Российский национальный исследовательский медицинский университет

Кафедра клинической лабораторной диагностики ФУВ

Щербо Сергей Николаевич

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА.

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ.

Грядет эра персонализированной медицины и готовиться к ней нужно уже сегодня.

Джордж Черч. 2007

Медицина 4 «П» **Медицина XXI века**

Предиктивная (предсказательная)

Предупредительная (профилактическая)

Партисипаторная (participatory) – пациент участник процесса, его информируют и обучают. Ему помогают в выборе, о нем заботятся.

Персонализированная (индивидуальная)

Лерой Гуд (Leroy Hood) США, 2008)

ДИАГНОСТИКА ДОСТИГЛА ТАКИХ

УСПЕХОВ,

ЧТО ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

ПРАКТИЧЕСКИ НЕ ОСТАЛОСЬ

БЕРТРАН РАССЕЛ

1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

Персонализированная медицина (персонифицированная медицина)

Термин «personalized medicine» впервые появился в качестве названия монографии, изданной в 1998 году:

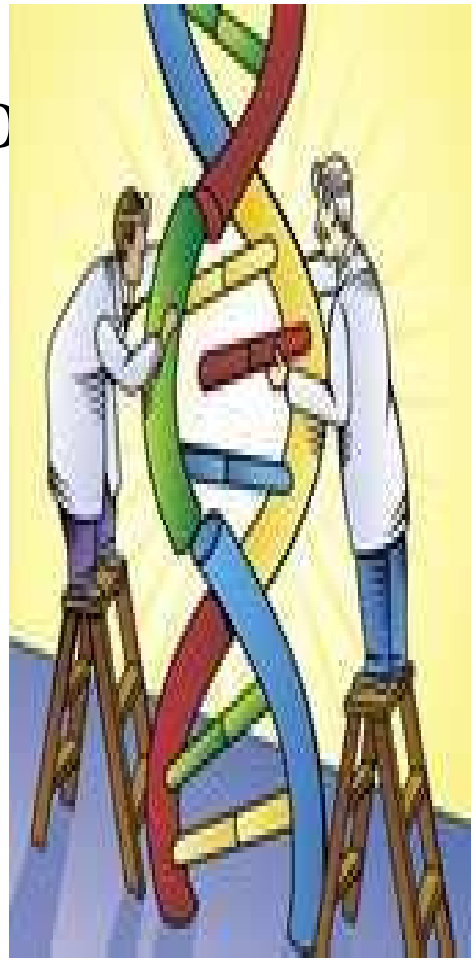
Jain R.R. Perzonalized Medicine, Decision Resources Inc. Waltham, MA, USA, 1998.

Варианты терминов, относящихся к концепции персонализированной медицины

- **Геномная медицина (genomic medicine) или терапия основанная на генотипе**
- **«Медицина под заказчика» (tailored medicine),**
- **Предсказательная медицина (predictive medicine).**
- **Индивидуализированная или основанная на индивидуальном подходе терапия**
- **Информационно обоснованная медицина**
- **Комплексное здравоохранения**

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ ИНТЕГРАЛЬНУЮ МЕДИЦИНУ, КОТОРАЯ ВКЛЮЧАЕТ РАЗРАБОТКУ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫХ СРЕДСТВ ЛЕЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ГЕНОМИКИ, ТЕСТИРОВАНИЯ НА ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ЗАБОЛЕВАНИЯМ, ПРОФИЛАКТИКУ, ОБЪЕДИНЕНИЕ ДИАГНОСТИКИ С ЛЕЧЕНИЕМ И МОНИТОРИНГОМ ЛЕЧЕНИЯ



1.2. ИСТОРИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И РАЗВИТИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

Гален К.
Мудров М.Я.
Пирогов Н.И.
Боткин С.П.
Флоринский В.М.
Ослер У.
Уотсон Д
Вентер Крейг
Наша эра
1850-1900 г.
2000 г.
2007-2010 г.г.
Идея
Клиническая практика
Персональные геномы

Российские врачи – персонализированная медицина

<u>1820-ые годы</u>

«Будущее принадлежит медицине профилактической»

«Я вам скажу кратко и ясно: врачевание состоит в лечении самого больного. Вот вам и вся тайна моего искусства …»

М.Я. Мудров

«Болезнь легче предупредить, чем лечить»

Н.И. Пирогов

Первооткрыватель главного комплекса гистосовместимости Жан Доссе (Jean Dausset, 1916-2009 гг.)

Нобелевская премия 1980 года

Основатель предиктивной (предсказательной) медицины

«Чтобы предупредить болезнь надо ее предвидеть»

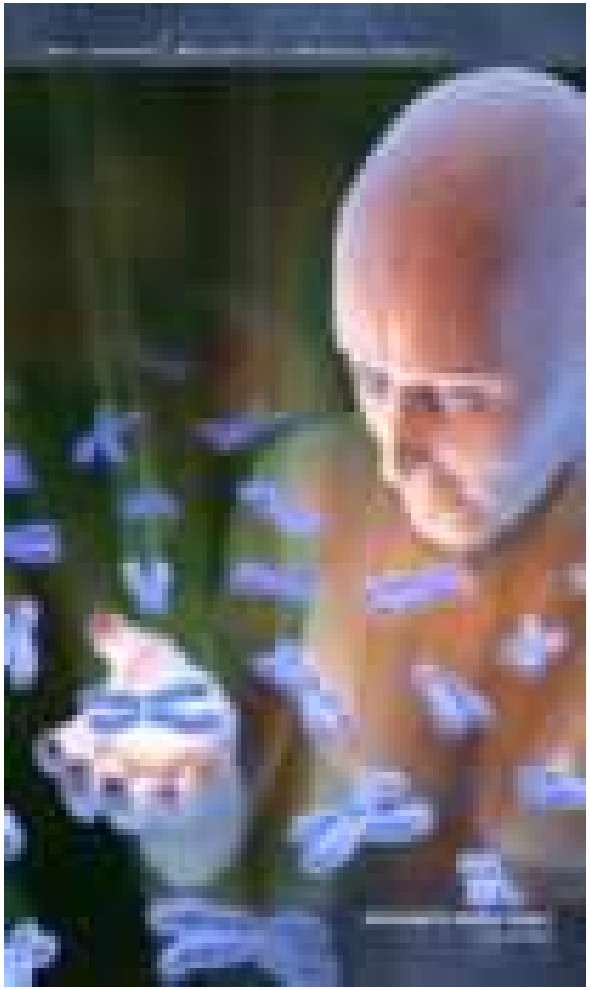
Жан Доссе

1.3. МЕЖДУНАРОДНЫЕ ПРОЕКТЫ В ОБЛАСТИ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

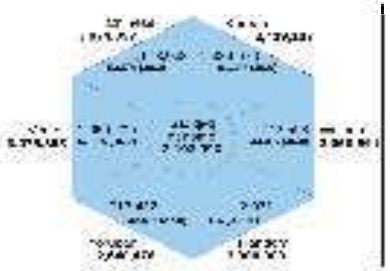
ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА

1988 - 26 ИЮНЯ 2000 г. HUGO и Celera Genomics

- **ПОТРАЧЕННО 6 млрд. ДОЛЛАРОВ**
- **ОТСЕКВЕНИРОВАНО 3,2 МЛРД. ПАР ОСНОВАНИЙ**
- **К НАЧАЛУ 1998 г. ОТСЕКВЕНИРОВАНО ОКОЛО 3% ГЕНОМА**
- **ФИРМА Celera Genomics (БЫСТРАЯ) И МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНЦСОРЦИУМ ПРИМЕНЯЛИ РАЗНЫЕ СТРАТЕГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ**
- **ИСПОЛЬЗОВАН МАТЕРИАЛ ОТ 7-10 ЧЕЛОВЕК**



От «Генома человека» к геному индивида



1990 - 2003
Проект «Геном человека»
300 000 000 $, 3 млрд нуклеотидов

2002 – 2010
Проект HapMap
Каталог частых полиморфизмов
~6 млн SNP, 270 человек, 4 популяции

2007-2010 Индивидуальные геномы
14 персональных геномов к февралю 2010
10 000 000 $ (геном Вентера, 2007)
1 700 $ - сиквенс на наночипах (2010)

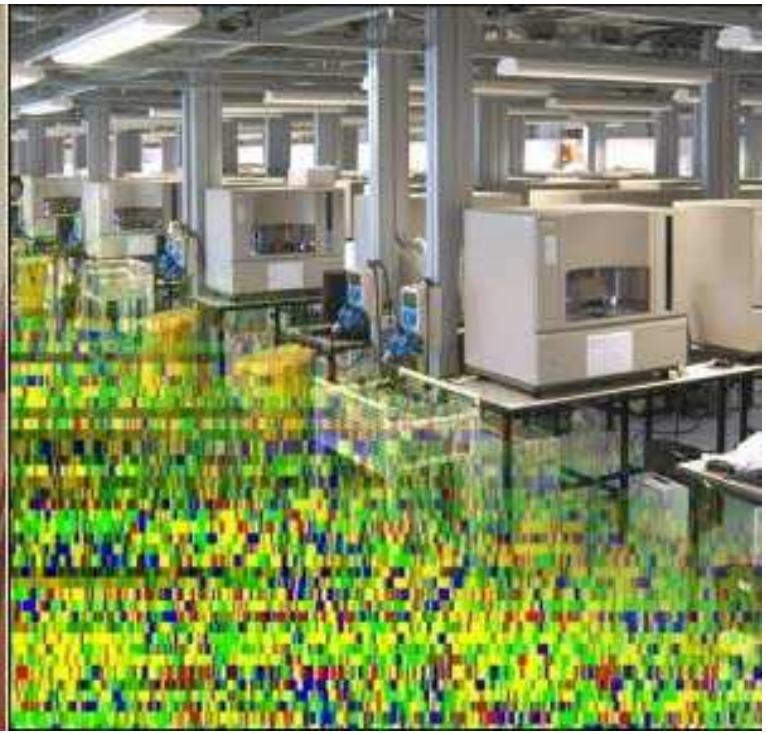
2008 – 2011 Проект «1000 геномов»
2000 полных геномов
4 «популяции» (Африка, Европа, Азия, Америка)

2015? Геном каждого при рождении
За 100 $?

В.А.Степанов

Слева: **Автоматизированная линия подготовки образцов ДНК для секвенирования в Центре Геномных исследований института Уайтхеда.**

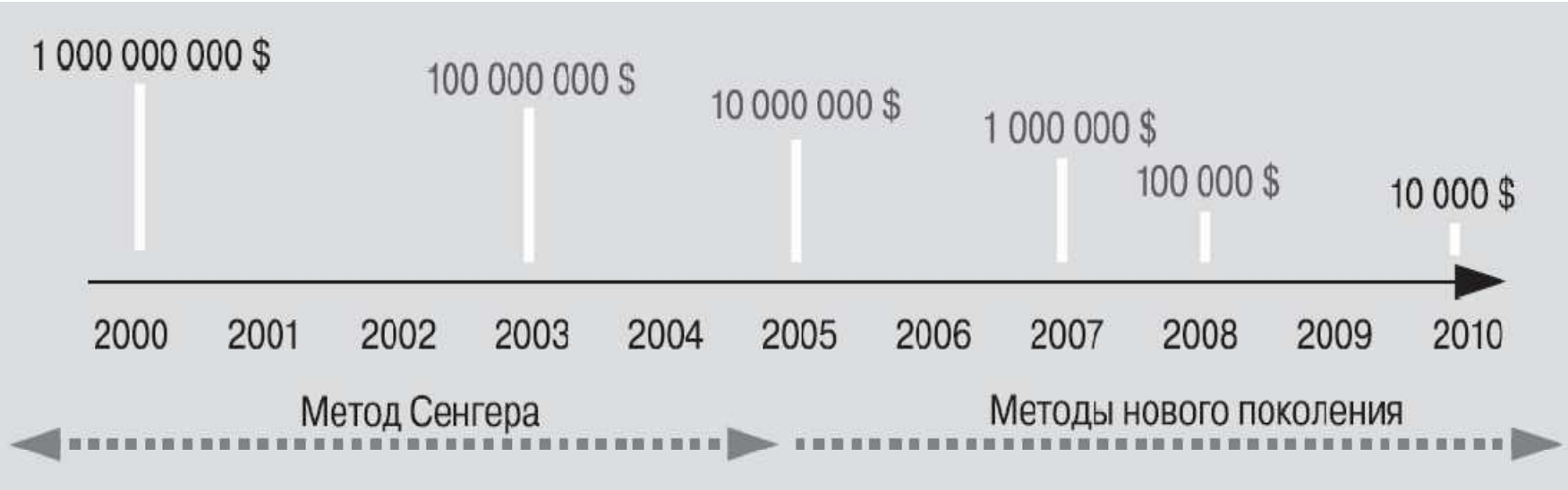
Справа: **Лаборатория в Сэнгеровском институте, заполненная автоматами для высокопроизводительной расшифровки последовательностей ДНК**



я

Закон Мура для геномного секвенирования

В 2003 г. стоимость секвенирования генома одного человека составляла примерно 300 миллионов долларов. В 2007 г. она равнялась уже 1 миллиону долларов, а в 2008 году – 60 тысячам долларов США.



Ion Torrent ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРСОНАЛЬНОГО СЕКВИНАТОРА

1 МИЛЛАРД ДОЛЛАРОВ ИНВЕСТИЦИЙ

БЕЗ:

МОДИФИКАЦИИ НУКЛЕОТИДОВ

ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛАЗЕРОВ

БЕЗ ОПТИКИ

БЕЗ ДЕТЕКТИРУЮЩИХ КАМЕР

БЕЗ ФЕРМЕНТОВ

БЫСТРЫЙ АНАЛИЗ И РЕГИСТРАЦИЯ

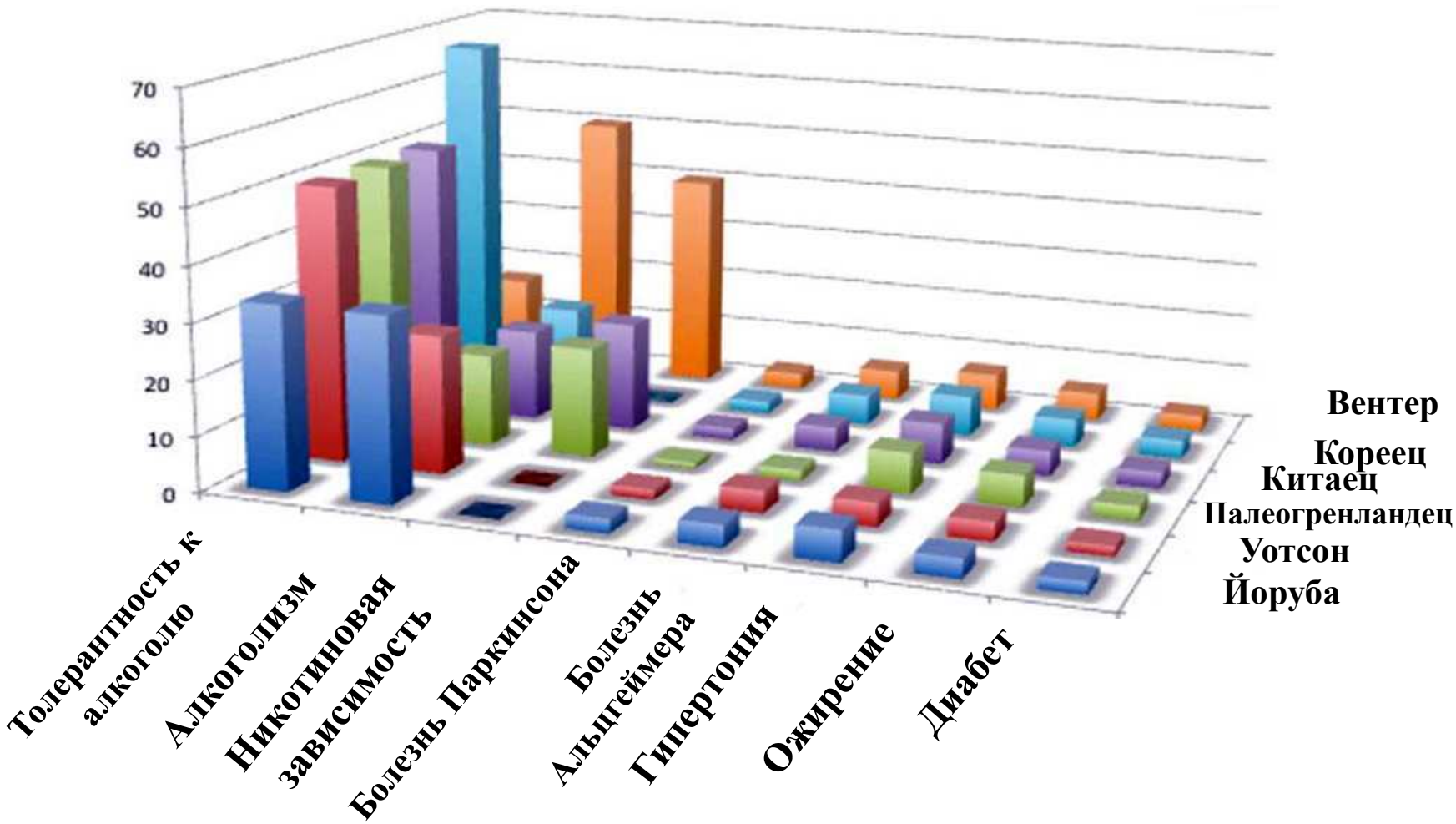
ЭРА ПЕРСОНАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ
2007 ГОД

«Знать последовательность своей ДНК
не менее важно, чем иметь автомобиль.»
ДЖЕЙМС УОТСОН

И…… получает из рук
Джонатана Ротберга цифровую копию
своего генома (2007)

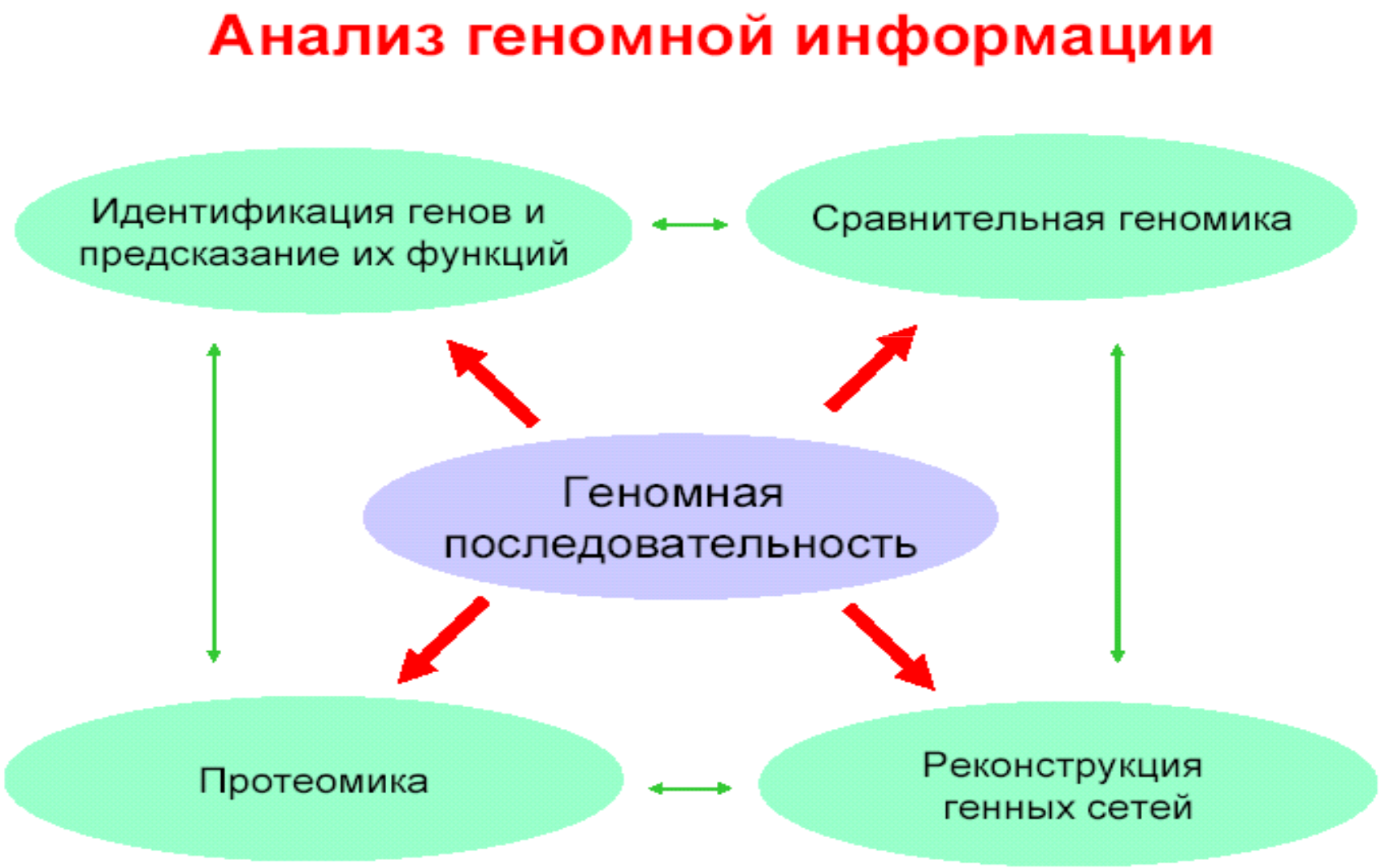
Расшифровка в 2007 г. генома Крейга Вентера и озвученный им проект анализа в ближайшие годы генома 10000 человек, уменьшение стоимости секвенирования, дают новый импульс развития персонизированной медицины.

