК (отрицательный контроль);
- при выделении ДНК и постановке ПЦР лицо сотрудника должно быть защищено экраном либо маской, работа выполняется в одноразовых перчатках, которые в случае попадания на них материала меняют.

В молекулярно-генетической лаборатории необходимо выделять несколько зон.

В 1-й зоне экстрагирования ДНК осуществляют все этапы обработки биологического материала и выделения геномной ДНК.

2-я зона проведения ПЦР предназначена для внесения в пробирки компонентов амплификационной смеси и ДНК, а также для проведения амплификации. В зонах экстрагирования ДНК и проведения амплификации не следует открывать пробирки с ее продуктами, эту процедуру осуществляют в изолированной третьей зоне.

В 3-й зоне анализа продуктов ПЦР проводят рестрикцию, подготовку образцов к внесению в гель, электрофорез и регистрацию результатов.