Суммарная частота SNP, определяющих риск развития многофакторных заболеваний



Rasmussen et al., 2010

АНАЛИЗ ГЕНОМНОЙ ИНФОРМАЦИИ



МУЛЬТИФАКТОРНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ (МФЗ)

- Генетический полиморфизм СВЯЗАН с развитием заболевания
- Заболевание возникает при ВЗАИМОДЕЙСТВИИ различных факторов (генетических и негенетических)
- Один полиморфизм может быть связан С РАЗНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
- Разные факторы влияют на развитие заболевания ПО-РАЗНОМУ
- Разные факторы влияют на развитие заболевания С РАЗНОЙ СИЛОЙ
- Мы можем ОЦЕНИТЬ эту силу

Определение этнической принадлежности пациента – один из способов быстрой оценки вероятности развития у него определенного заболевания. Однако судить об этом можно, только проведя ДНК-тестирование.

Исполнитель: Европейский консорциум Gabriel

Сотрудничество: 164 ученых из 19 стран (23 исследовательских групп)

Объекты исследования: 10 000 астматиков (дети и взрослые) и 16 000 здоровых индивидуумов.

Ключевые результаты проекта GABRIEL (2006-2010 г.г.)

Обнаружены новые гены, участвующие в иммунном ответе, проницаемости эпителия бронхов и контроле скорости восстановления повреждений слизистой оболочки дыхательных путей.

- Астму считали единой болезнью. Но полученные результаты предполагают биологические различия для трех клинических форм: детская, астма взрослых и тяжелая астма.
- Аллергия является вторичным по отношению к дефектам слизистой оболочки дыхательных путей при астме и кожного барьера у детей с экземой. Терапия только аллергии не будет эффективна для болезни.
- Предсказательная ценность генетических тестов низкая. Необходима идентификация внешнесредовых факторов.
- Обозначены мишени для эффективной терапии астмы.

Проект поиска вариаций числа копий у больных аутизмом и психозами с ранним началом

В 2008 г. была создана международная группа исследователей из 7 стран. Исследование предполагается провести на выборке, численность которой составит не менее 4000 больных и 30000 человек контрольной группы.

Возможность эффективной работы появилась после разработки фирмой «deCODE genetics», являющейся координатором проекта, микрочипа HumanCNV370, который позволит выявлять десятки тысяч последовательностей ДНК: 40 тысяч редких вариантов CNVs потенциально представляющих высокий риск для развития исследуемых патологий, 5000 распространенных CNVs и 320 тысяч однонуклеотидных полиморфизмов, связанных с умеренным риском. Будет сделана попытка установить причинно-следственную связь между вариантами повышенного риска и фенотипическими проявлениями. Далее предполагается изучение экспрессии выявленных генов, а также проведение исследований на животных с выключенной функцией этих генов.

ПРОЕКТ ПРОТЕОМ ЧЕЛОВЕКА
(Human Proteome Project)

Проект протеом человека (Human Proteome Project), направлен на то, чтобы каталогизировать и охарактеризовать все белки (предположительно несколько миллионов), содержащиеся в человеческом организме. Проект продлится десять лет.

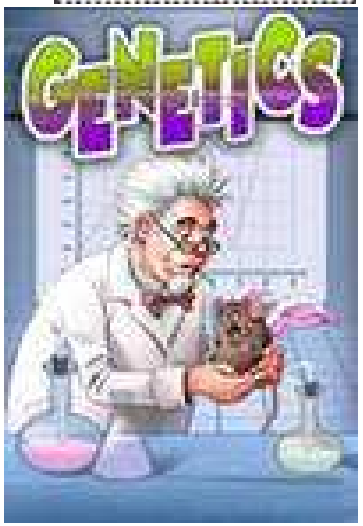
Предполагается, что в результате проекта будет установлено, какие белки присутствуют в каждой ткани организма, где они располагаются в клетке и с какими ещё белками они взаимодействуют.

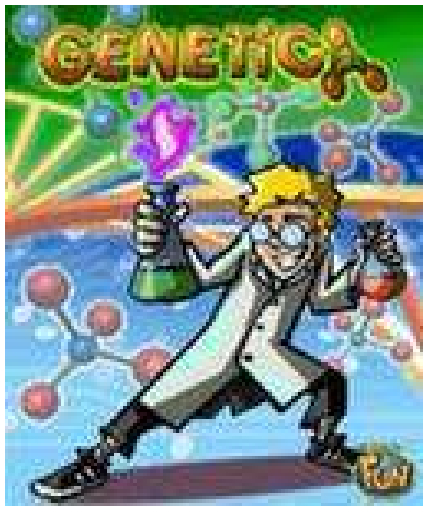
За Россией закреплена 18-я хромосома (2012 год) и за первый год проанализированы белки для 219 генов.

Результаты сохраняют в общей базе, есть и международная организация со штаб-квартирой в Квебеке, формально координирующая проект.

Ранее были реализованы программы по исследованию белков плазмы крови, печени и почек.

1.4. ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ И ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ





КАОЛИЦИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

Personalized Medicine Coalition (PMC)

Др Эдвард АБРАХАМС

эксклюзивный директор

PMC Personalized Medicine Coalition

IBM

hp invent

Applied Biosystems

Applera Corporation

CELERA an Applera Corporation Business

Deloitte.

Personalized Medicine www.futuremedicine.com

SCIENTIFIC AMERICAN

THE JOURNAL OF LIFE SCIENCES

Genetic Alliance

THE biomarkers CONSORTIUM

Cancer Drug News

AMERICAN INSTITUTE FOR MEDICAL AND BIOLOGICAL ENGINEERING

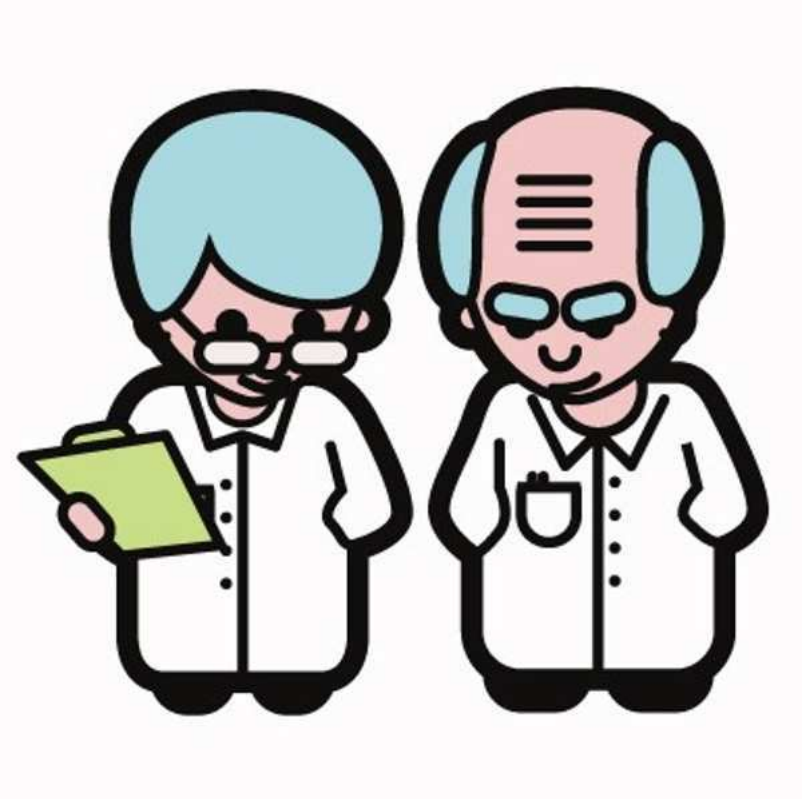
SIEMENS

LabCorp Laboratory Corporation of America

ЕС и персонализированная медицина

Развитие ПМ координируется комиссией по здравоохранению Евросоюза: в Брюсселе в 2011 году состоялось представительное совещание по развитию указанного направления. Создана Европейская ассоциация персонализированной медицины (EPEMED, The European Personalised Medicine Association). Мировые рынки медицинской техники и лекарственных средств в значительной степени формируются крупными транснациональными компаниями, такими как GeneralElectric, Siemens, Aloka, Philips, компании большой фармы (BigPharma) – Pfizer, Novartis, Johnson&Johnson, Aventis, Bayer и др.

2.1. Уровни анализа, биомаркеры и ОМы в лабораторной медицине



ЛАБОРАТОРНАЯ И ПЕСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА

В настоящее время сложились новые предпосылки для **переоценки роли лабораторной медицины в общей системе клинических дисциплин**, что обусловлено требованиями, которые выдвигаются в связи со стремительным развитием современных подходов и принципов **доказательной и персонализированной медицины**, более глубоким пониманием характера междисциплинарных отношений.

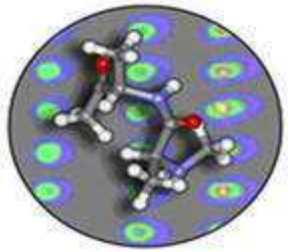
Мультипараметрические исследования

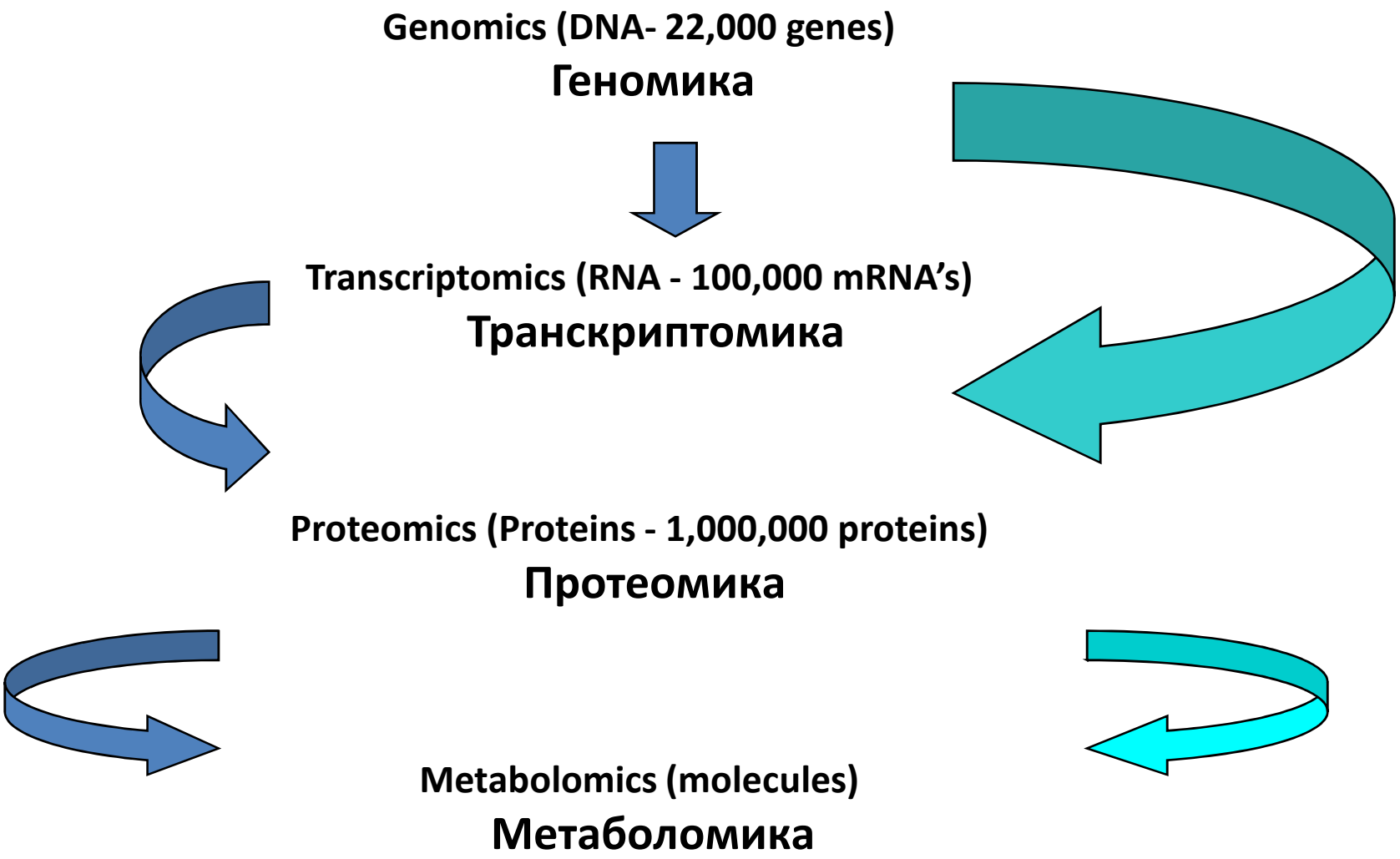
Разработка современных молекулярно-генетических методов и изобретение медицинских биочипов, в частности для изучения полиморфизмов генов системы детоксикации, открыло возможность проведения мультипараметрических исследований.

Сложилась новая ситуация в молекулярной медицине, когда не эксперименты подтверждают новые гипотезы, а новые диагностические подходы и наборы значимых биомаркеров рождаются на основе собранных массивов данных.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ УРОВНИ

- Функциональный
- Структурный
- Молекулярный:
- метаболический,
- протеомный,
- транскриптомный,
- геномный




Genomics (DNA- 22,000 genes)
Геномика
Transcriptomics (RNA - 100,000 mRNA's)
Транскриптомика
Proteomics (Proteins - 1,000,000 proteins)
Протеомика
Metabolomics (molecules)
Метаболомика

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БИОМАРКЕРЫ

Исследования геномов:

- Полное повторное секвенирование геномов
- Направленное секвенирование участков геномов;
- de novo секвенирование небольших геномов

Эпигенетические исследования:

- ДНК-белковые взаимодействия (ChIP-Seq)
- Анализ метилирования ДНК

Анализ РНК (RNA-Seq)

- Изучение малых РНК (miRNA, siRNA, piRNA, esiRNA);
- Измерение уровней мРНК, анализ изоформ мРНК, изучение некодирующих
- РНК, обнаружение новых транскриптов;
- Экспрессия генов в отдельной клетке;
- Исследование вторичной структуры РНК;
- РНК-белковые взаимодействия.

Анализ белков

- Секвенирование аптомеров

ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СТАТИЧЕСКИХ И ДИНАМИЧЕСКИХ ОМИКов

ГЕНОМИКА – ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВСЕХ ГЕНОВ И МУТАЦИЙ, ПРИВОДЯЩИХ К НАСЛЕДСТВЕННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ ИЛИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ

ТРАНСКРИПТОМИКА –ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВСЕХ МАТРИЧНЫХ РНК, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА мРНК И ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ ВСЕХ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ У ДАННОГО ЧЕЛОВЕКА В ДАННЫХ УСЛОВИЯХ

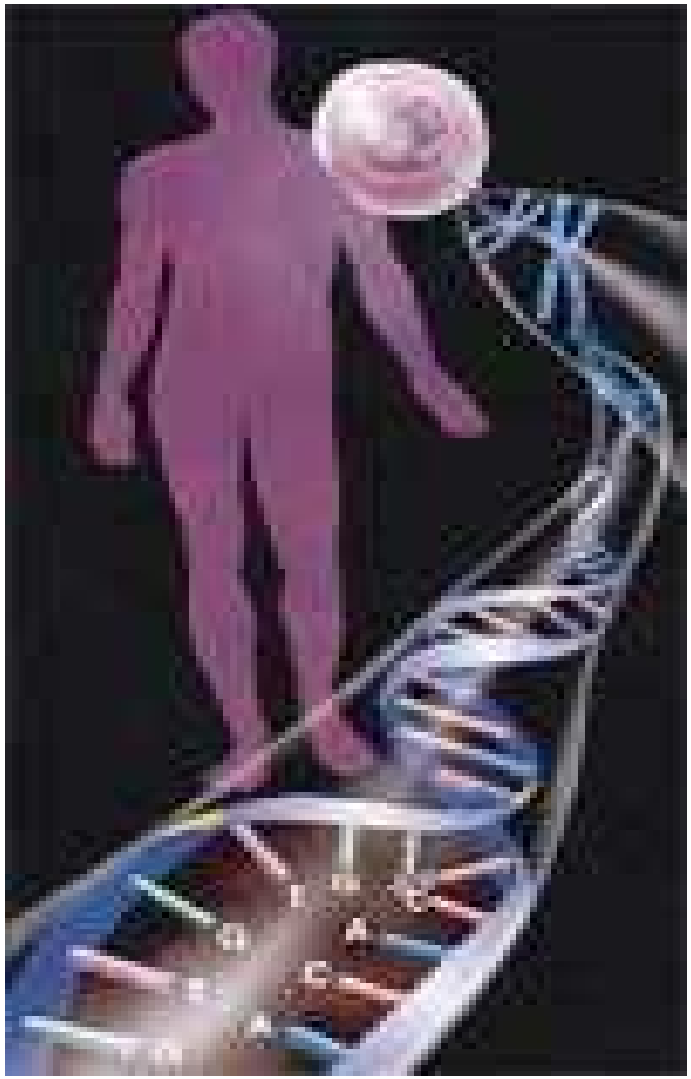
РНомика – ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВСЕХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК И ИЗМЕРЕНИЕ ИХ ИЗМЕНЕНИЙ У ДАННОГО ЧЕЛОВЕКА В КОНКРЕТНЫХ УСЛОВИЯХ

МЕТАБОЛОМИКА–ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВСЕХ МЕТАБОЛИТОВ В КЛЕТКАХ, ТКАНЯХ, ОРГАНАХ, БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ У ДАННОГО ЧЕЛОВЕКА В КОНКРЕТНЫХ УСЛОВИЯХ

Таблица ОМов и их встречаемость в литературе и сайтах (www.genome.org), *(D. Greenbaum et al., 2010)*

Термин	Описание	Google	PubMed	Год первого цитирования в PubMed
Геном	Совокупность кодирующей и некодирующей информации в организме.	~ 1880000	66171	1932**
Протеом	Белок-кодирующие регионы в геноме	~ 63000	703	1995
Транскриптом	Популяция мРНК транскриптов в клетке, взвешенных по их уровню экспрессии.	3520	72	1997
Физиом	Количественное описание физиологической динамики или функции в целом организме.	2980	15	1997
Метаболом	Количественная совокупность всех малых молекул, представленных в клетке в специфическом физиологическом состоянии.	349	12	1998
Феном	Качественная идентификация формы и функции выведенная из генов, но лишенная количественного интегративного определения.	4980	6	1995
Морфом	Количественное описание анатомической структуры, биохимического и химического состава интактного организма, включающее его геном, протеом, клеточные, тканевые и органные структуры.	238	2	1996
Интерактом	Список интеракций между всеми макромолекулами в клетке.	56	2	1999
Гликом	Популяция карбогидратных молекул в клетке.	46	1	2000

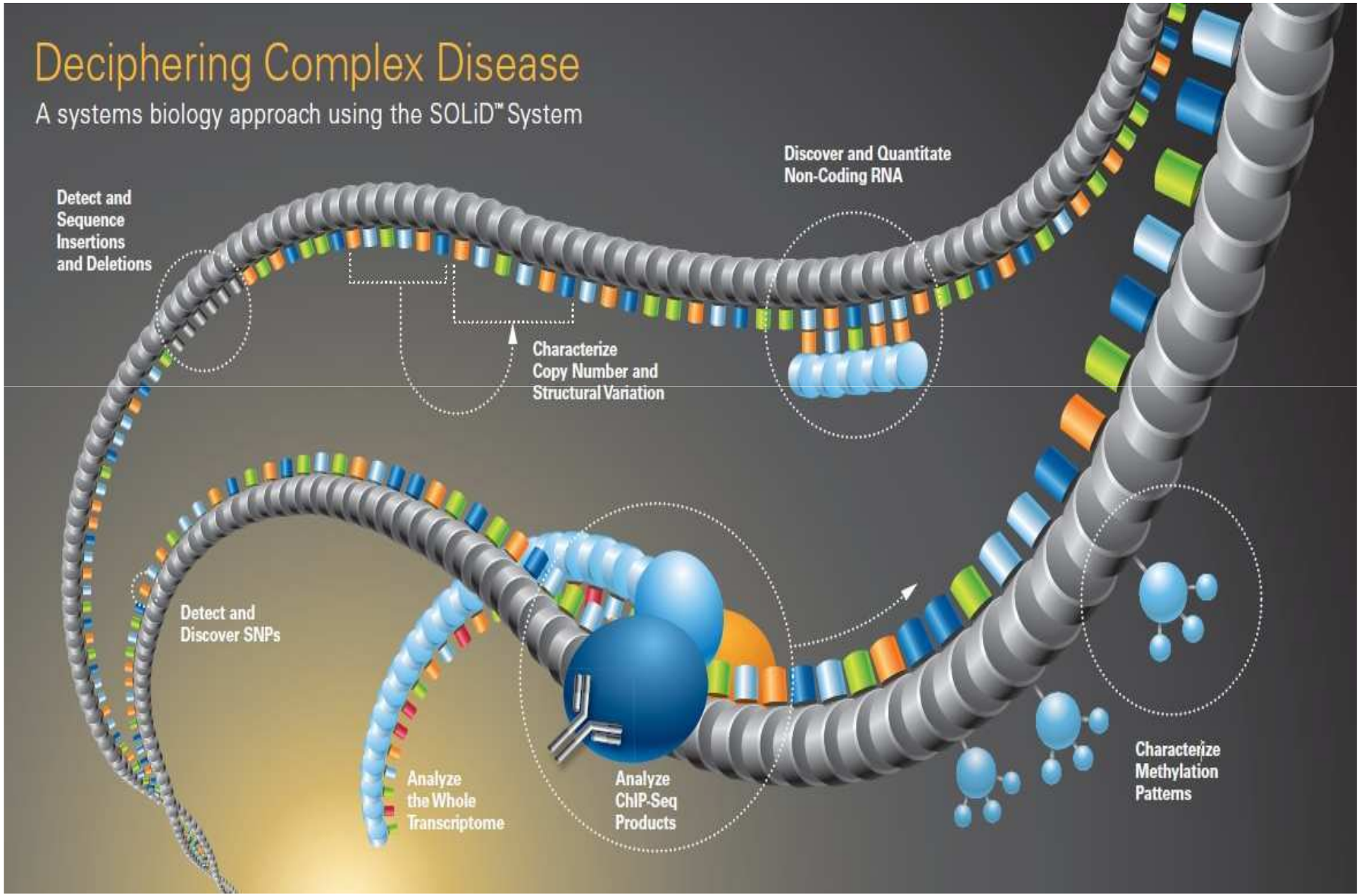
2.1.2. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ



Мы раньше думали, что нашу судьбу определяют звезды. Сейчас мы знаем, что во многом наша судьба - это наши гены

нобелевский лауреат Джеймс Уотсон

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ



ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ (ГП)
-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ОГРАНИЧЕННАЯ ОДНИМ ВИДОМ

КАЧЕСТВЕННЫЙ ГП

ПРЕДСТАВЛЕН ПРЕИМУЩЕСТВЕННО ОДНОНУКЛЕОТИДНЫМИ ЗАМЕНАМИ (ОНП, SNP)

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ГП

1. ПРЕДСТАВЛЕН ВАРИАЦИЯМИ ЧИСЛА ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ (**STR** – Short Tandem). 1-2 либо 3-4 нуклеотидов на повторяющуюся единицу.
2. ПОВТОРЫ ДНК МОГУТ ИМЕТЬ И БОЛЬШУЮ ПРОТЯЖЕННОСТЬ И ВАРИАБЕЛЬНУЮ ПО НУКЛЕОТИДНОМУ СОСТАВУ ВНУТРЕННЮЮ СТРУКТУРУ **VNTR** (Variable Number Tandem Repeats)
3. **CNVs** - copy number variations

ВАРИАЦИИ ЧИСЛА ПОВТОРОВ (CNVs)

В 2006 г. в журнале Nature были опубликованы результаты работы R. Redon и соавт, которые обнаружили новый тип вариаций в геноме человека – CNVs - copy number variations

Было обнаружено около 150 участков, в которых присутствовали значительные по длине (от нескольких тысяч до нескольких миллионов пар нуклеотидов) дупликации (удвоение) и делеции фрагментов ДНК.

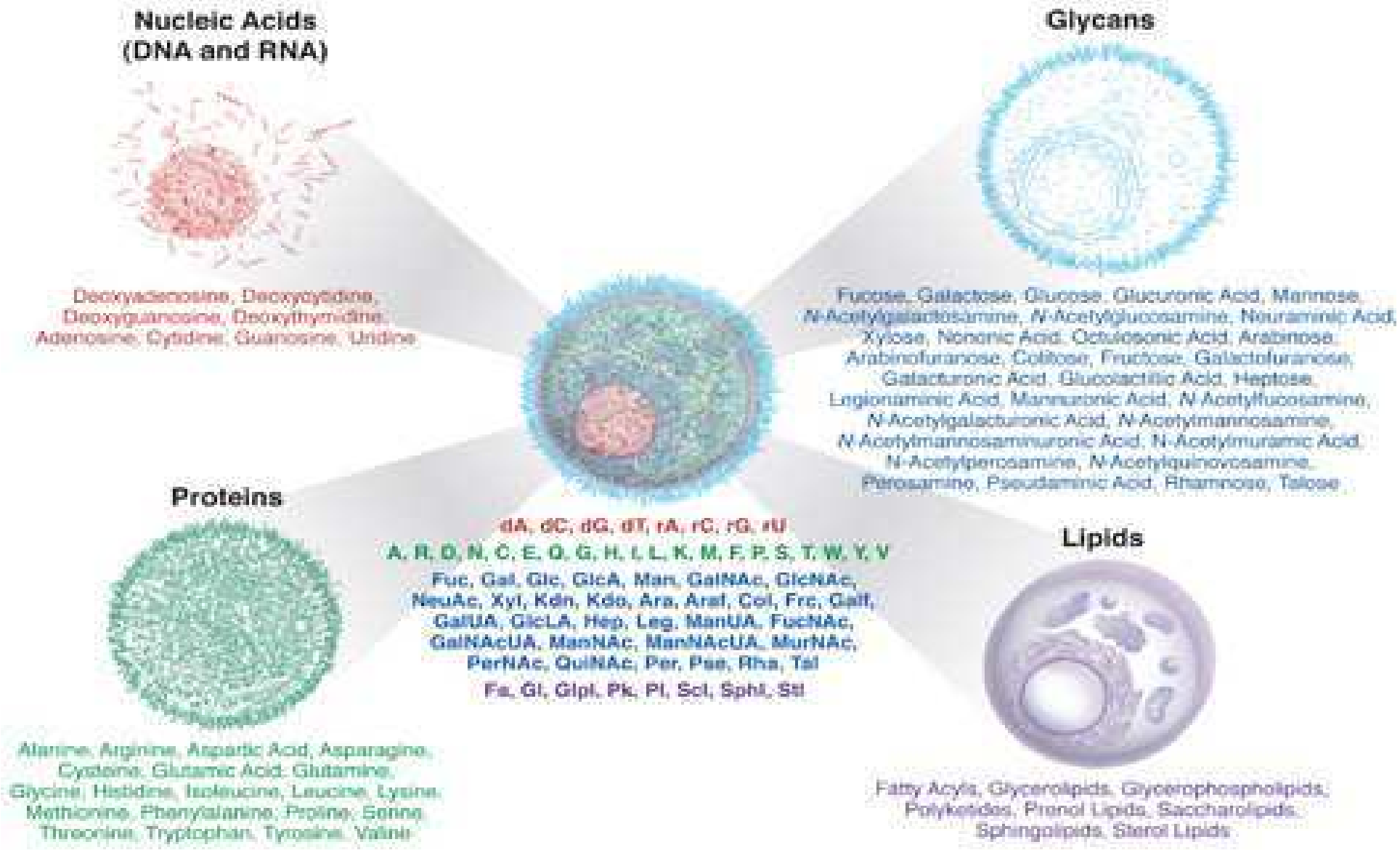
Протяженность этих участков довольно велика – в целом, по оценке авторов работы, она составляет до 12% всего генома, т.е. вклад CNVs в вариативность генома сопоставим с вкладом однонуклеотидных полиморфизмов или даже превышает его.

2.1.3. Интерактом: биохимические, протеомные, генетические биомаркеры в метаболизме железа и эстрадиола.

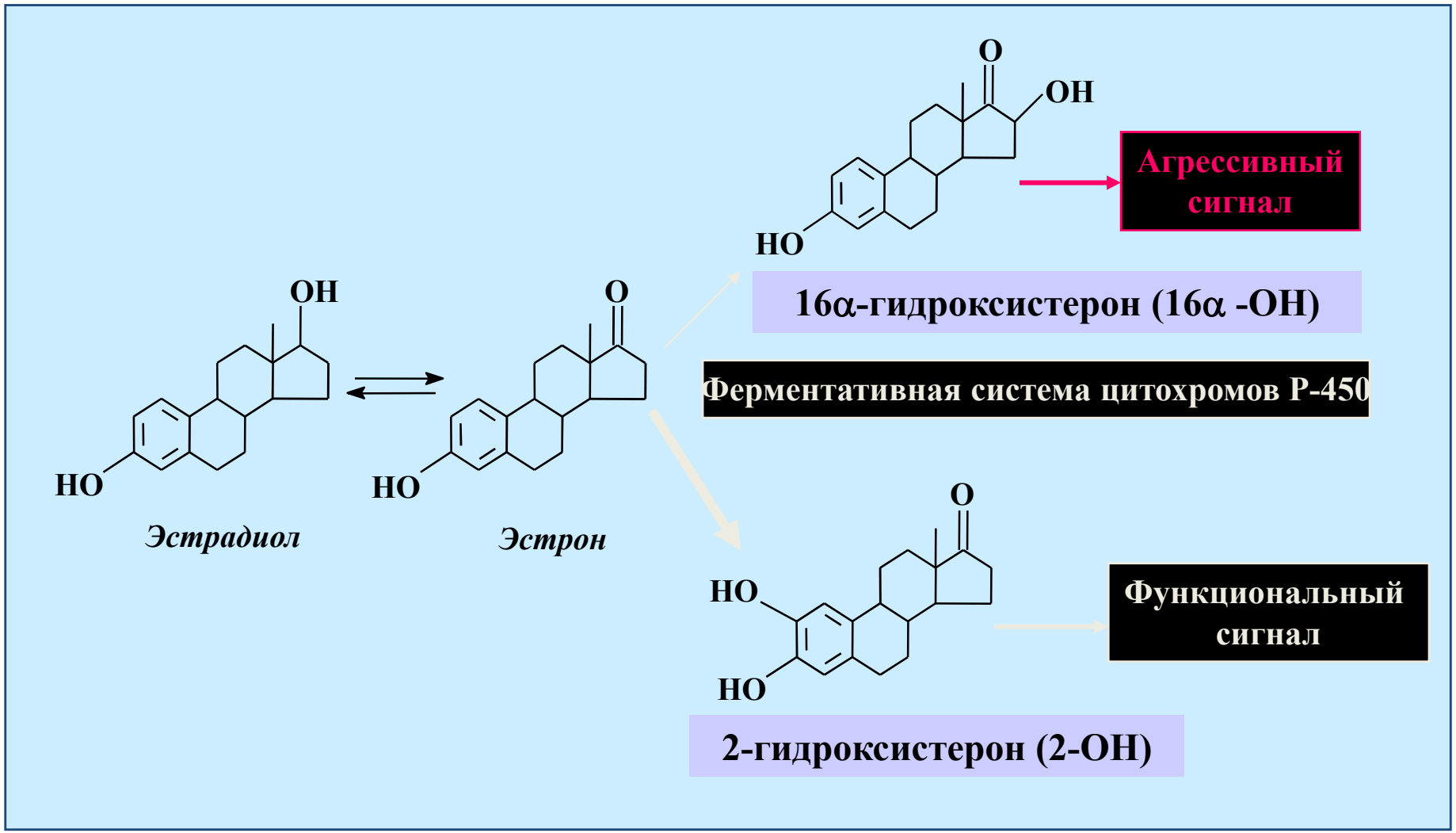
68 молекул ответственны за все заболевания человечества

Профессор Джейми Март (Jamey Marth) из университета Калифорнии в Сан-Диего (University of California at San Diego — UCSD) в публикации в журнале Nature Cell Biology утверждает, что всего лишь 68 молекул ответственны за все заболевания человечества. Март проанализировал большое количество исследований, которые были проведены в самых разных областях науки, и выяснил, что всего 68 соединений «строят» четыре фундаментальных компонента клеток (нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды и жиры).

68 молекулярных кирпичика жизни: 32 полисахарида (внутри клетки), 8 видов жиров (клеточная мембрана), 20 аминокислот и 8 нуклеозидов (ДНК/РНК) (иллюстрация Jamey Marth).

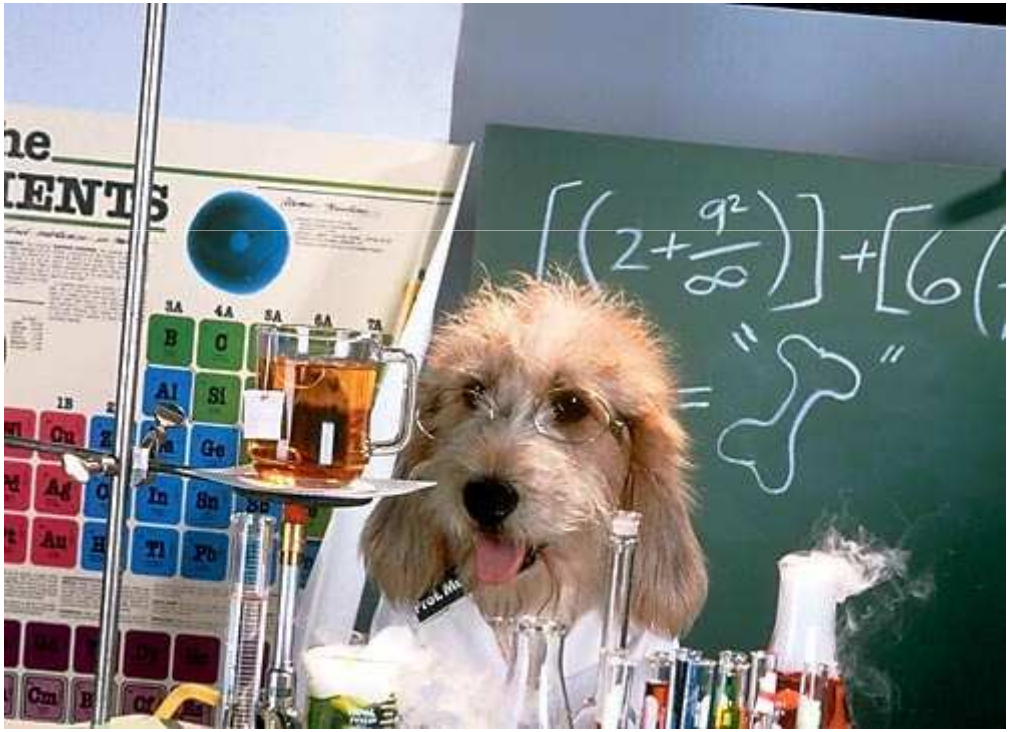


Метаболизм эстрадиола



Соотношение
метаболитов эстрадиола
16α/2-OH -
биомаркёр
развития патологической
клеточной пролиферации
в эстроген-чувствительных тканях

Лабораторные методы персонализированной медицины использующие ферментативные подходы.

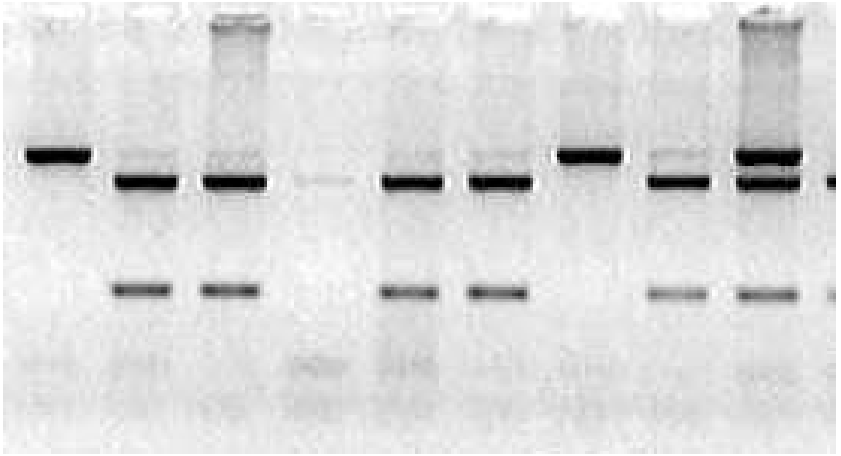


Лабораторные методы персонализированной медицины использующие ферментативные подходы.

1. Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD, AP-PCR) (ферментативный подход, поиск новых генетических вариантов
2. Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ, RFLP) (ферментативный подход, анализ известных аллелей)
3. Полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLR) (ферментативный подход, поиск новых генетических вариантов)
4. Расщепление резольвазой (EMD) (ферментативный подход, поиск новых генетических вариантов;
5. Инвазивное расщепление олигонуклеотидов Invader (ферментативный подход, анализ известных аллелей)
6. Расщепление Clevase 1 (CFLP) (ферментативный подход, поиск новых генетических вариантов);
7. Метод гетеродуплексного анализа (HA) (поиск новых генетических вариантов);

Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов

1. ПЦР-амплификация
2. Рестрикция
3. Электрофорез



Методы, основанные на различной электрофоретической подвижности полиморфных участков ДНК.

8. Анализ конформации одноцепочечных фрагментов ДНК (SSCP) (поиск новых генетических вариантов);
9. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE) (поиск новых генетических вариантов).
10. Технология закрытой нуклеиновой кислоты (LNA);
11. Технология пептида нуклеиновой кислоты (PNA);

Лабораторные методы персонализированной медицины, основанные на гибридизационном анализе нуклеиновых кислот и химических методах.

Таблица 2.

12. **Генетические микрочипы;**
13. **Сравнительная геномная гибридизация (CGH);**
14. **Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH);**
15. **Метод усиления гибридизационного сигнала на основе разветвленной ДНК;**
16. **ДНК/РНК гибридизационный захват;**
17. **Исследования метилирования ДНК.**

Химические методы:

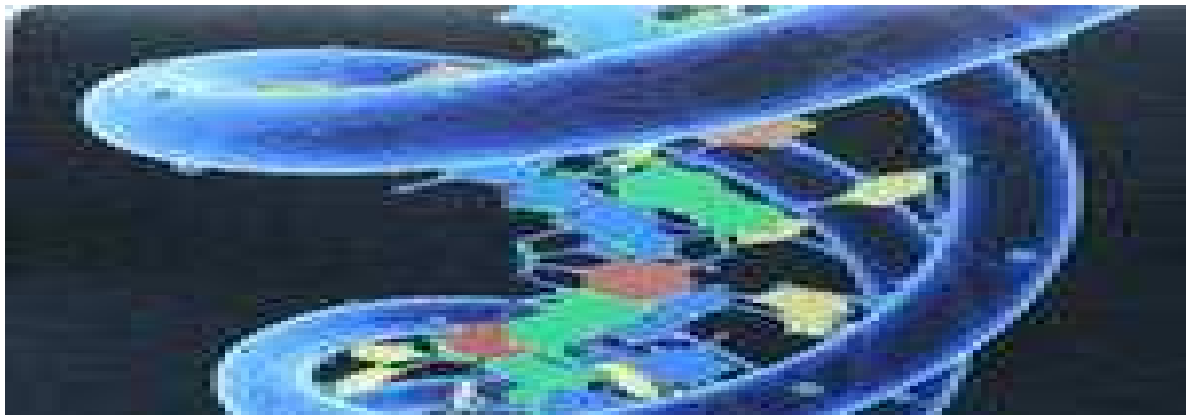
18. **Метод химического расщепления некомплементарных сайтов (CMC)**
19. **Химическое расщепление гетеродуплексов (поиск новых генетических вариантов);**
20. **Химическое лигирование;**
21. **Токсикогеномика.**

Фундаментальный принцип молекулярной биологии:

Существование КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ взаимодействий между молекулами НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ создает основу для разработки ГИБРИДИЗАЦИОННЫХ, ПЦР-технологий и микробиочипов для молекулярного анализа геномов.

Возможно образование комплексов между ДНК и РНК:

ДНК/ДНК или ДНК/РНК или РНК/РНК



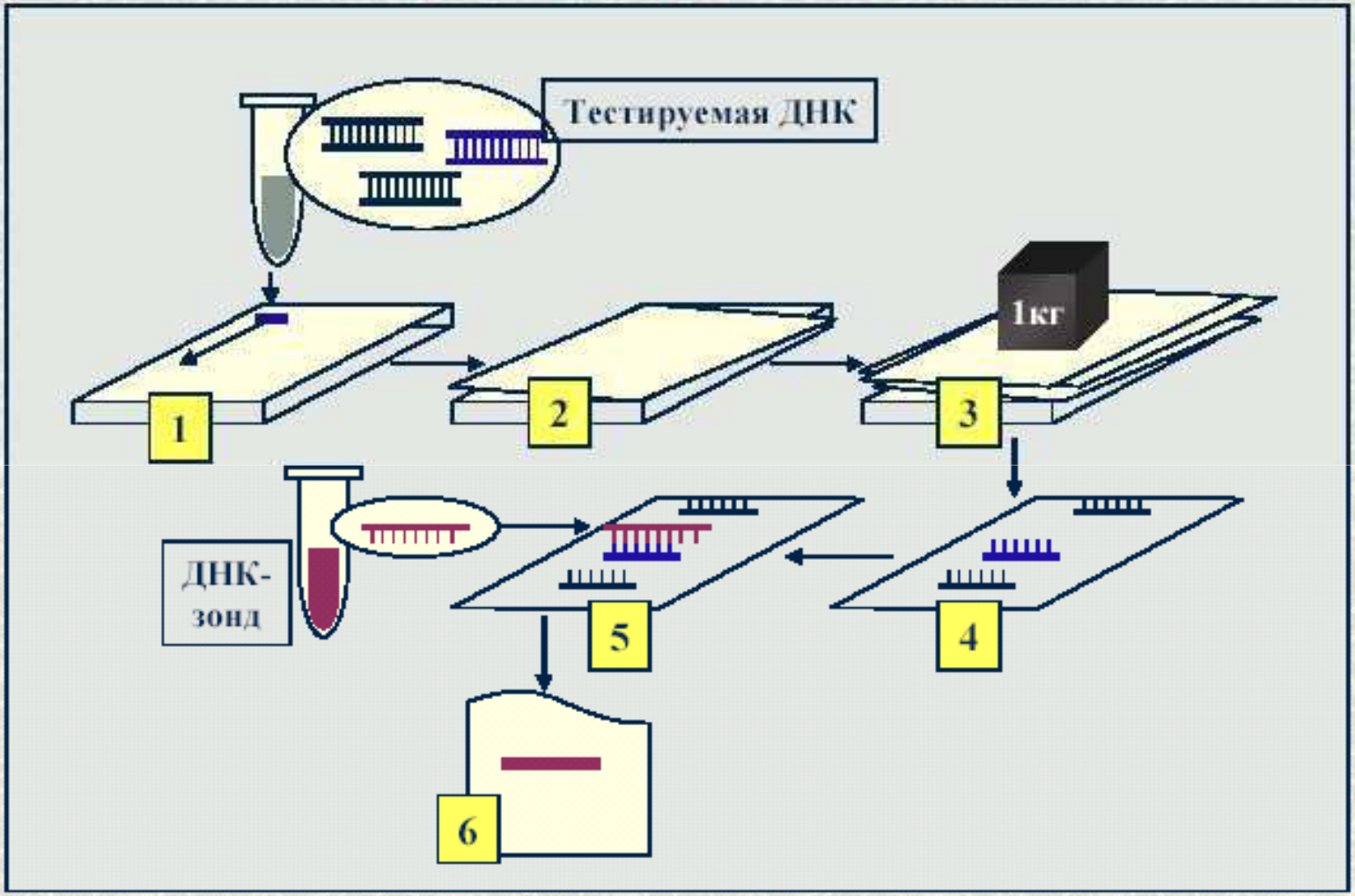
Метод гибридизационного анализа

Метод гибридизационного анализа позволяет идентифицировать специфические нуклеотидные полиморфизмы в сложных смесях с использованием меченной ДНК -зонда для поиска искомой последовательности НК.

ДНК-зонд это любая однонитевая ДНК ограниченного размера, используемая для поиска комплементарных НП в молекуле большего размера или среди пула разнообразных молекул ДНК.

Гибридизация in situ проводится с мечеными ДНК или РНК-зондами на гистологических или хромосомных препаратах (FISH: вариант метода, при котором в качестве зондов используются препараты ДНК или РНК, меченные флюорохромами).

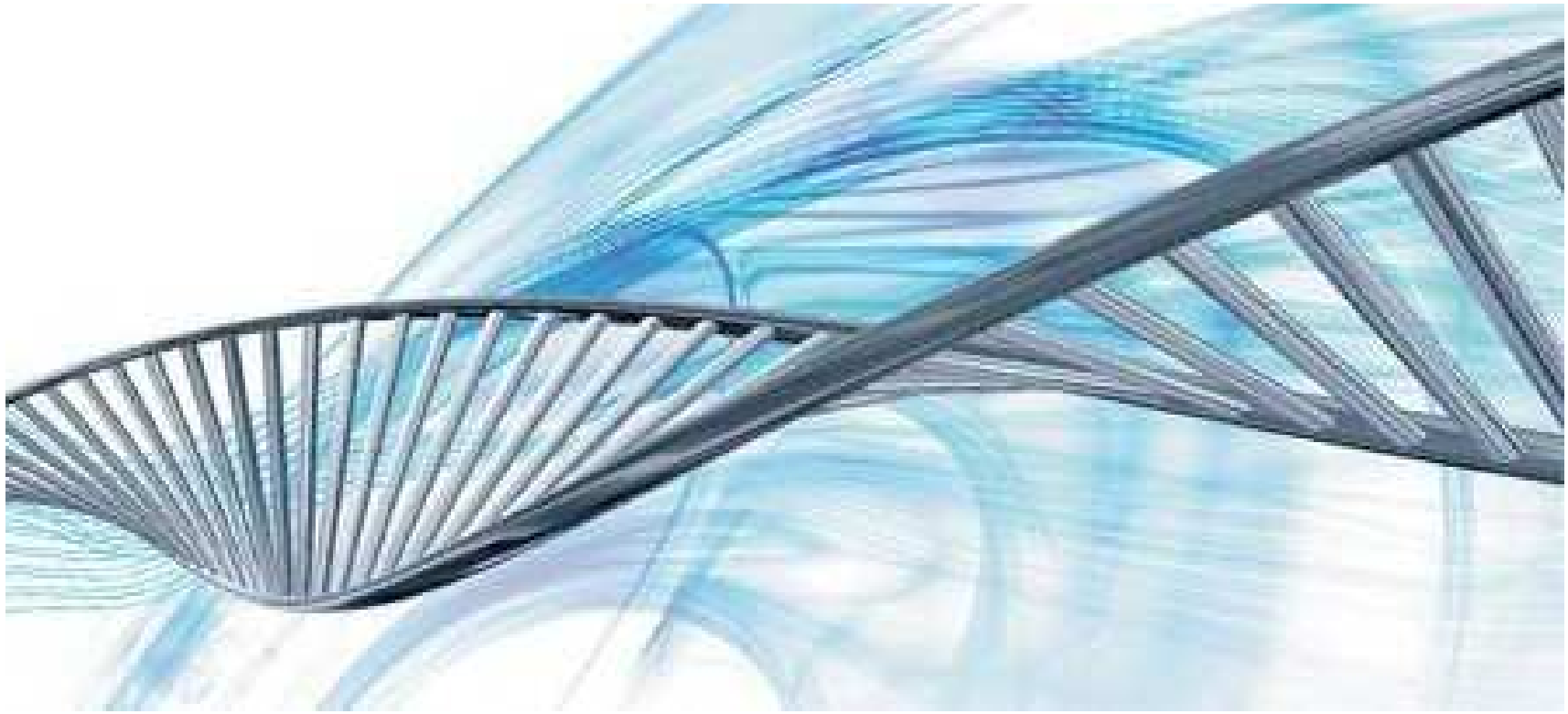
ДЕТЕКЦИЯ ДНК В ПРОБЕ МЕТОДОМ ДНК-ГИБРИДИЗАЦИИ
(начиная с 1970 года)



1. - разделение молекул, присутствующих в пробе нуклеиновых кислот, методом электрофореза,
2-4. – перенос отдельных фракций на другой твердый носитель,
5. - нанесение ДНК-зонда, специфическое связывание с искомой ДНК,
6. – регистрация образовавшегося комплекса

3.2. Полимеразная цепная реакция.

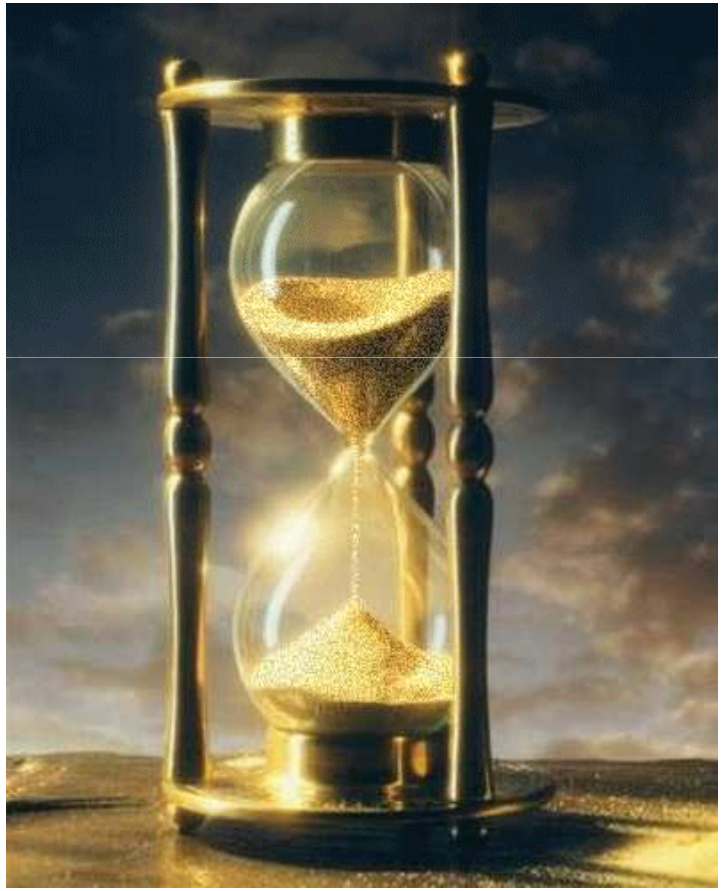
3.2.3. Основные типы и модификации ПЦР.



Полимеразная цепная реакция

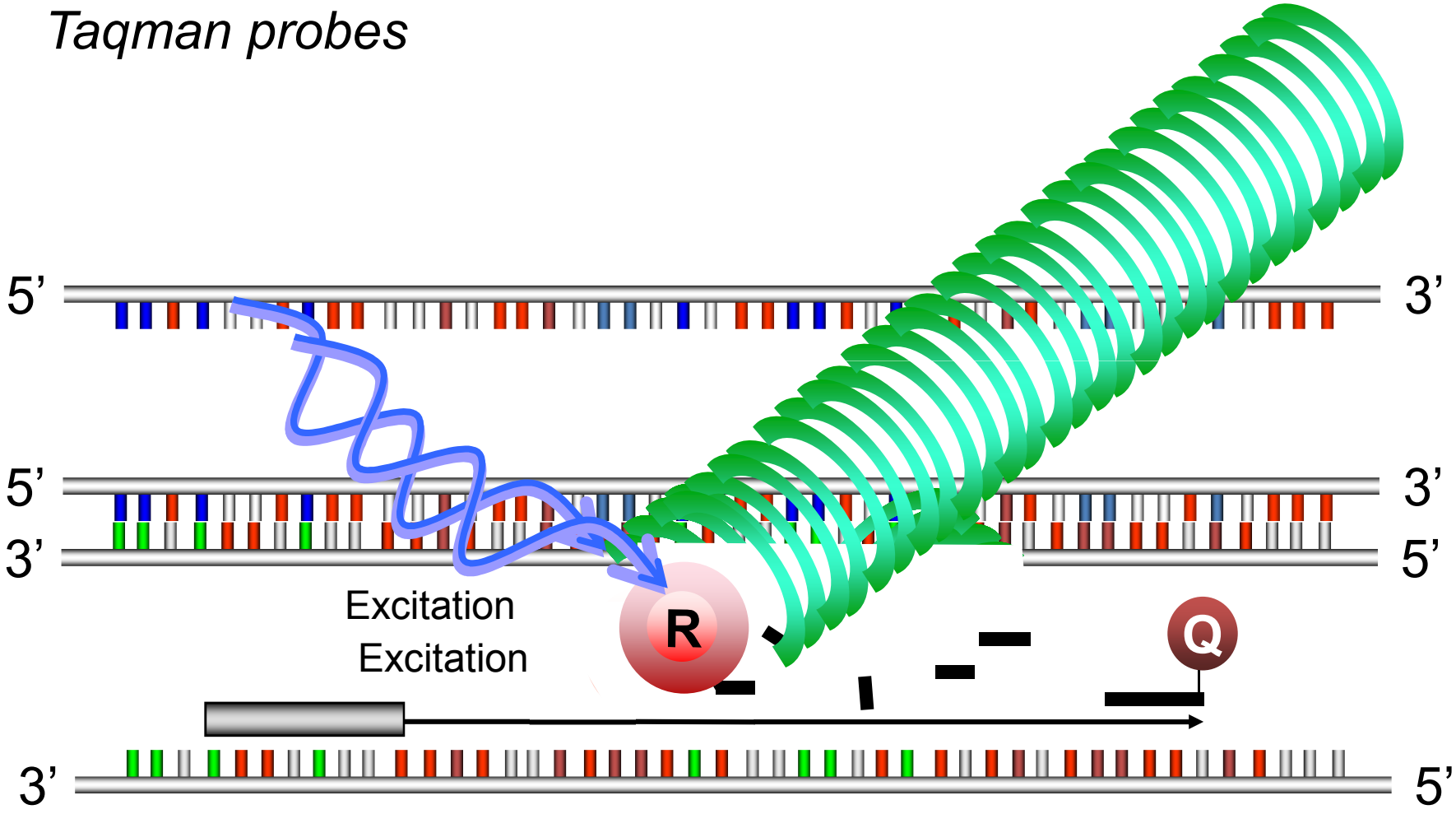
- **ПЦР сопряженная с обратной транскрипцией**
- **Гнездовая ПЦР**
- **ПЦР in situ**
- **Количественная ПЦР**
- **Мультипраймерная ПЦР**
- Ассиметричная ПЦР
- ПЦР с «горячим стартом»
- Амплификация больших фрагментов ДНК с высокой точностью
- Аллель-специфическая ПЦР
- ПЦР, чувствительная к метилированию матрицы
- Иммуно-ПЦР

ПЦР с детекцией в режиме реального времени.



Sequence Specific Probes:

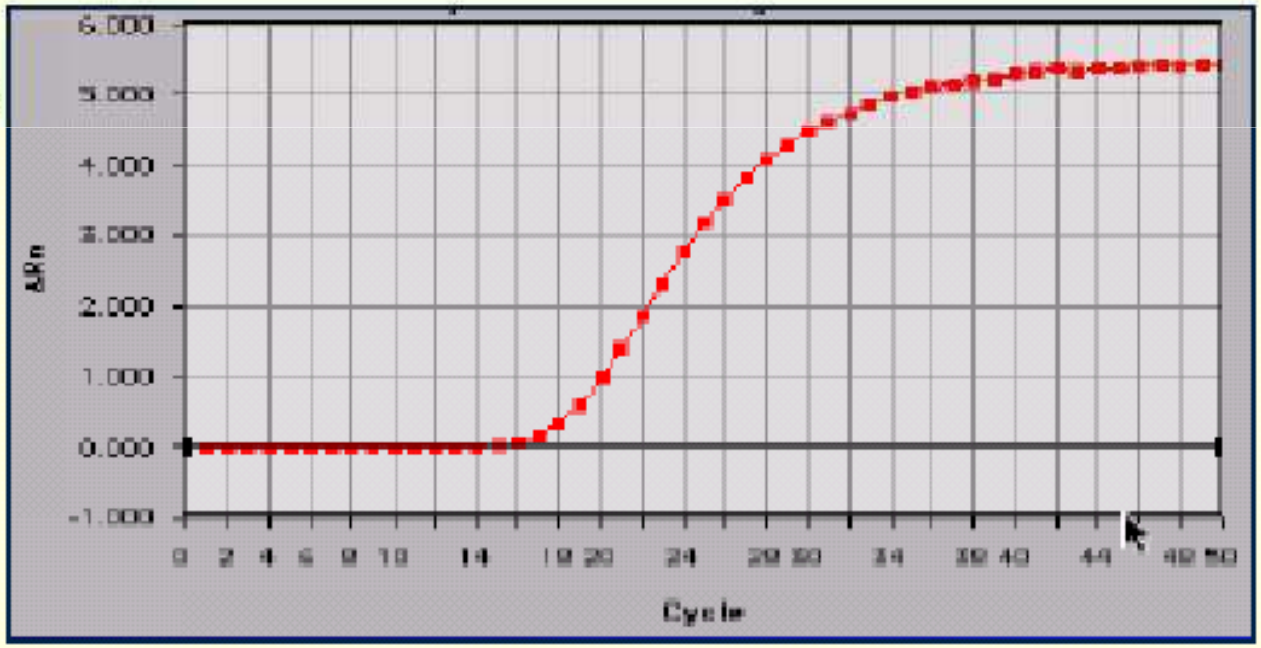
Taqman probes



КИНЕТИКА ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

- Детекция «ассоциированной с амплификацией флюоресценции» в каждом цикле ПЦР
- Не нужно проводить анализ ПЦР-продуктов методом геля-электрофореза после завершения ПЦР
- Возможность использования компьютерного анализа в каждом цикле ПЦР

Увеличение флюоресценции



Циклы ПЦР

Тест-системы для определения SNPs: F2 *G20210A*, F5 *G1691A*, MTHFR *C677T*

Коагуляционный фактор II или F2 свертывания крови. В ходе ферментативного расщепления протромбина образуется тромбин. Полиморфизм ***G20210A*** приводит к увеличению уровня протромбина в 1,5-2 раза выше, чем в норме. Мутация – по аутосомно-доминантному типу. Тромбофилия возникает даже у гетерозиготного носителя измененного гена! Часто встречается в сочетании с мутацией Лейден.

Коагуляционный фактор V или F5 свертывания крови - белковый кофактор при образовании тромбина из протромбина. Полиморфизм ***G1691A*** Leiden («мутация Лейден») - показатель риска развития венозных тромбозов, придает устойчивость активной форме фактора V к расщепляющему действию специализированного регулирующего фермента, С-белка, что приводит к гиперкоагуляции. Риск образования тромбов повышается.

Метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR) - ключевая роль в метаболизме фолиевой кислоты. Полиморфизм ***C677T*** приводит к нарушению фолятного метаболизма и повышенному уровню гомоцистеина => развитию тромбообразования и кардиоваскулярных заболеваний.

ТЕХНОЛОГИЯ БИОЧИПОВ

НА ОСНОВЕ РАЗВИТИЯ НЕРАДИОИЗОТОПНОГО ГИБРИДИЗАЦИОННОГО, АМПЛИФИКАЦИОННОГО АНАЛИЗА И ДРУГИХ СОВРЕМЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ РАЗРАБОТАНЫ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОЧИПЫ

Основная доля производимых в настоящее время биочипов приходится на ДНК-чипы, то есть матрицы, несущие молекулы ДНК (94 процента, оставшиеся 6 процентов составляют белковые чипы):

- **ВЫЯВЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННЫХ АГЕНТОВ И ИХ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫХ ФОРМ**
- **ПОЛИМОРФИЗМ ПО ЕДЕНИЧНЫМ НУКЛЕОТИДАМ**
- **ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ**

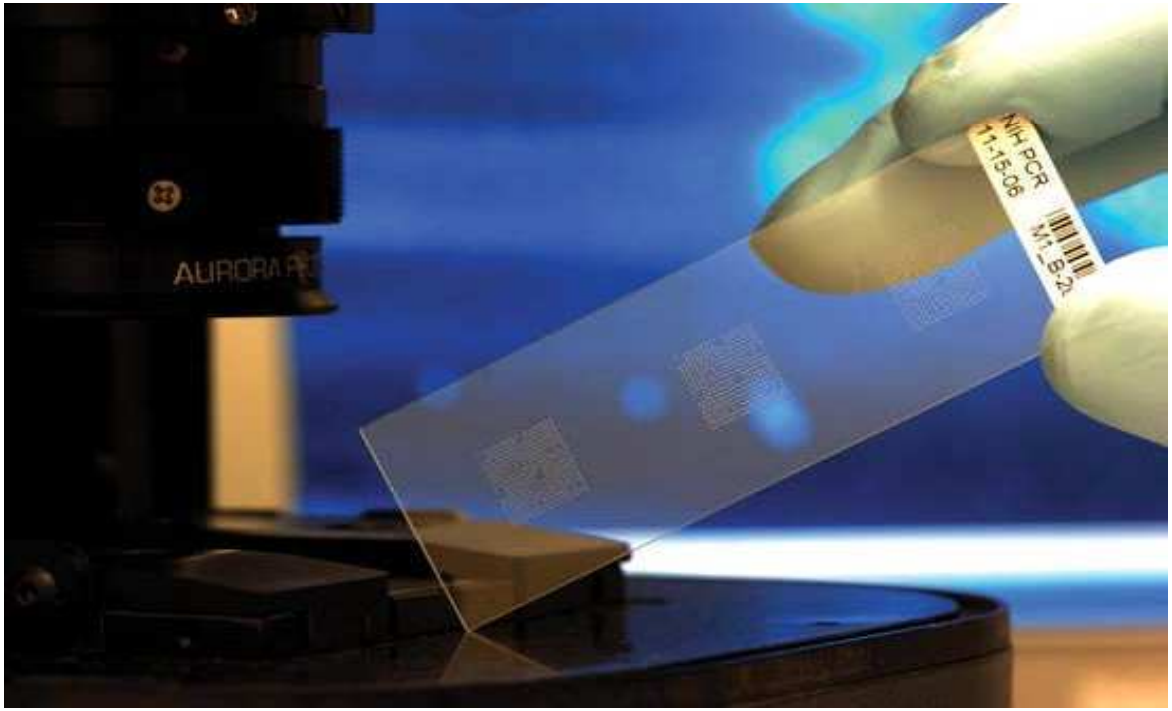
УКАЗАННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ЯВЛЯЮТСЯ САМЫМИ ВАЖНЫМИ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ,

И ИМЕЮТ НЕПОСРЕДСТВЕННОЕ ОТНОШЕНИЕ К ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ.

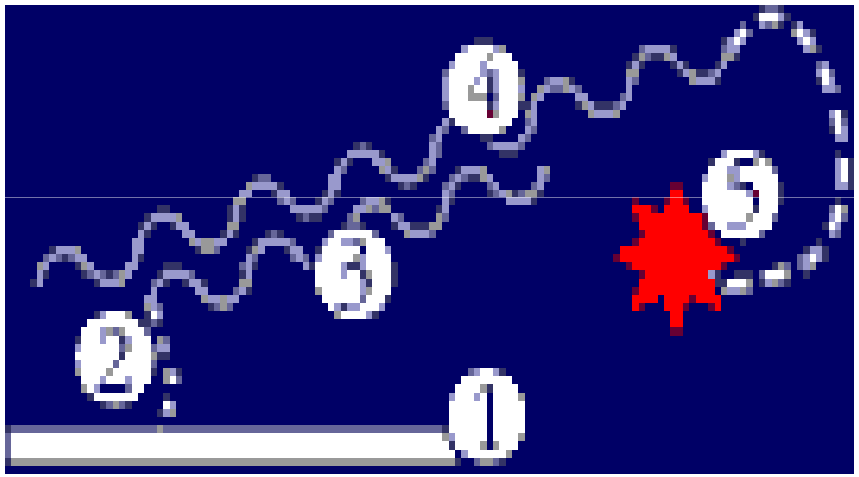
Классификация микробиочипов:

- по биомаркерам (зондам), которые иммобилизуют на поверхность платформы (стекло, полимерные материалы, металлы, мембраны и др.) разделяют четыре основных вида биочипов: ДНК, РНК, белковые и клеточные. Кроме того, могут использоваться олигонуклеотиды, полисахариды, низкомолекулярные лиганды и др.;
- по применяемым технологиям: матричная архитектура, гели, микрофлюидные (или капиллярные) и микросферы с цветовой кодировкой, квантовые точки и др.;
- по области использования универсальные или специализированные для определенных медико-биологических задач или заболеваний;
- по технологии нанесения биомаркеров: готовые олигонуклеотидные зонды или синтезируемые на поверхности биочипа;
- по способу регистрации: радиоизотопные, нерадиоизотопные, оптические, люминесцентные, хемилюминесцентные, электрохимические и др. методы детекции сигнала.

4.1. Молекулярно-генетические и технологические методы, лежащие в основе создания микробиочипов для анализа нуклеиновых кислот.



Взаимодействие флуоресцентно-меченного образца с иммобилизованным зондом

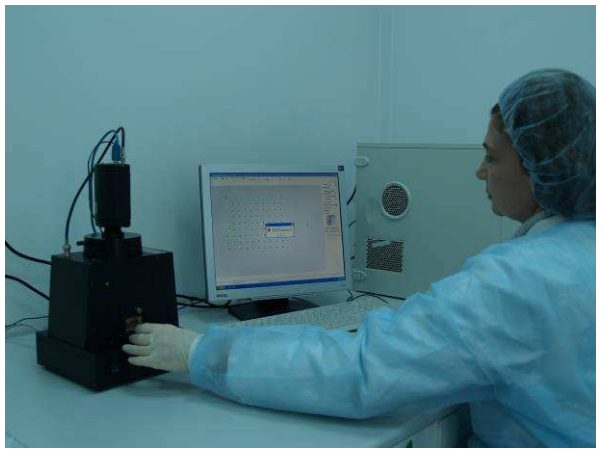


1. подложка
2. линкер для иммобилизации зонда
3. зонд
4. анализируемый образец
5. флуоресцентная метка

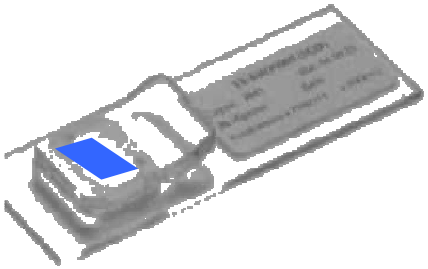
Институт молекулярной биологии РАН,
Центр биологических микрочипов,
Москва

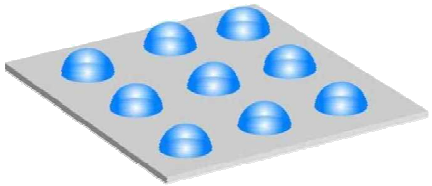
А.Д. Мирзабеков

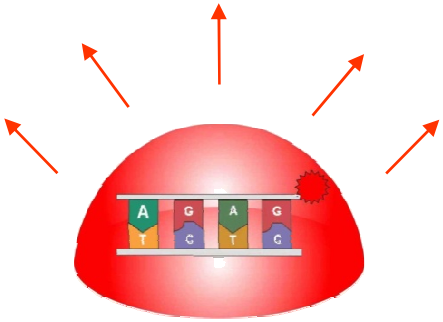
ПРОИЗВОДСТВО БИОЧИПОВ В ИМБ РАН.
СУЩЕСТВУЮЩИЕ МОЩНОСТИ ПОЗВОЛЯЮТ ПРОИЗВОДИТЬ ДО 4000 БИОЧИПОВ В ДЕНЬ. НЕСКОЛЬКО СТАДИЙ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА



Биологические микрочипы на основе гидрогеля







Преимущества:

- **Высокая емкость благодаря иммобилизации биомолекул в трехмерной структуре геля**

- **Гомогенное водное окружение в геле**

- **Гелевый элемент биочипа используется как индивидуальная пробирка объемом в доли нанолитра для проведения различных химических и ферментативных реакций**

- **Универсальность в изготовлении ДНК, белковых и клеточных микрочипов**

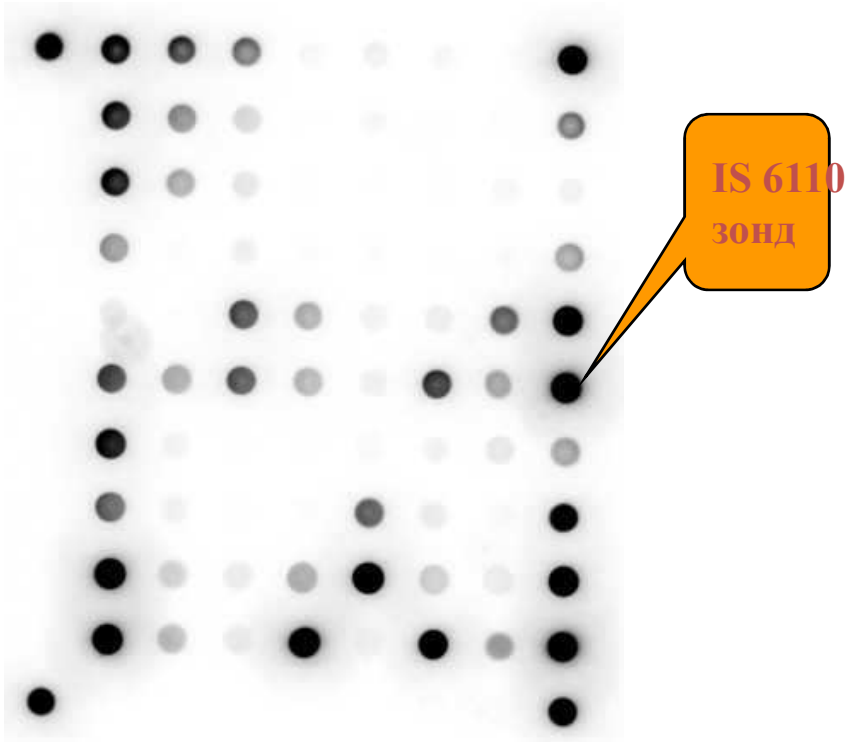
- **Низкая стоимость биочипов и их анализаторов и доступность массовому потребителю**

Анализатор биочипов

- Универсален для все типов биочипов, выпускаемых в ИМБ РАН
- Высокая чувствительность и скорость работы
- Дружественный интерфейс ПО
- Прошел клинические испытания и зарегистрирован в Росздравнадзоре (Рег. удостоверение ФС 022а2006/3777-06)

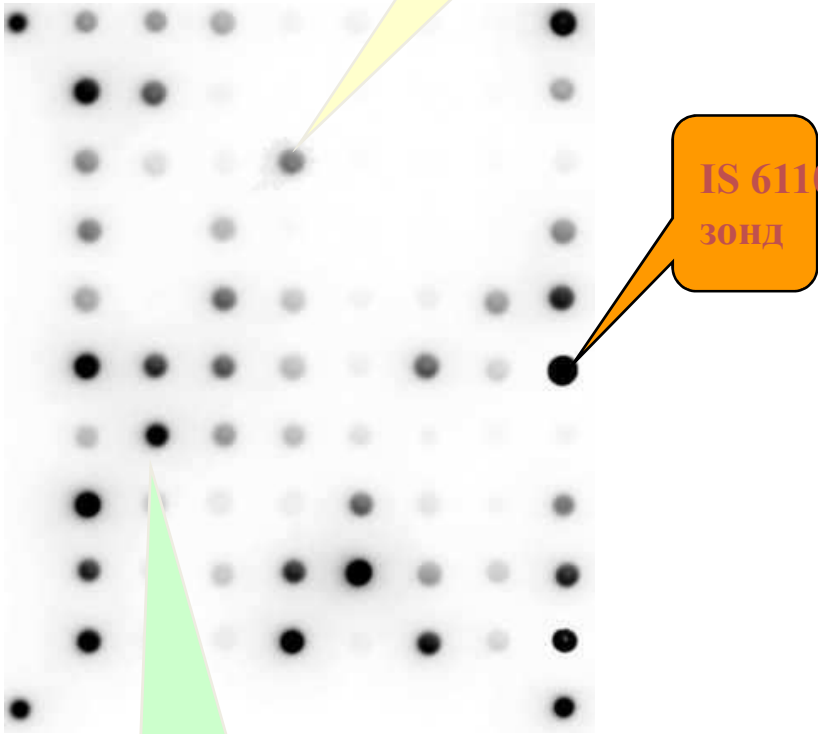
Результат анализа ДНК штаммов *M. tuberculosis* с использованием ТБ-БИОЧИП

ДНК «Дикого типа»



Обычная терапия

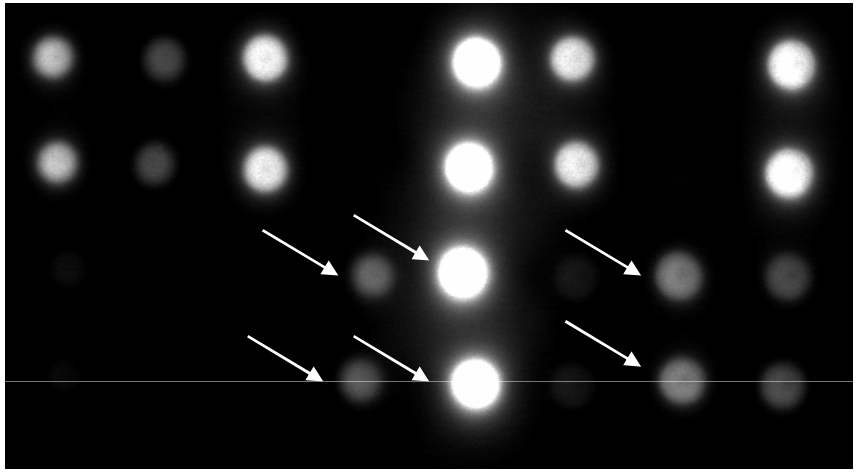
ТБ с МЛУ



Терапия вторым рядом ПТП

Кардио-Биочип

(Гены: AGT, REN, AGTR1, AGTR2, BKR2, MTHFR, ADRB2)

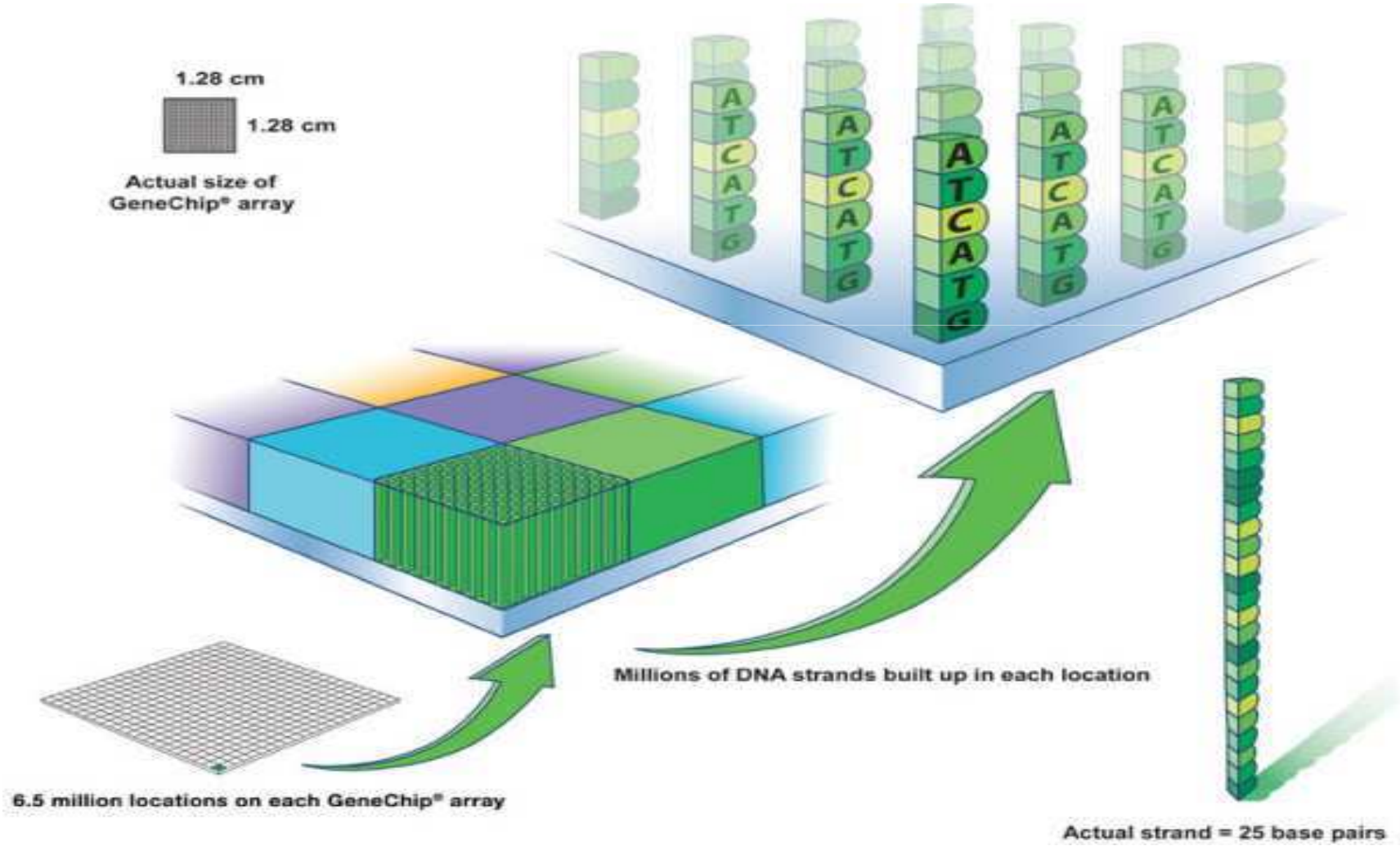


Генотип:

REN -83G>A функция фермента не изменена (G/G)
AGT M235T функция фермента не изменена (M/M)
AGTR1 1166A>C функция фермента не изменена (A/A)
AGTR2 3123C>A (A/A)
BKR2 -58T>C (T/C)
MTHFR 677C>T функция фермента не изменена (C/C)
ADRB2 48A>G (G/G)
ADRB2 81C>G функция фермента не изменена (C/C)
Повышенный риск артериальной гипертензии.

4.1.1. МАТРИЧНЫЕ МИКРОБИОЧИПЫ С ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ДНК

Фотолитография олигомеров на твердую подложку



Преимущества Affymetrix

Высокая плотность = полное покрытие аннотированных генов и ОНП

- Максимально полное покрытие базы генов RefSeq многочисленными независимыми зондами
- Последние и полные версии ОНП баз данных
- До 10 млн. отдельных зондов на ОНП типе

Высокая воспроизводимость данных

Высокая специфичность связывания молекул

- Оптимальная длина зонда в 25 олигонуклеотидов позволяет уменьшить вероятность неспецифической гибридизации

Методическая и техническая поддержка пользователя

- Развитые сервисы для анализа и обработки данных

Широкая линейка систем

- Genome-Wide Human SNP Array 6.0: 1,8 млн маркеров: 906000 ОНП и 946000 для детекции вариаций числа копий (CNV)

МИКРОБИОЧИПЫ НА ЗАКАЗ

В биочипе CombiMatrix синтез олигонуклеотидов осуществляется на полупроводящей платформе фосфорамидитной химией под электронным контролем . Главным преимуществом указанной платформы является ее гибкость, так как чип можно создавать по запросу небольших лабораторий (чип Affymetrix требует финансовых ресурсов например, создание новой фотолитографской маски).

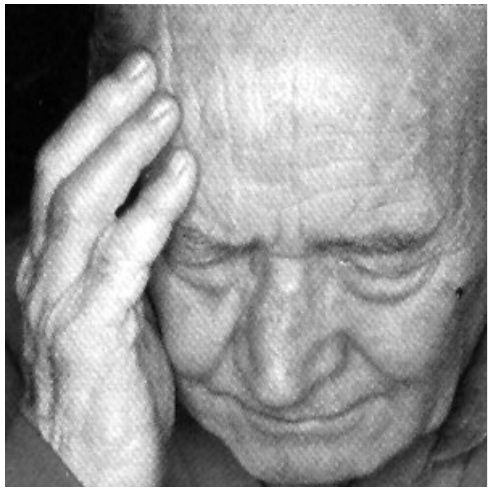
Ряд фирм делают на заказ сами биочипы: самые известные из них Affymetrix и Clontech. Компания Incyte кроме изготовления биочипа на заказ и продажи генетического материала для печати на чип, сама выполняет и гибридизацию, а заказчику предоставляет только готовые данные. Возник рынок приготовления специально обработанных стекол для приготовления биочипов в условиях отдельной молекулярно-биологической лаборатории (Corning).

4.1.2. ЭКСПРЕССИОННЫЕ МИКРОБИОЧИПЫ

КАЖДЫЙ ЧЕЛОВЕК ОТЛИЧАЕТСЯ ОТ ДРУГОГО

И С КАЖДЫМ ДНЕМ ОТЛИЧАЕТСЯ САМ ОТ СЕБЯ

А. ПАП



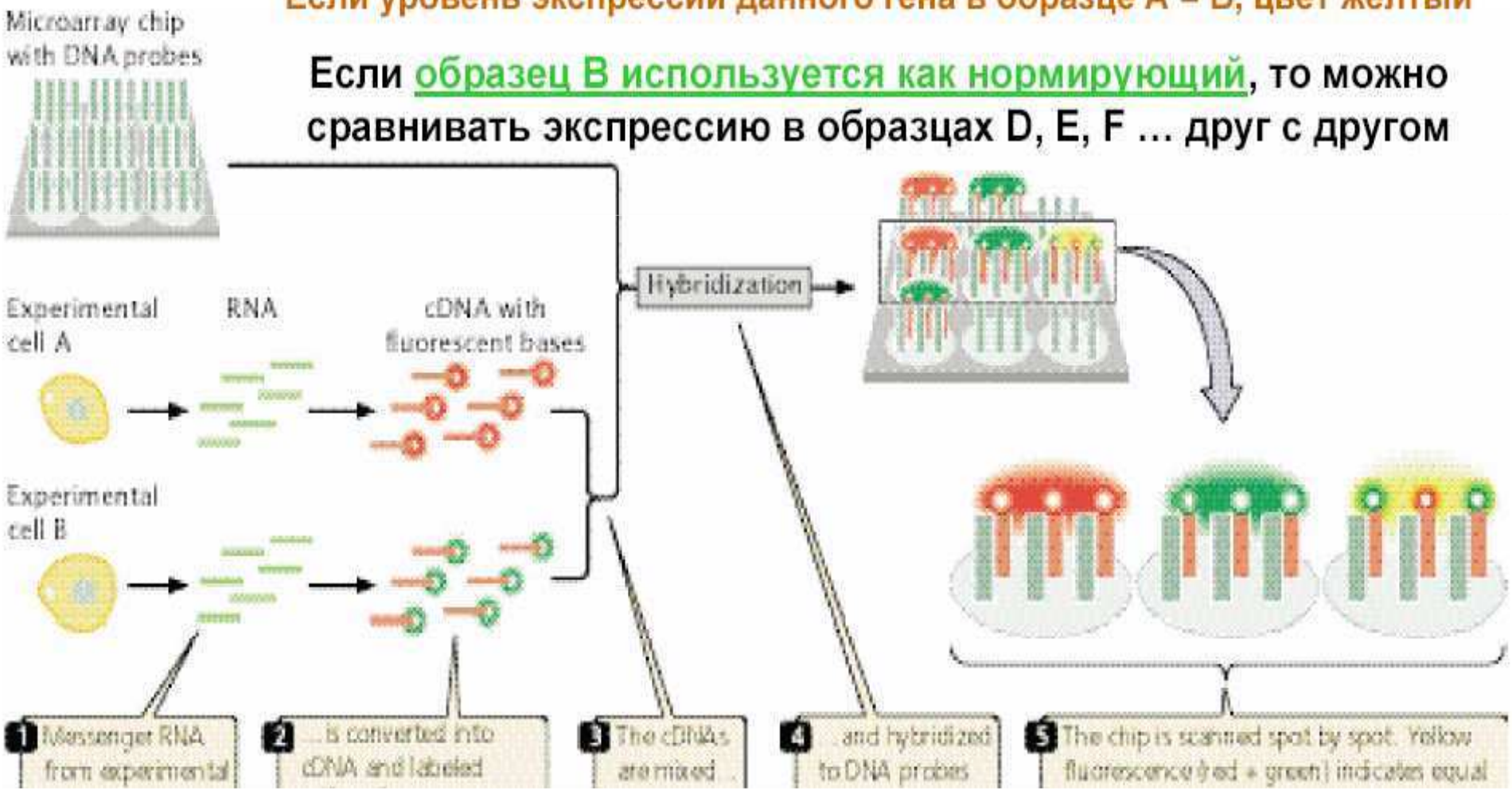
Биологические микрочипы выявляют наличие и относительный уровень экспрессии в клетках различных типов (например, печень – почки, норма – опухоль, зародыш – взрослый организм)

Если уровень экспрессии данного гена в образце A > B, цвет красный

Если уровень экспрессии данного гена в образце A < B, цвет зеленый

Если уровень экспрессии данного гена в образце A = B, цвет желтый

Если образец B используется как нормирующий, то можно сравнивать экспрессию в образцах D, E, F … друг с другом



ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ С ТЕЧЕНИЕМ ВРЕМЕНИ

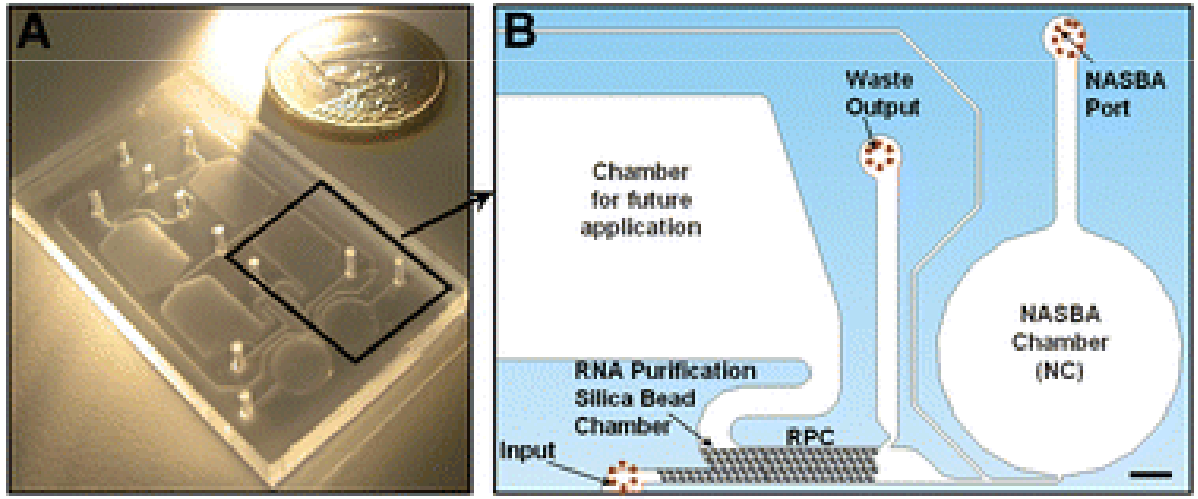
ЭКСПРЕССИОННЫЕ БИОЧИПЫ

Ученые Стэндфордского университета (США) исследовали экспрессию генов тканей почек у 74 человек в возрасте от 27 до 92 лет и соотносили с процессами изменения функций почек в процессе старения организма.

Использовали около 33 тыс. нуклеотидных последовательностей. Выяснилось, что 985 генов в почечных тканях изменяют свою активность на протяжении жизни. Из них с возрастом 742 гена увеличивают экспрессию, а 243 уменьшают.

Некоторые люди имели несоответствующих возрасту активность генов. У одних почечная ткань была слишком стара для молодого возраста, у других еще молода для старости.

Биочипы на основе микрофлюидомных технологий



History of Fluidigm

1999 - Founding of Fluidigm to commercialize Integrated Fluidic Circuit (IFC) technology

2006 - Launch of BioMark™ Real-time quantitative PCR System and 48.48 Dynamic Array™ IFCs

ВОЗМОЖНЫЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
BioMark

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ОТДЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

ОНП АНАЛИЗ

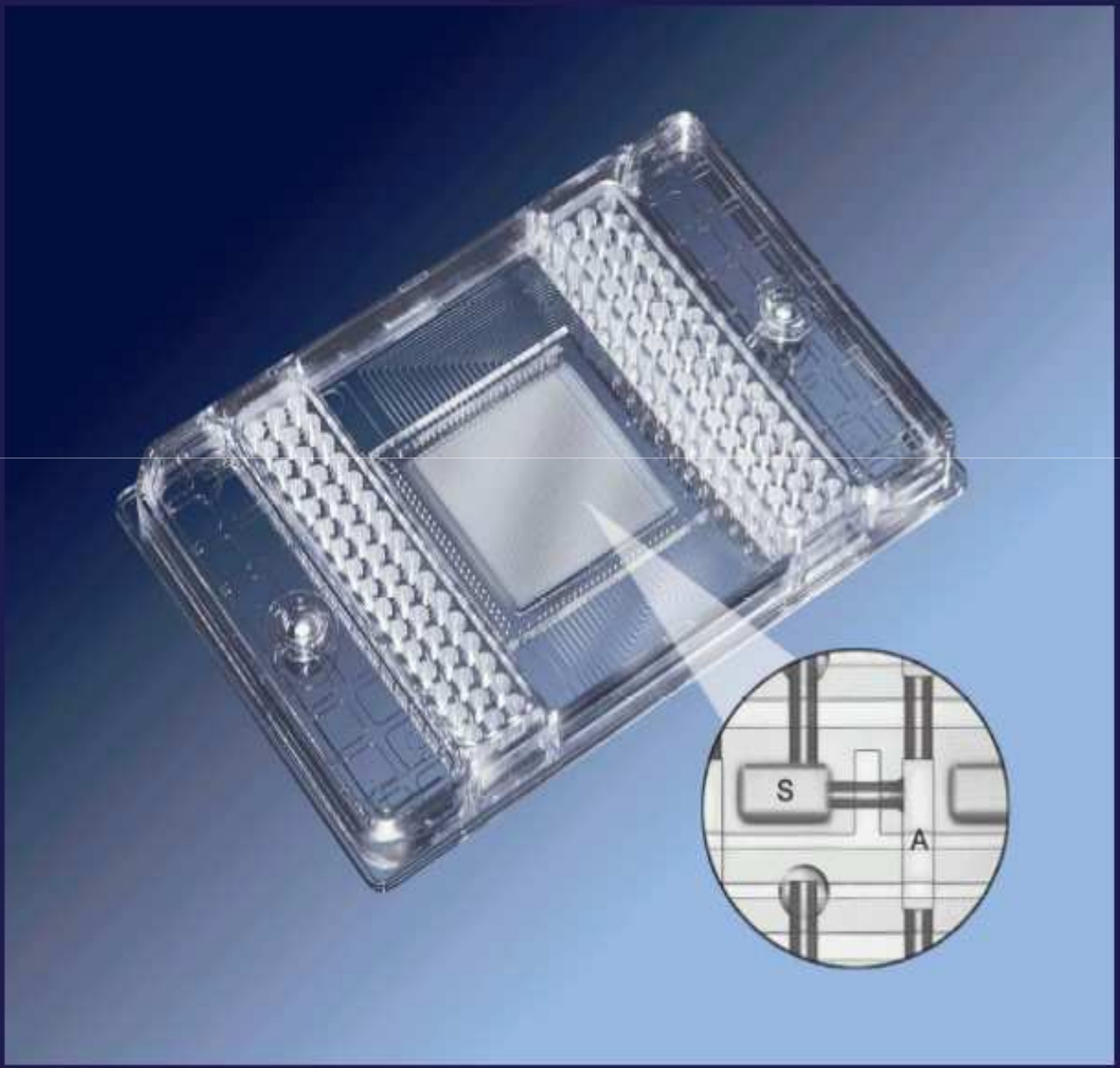
CNV АНАЛИЗ

ДНК СИКВЕНС

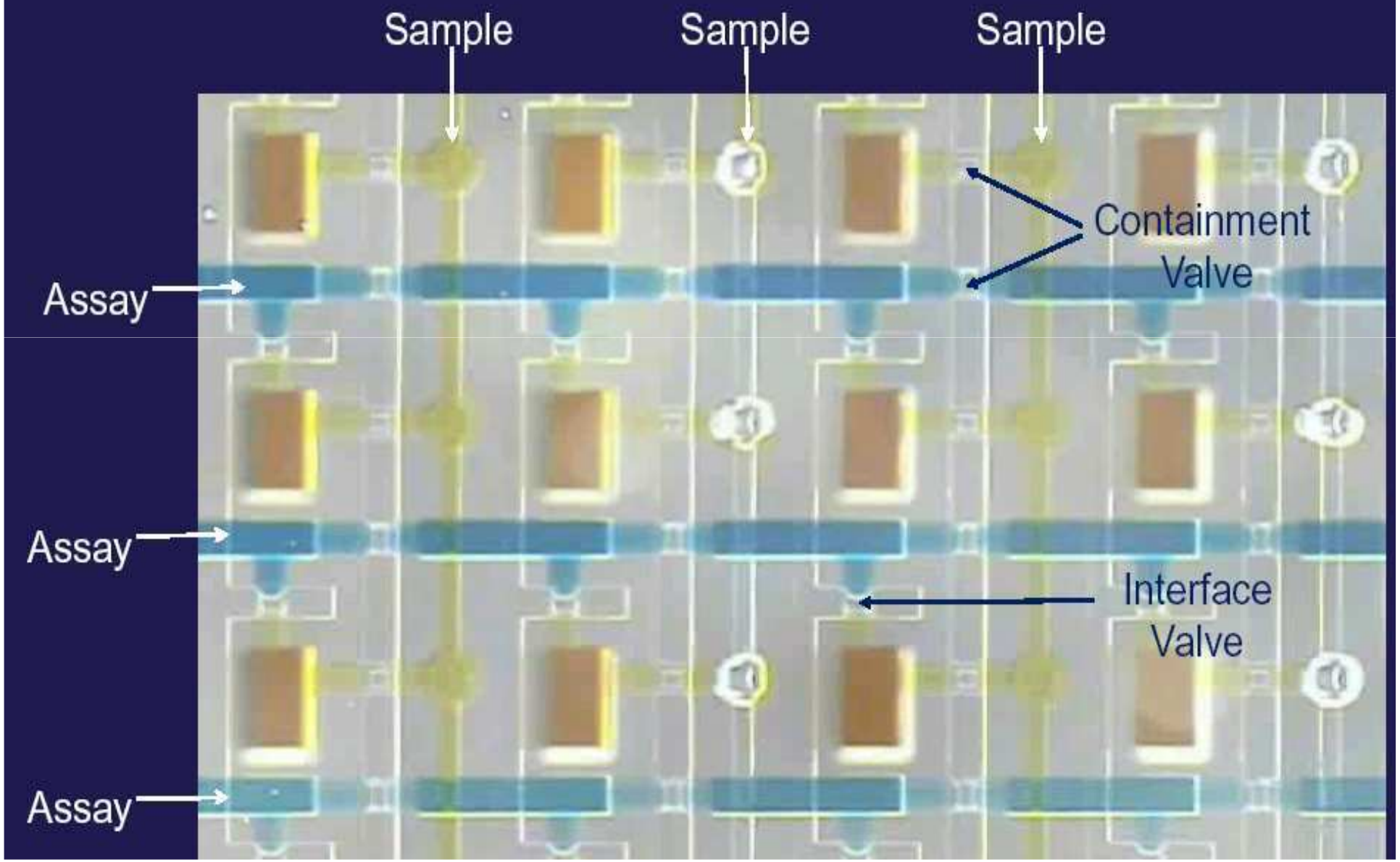
<u>ОТКРЫТАЯ СИСТЕМА</u>:

TaqMan, Roche UPL, интеркалирующие красители

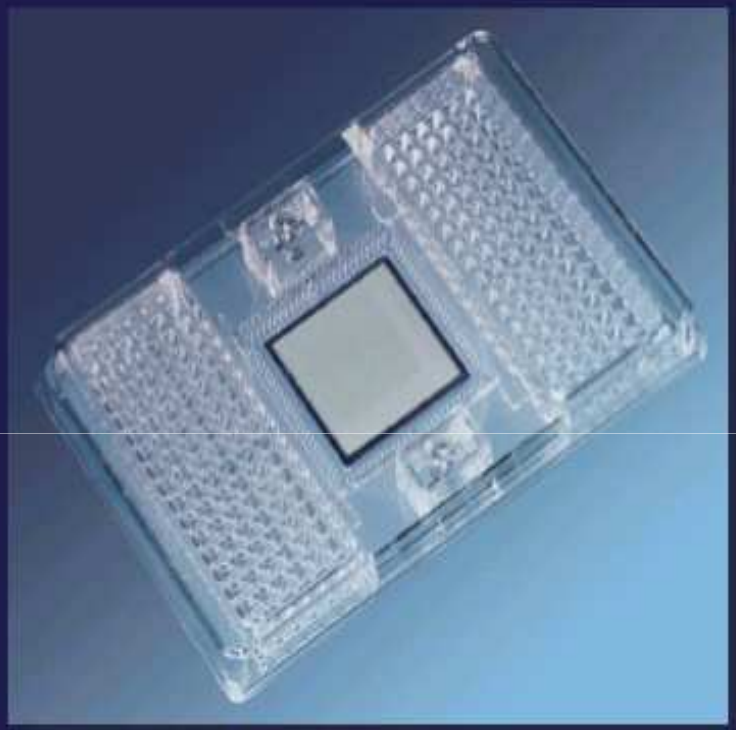
The Dynamic Array™ Architecture



Dynamic Array



96.96

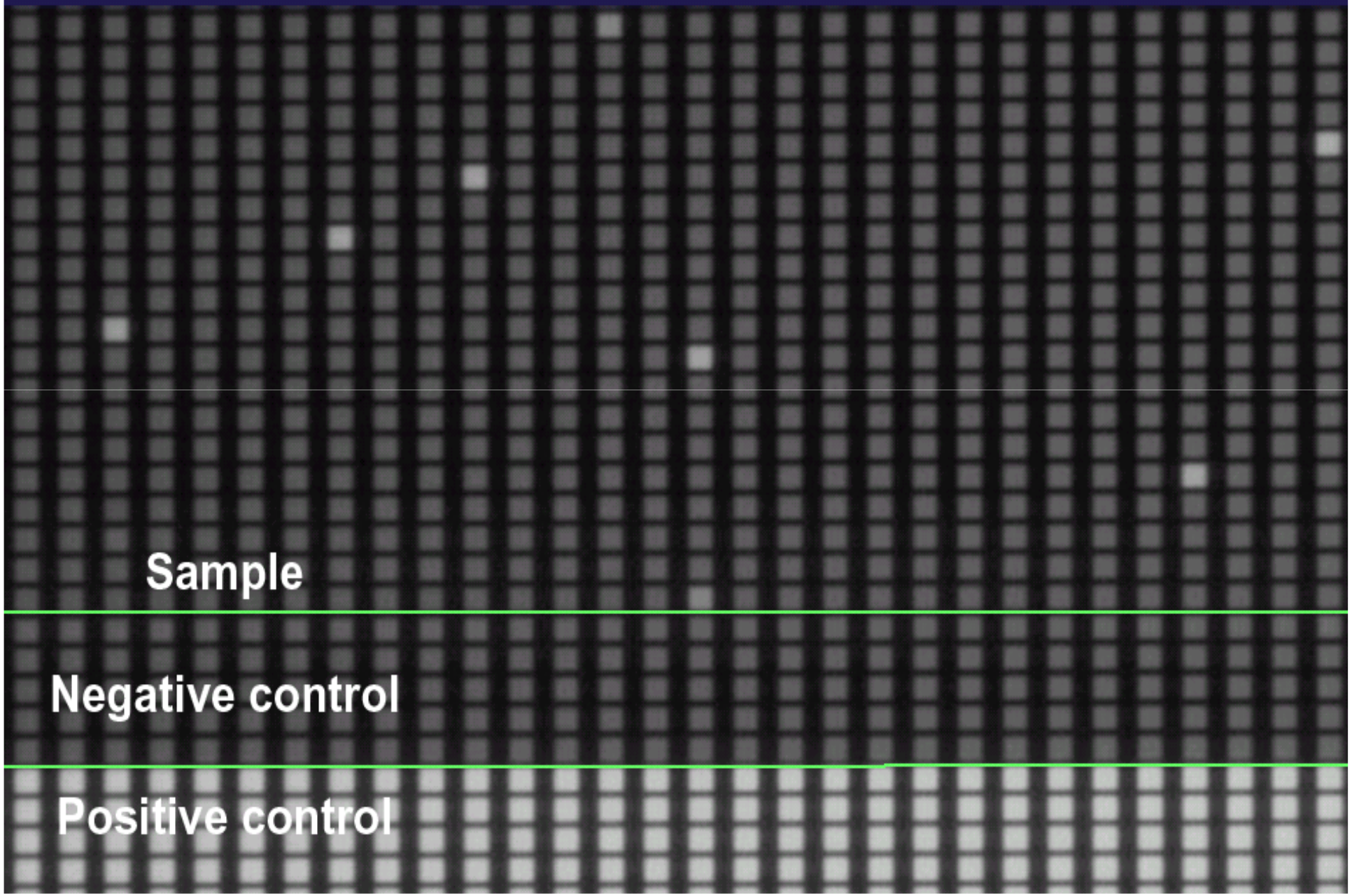


9,216 data points

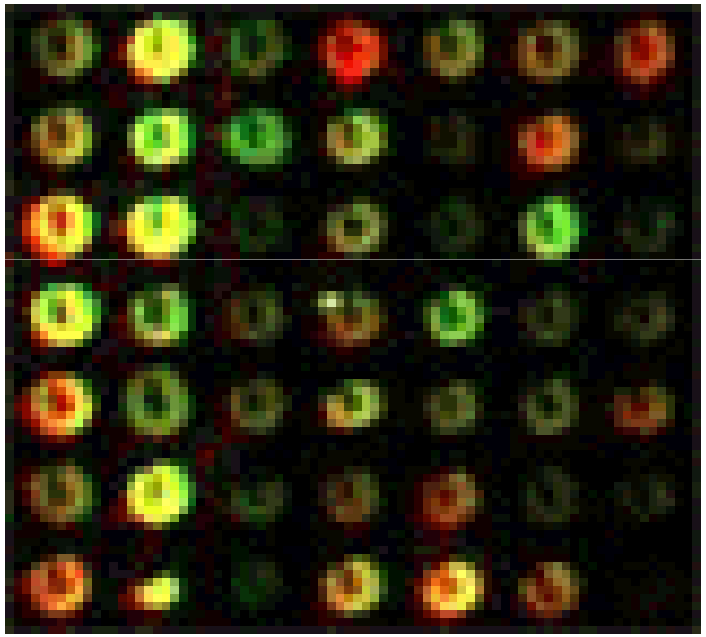
48.48

2,304 data points

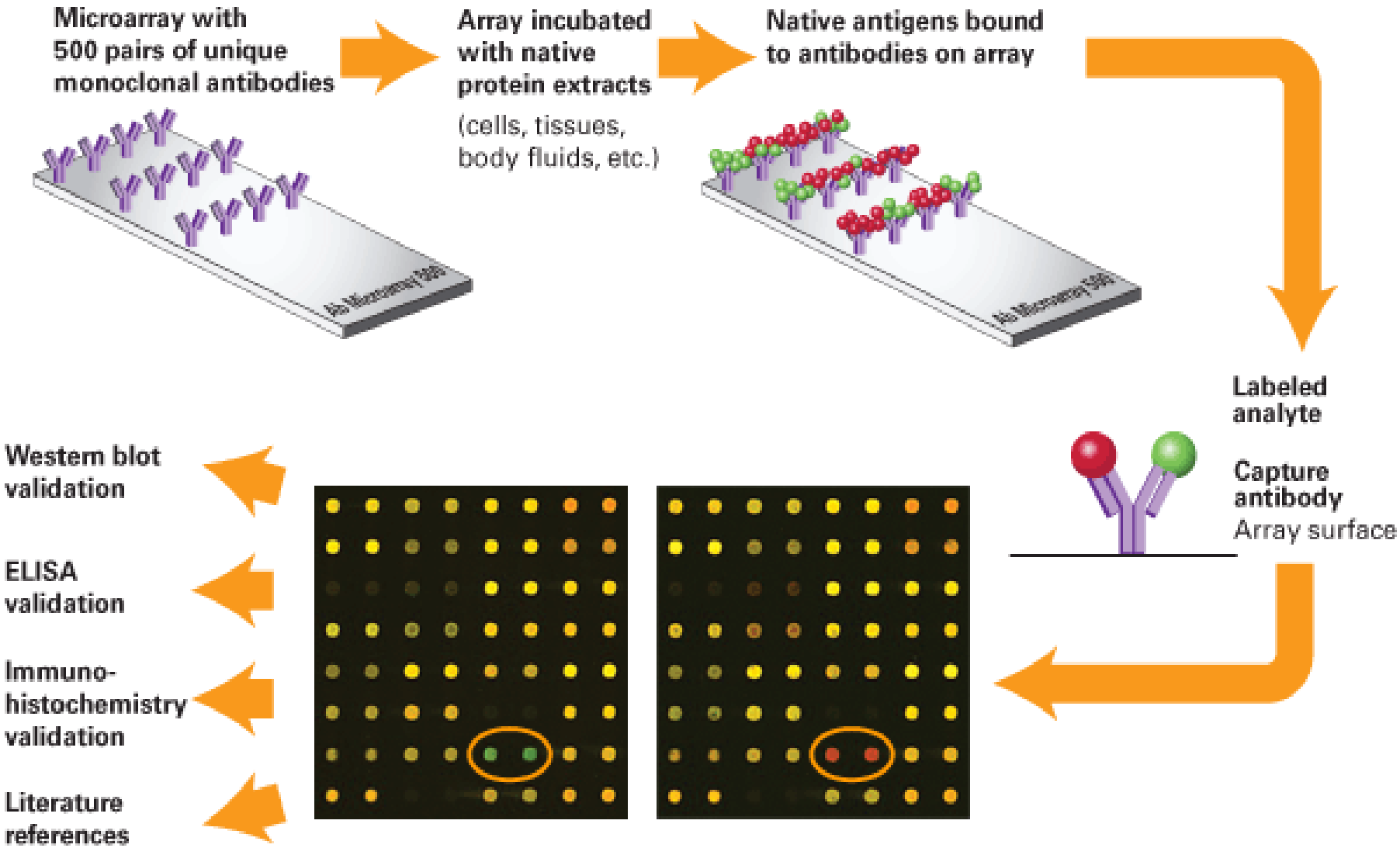
Digital Array Image



4.2. Белковые микробиочипы.



Clontech


Microarray with
500 pairs of unique
monoclonal antibodies
Array incubated
with native
protein extracts
(cells, tissues,
body fluids, etc.)
Native antigens bound
to antibodies on array
Labeled
analyte
Capture
antibody
Array surface
Western blot
validation
ELISA
validation
Immuno-
histochemistry
validation
Literature
references

ИЗГОТОВЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ МИКРОБИОЧИПОВ

При общей схожести процедур изготовления с ДНК-чипами некоторые этапы для белковых чипов являются более сложными: необходимо клонирование гена, экспрессия и очистка белка. Другое отличие: белки гетерогенны по биохимическим свойствам, активности, размерам, стабильности и форме.

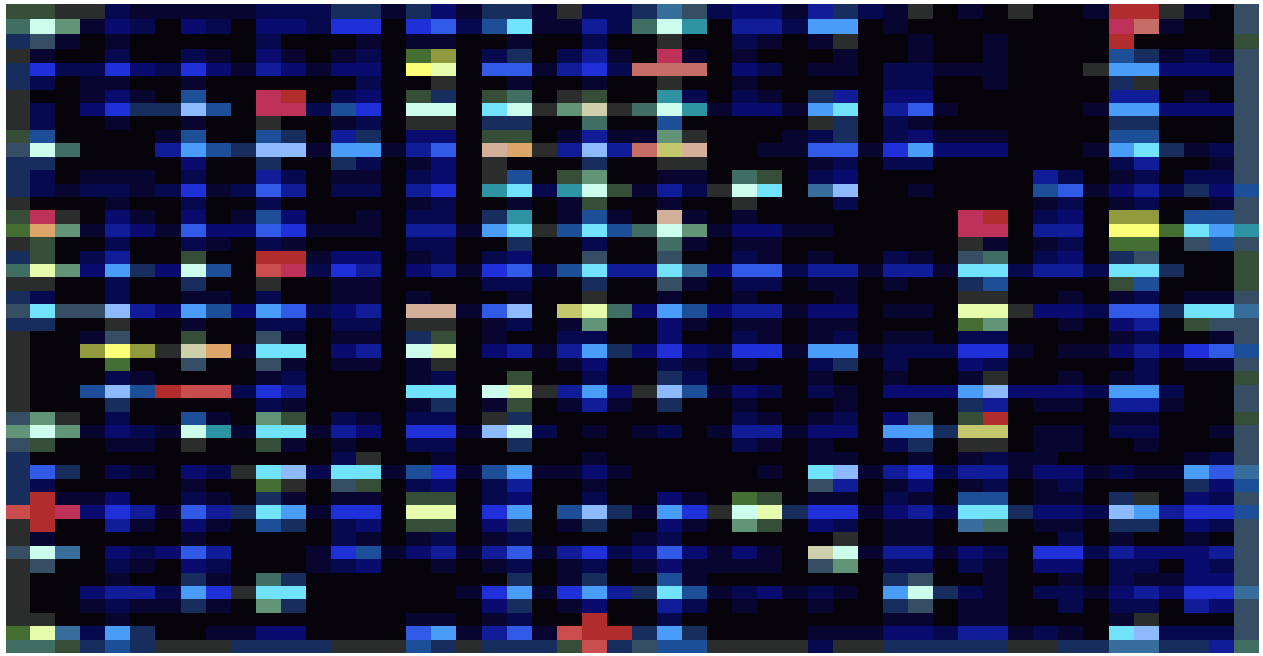
Существуют две технологии изготовления белковых чипов: контактная и бесконтактная. Первая технология позволяет получать белковые биочипы с высокой плотностью нанесения молекул. Более новая технология бесконтактной печати включает группу методов: фотохимии, электрораспыления, лазерной записи, а также технологию пьезоэлектрических инжекторов. На поверхности могут быть размещены пробы объемом от нано- до пиколитров, что дает преимущества при параллельном размещении большого количества проб . В белковых чипах в общем случае можно нанести порядка 2000 точек (300 мкм), а с применением промышленных нанотехнологий высокая плотность точек порядка 10^6 на мм^2 .

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОБИОЧИПОВ

В настоящее время уже созданы образцы белковых биочипов для анализа профиля кроветворных факторов (цитокинов) сыворотки доноров (Novagen, Biomax, Clontech), для аллерогодиагностики одновременно несколько десятков природных аллергенов, гормонов, маркеров сердечно-сосудистых заболеваний (VBC-Genomics, Randox Laboratories). Микробиочип Cartesian производства BioSource применяется для мультиплексной (до 36) детекции цитокинов (чувствительность менее 100 пкг/мл).

В 2006 г. в ЕС разрешен к применению микрочип фирмы «CeMines, Inc.» для анализа спектра аутоантител в плазме больных раком. Отметим, что по мнению специалистов через 20 лет скрининг аутоантител будет активно применяться для ранней диагностики как аутоиммунных (более 40 болезней, таких как диабет 1 типа, ревматоидный артрит и др) , так и онкологических и других заболеваний.

4.4.4. Биочипы как инструмент в широкомасштабных генетические исследованиях и технологии генотипирования.

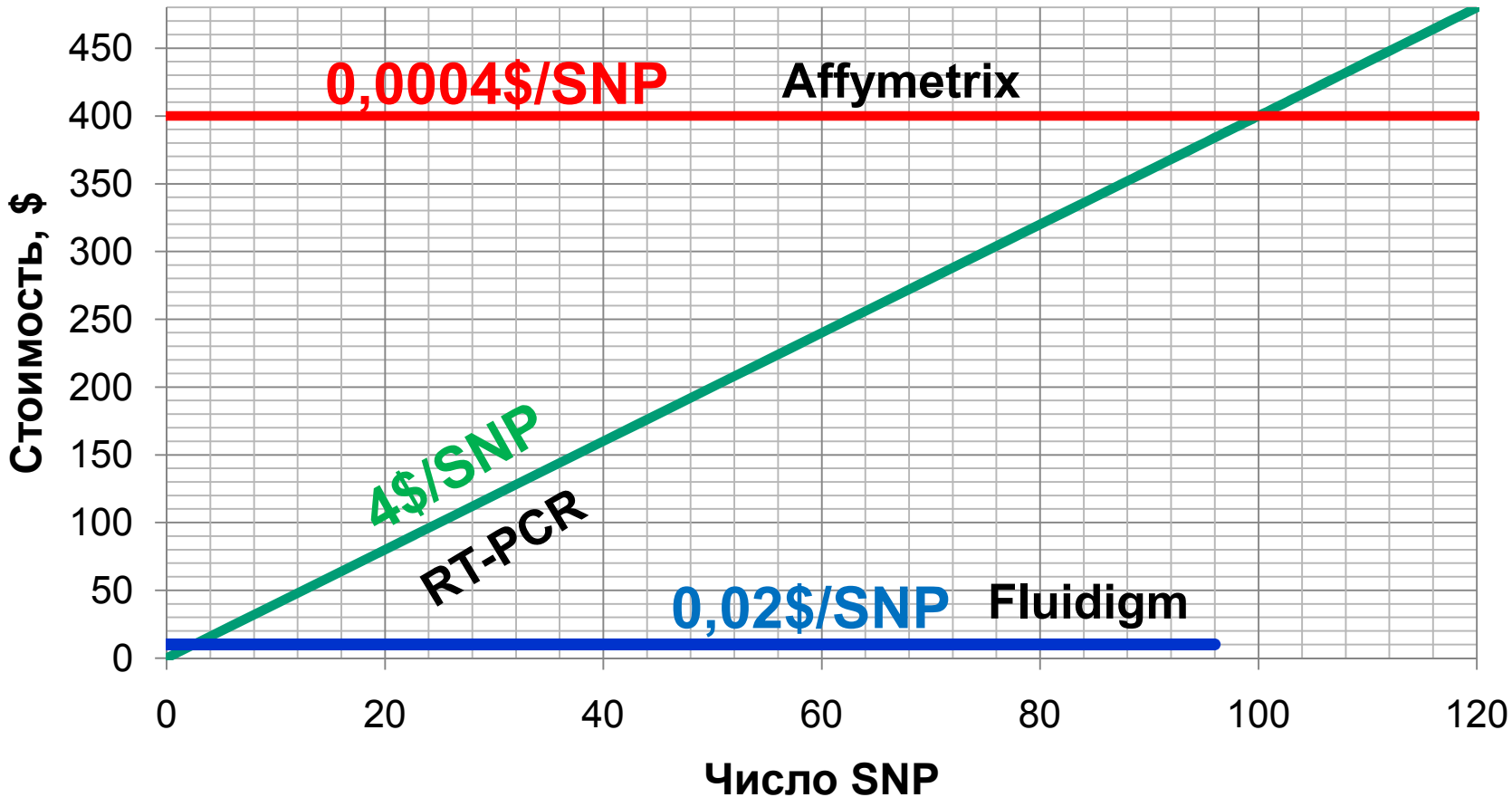


БИОЧИПЫ И GWAS

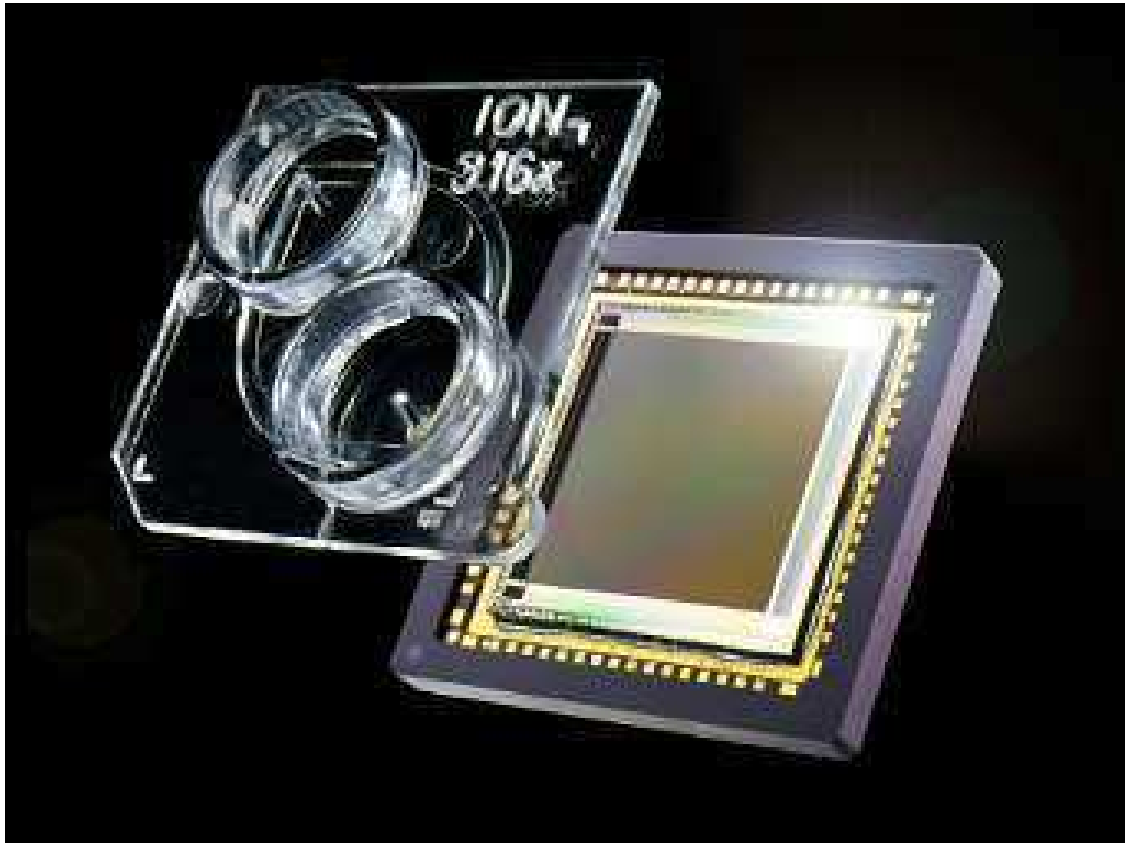
Использование биочипов в постгеномный период развития медицины связано с участием ведущих фирм производителей в крупных международных проектах исследований полногеномных ассоциации (GWAS). Основным вопросом становиться определение изменений в геноме, которые связанны с фенотипом или характерны для определенного заболевания.

Были проведены масштабные исследования по исследованиям геномов пациентов с различными заболеваниями: диабет 1 и 2 типов, колоректальный рак и рак простаты , рак легких, астма, ожирение, хронические обструктивные заболевания легких, атеросклероз , сердечно-сосудистых заболеваний, тромбозы, болезнь Паркинсона и Альцгеймера.

Стоимость генотипирования

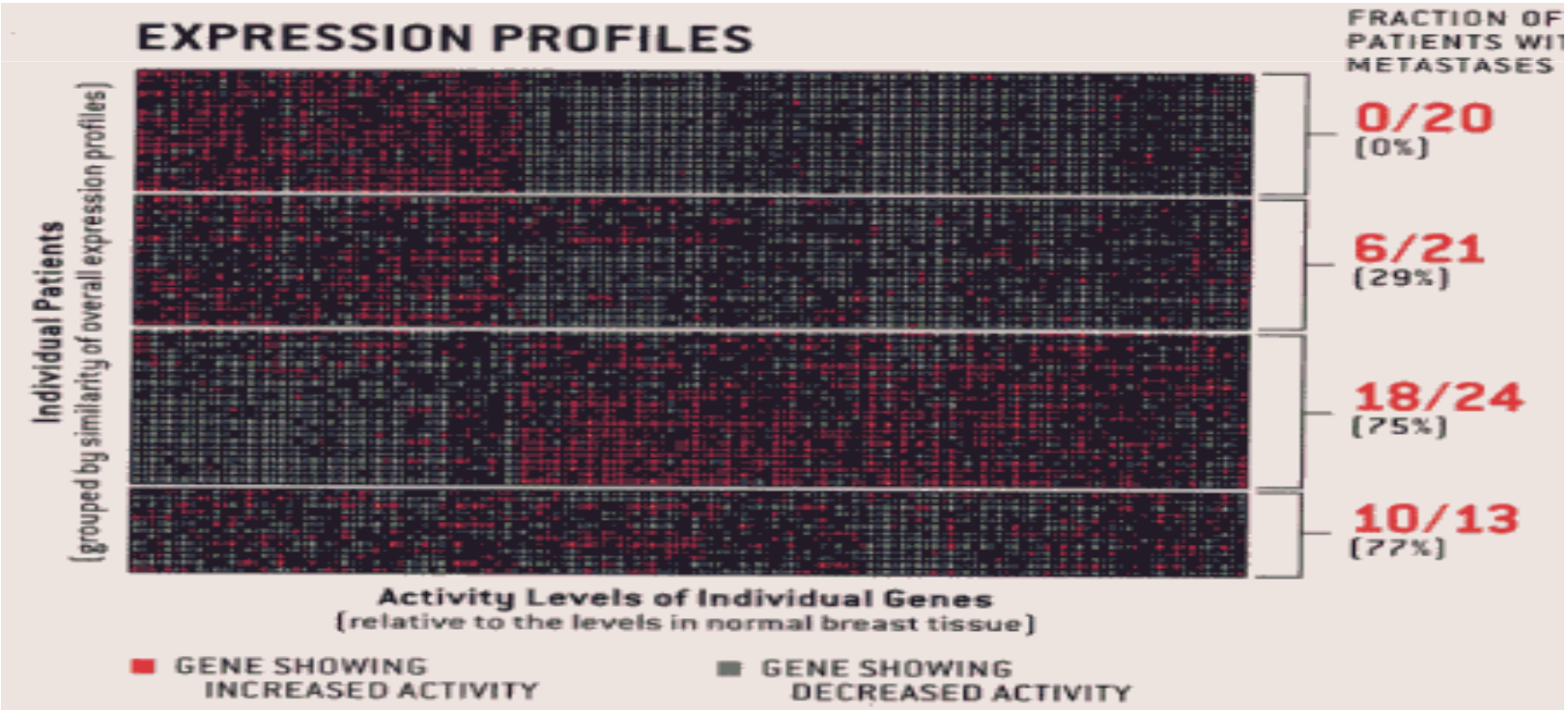


ПРОГНОЗ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ



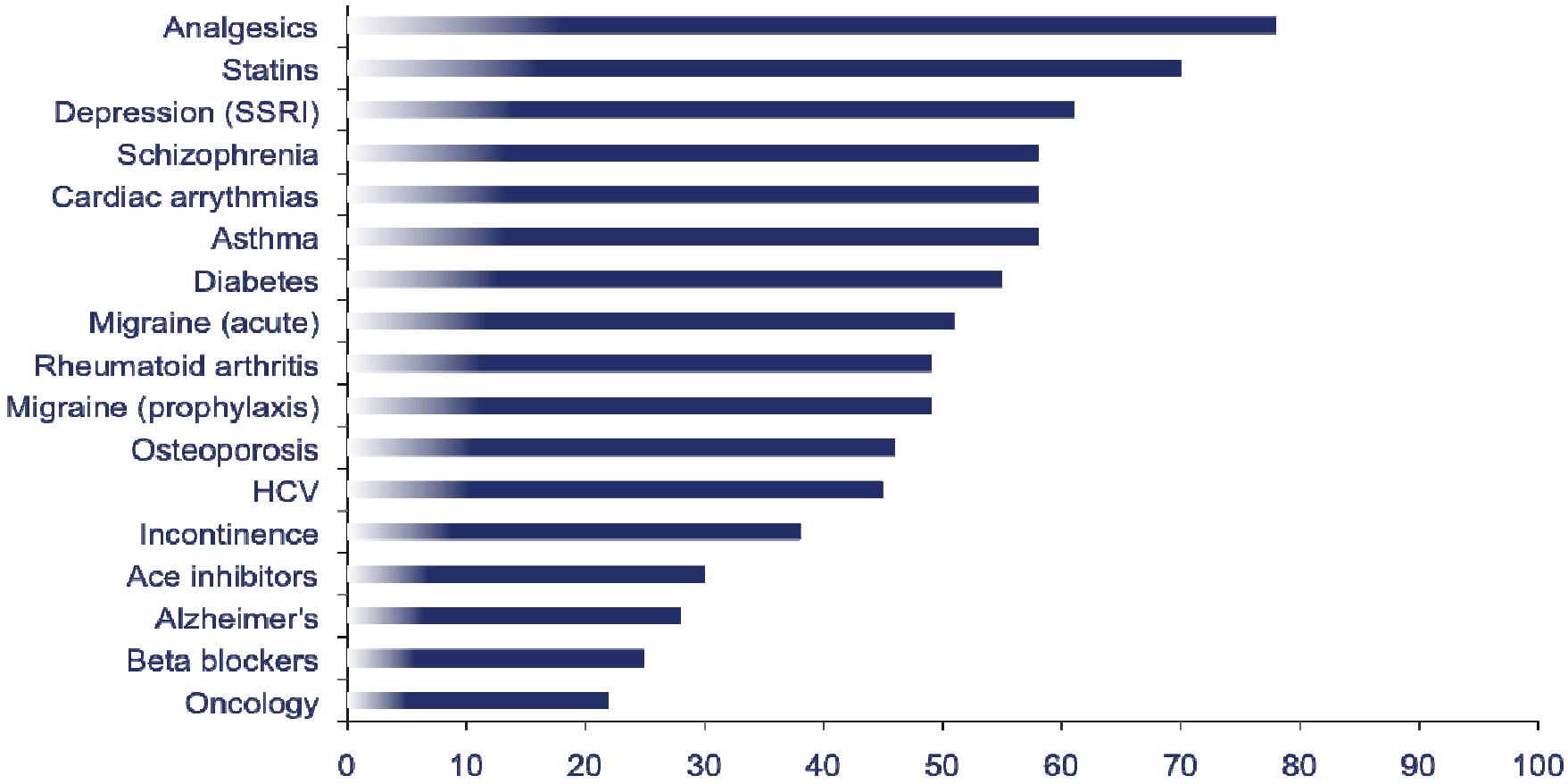
Affymetrix

Излечимые виды лейкозов дают одни узоры (паттерны), неизлечимые дают совсем другие паттерны. На рисунке можно видеть, как окрашенная ДНК от разных больных образует различные паттерны на биочипе.
Болезнь одна и та же, паттерны — разные.
По виду паттернов можно с большой вероятностью предсказать течение болезни на самой ранней ее стадии.
В данном случае при паттерне типа 1 вероятность метастаз равна нулю,
при паттерне типа 2 — уже 29%,
при паттернах типа 3 и 4 соответственно 75% и 77%.



4.4.3. ПОДБОР И МОНИТОРИНГ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ

ТЕРАПИЯ СЕГОДНЯ – НАСОВЕРШЕННОЕ ИСКУССТВО



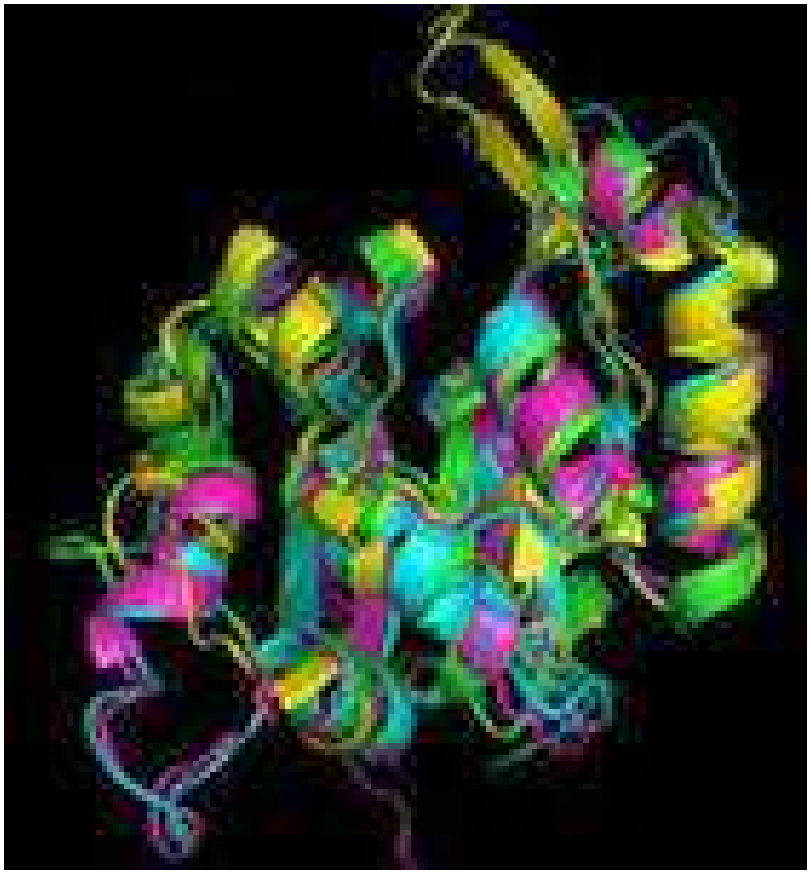
Response Rates %

AmpliChip CYP450

Микробиочипы активно используются в фармакологии: опубликован протокол применения биочипов GeneChip для фармакологических исследований. Важнейшей системой метаболизма лекарств является система цитохрома Р-450. Биочип AmpliChip CYP450 содержит более 15000 различных олигонуклеотидпых зондов. Практически все известные полиморфизмы и аллели CYP2D6, и два наиболее часто встречающихся для CYP2C19, могут быть обнаружены одновременно. AmpliChip CYP450 обеспечивает всесторонний охват вариаций генов, которые играют роль в метаболизме примерно 25% всех лекарственных препаратов. AmpliChip CYP450 тест предназначен для помощи врачам в индивидуализации лечебной дозы для пациентов при терапии, метаболизирующейся с помощью этих генов.

Микробиочип может дать возможность потенциально сэкономить 21 миллиард долларов к 2020 году, улучшив эффективность 10-20% всего медикаментозного лечения

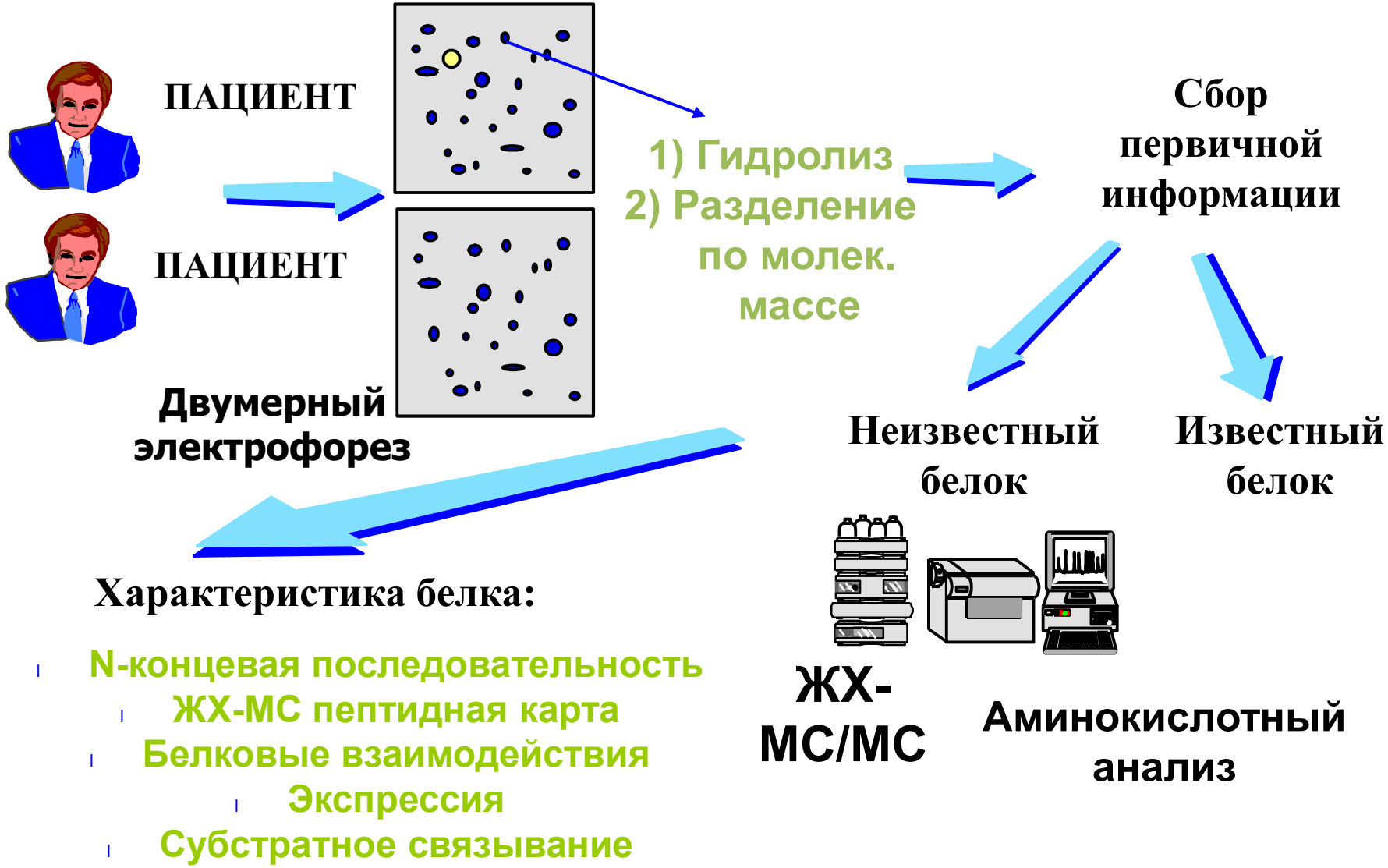
2.5. Лабораторные методы персонализированной медицины с использованием протеомных подходов.



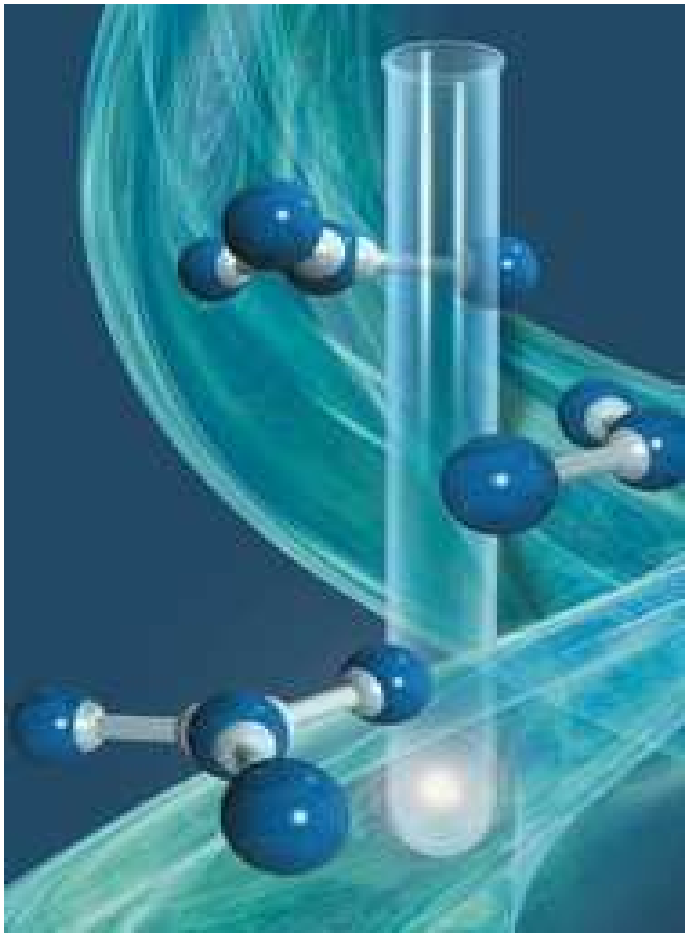
Лабораторные методы персонализированной медицины с использованием протеомных подходов.

22. Ферментное обнаружение мутаций;
23. Анализы на основе флуоресценции резонансного переноса энергии (FRET) ;
24. Флуоресцентная детекция белка in situ:
25. Технологии протеиновых биочипов;
26. Токсикопротеомика.
27. Двумерный электрофрез в комбинации с идентификацией методом MALDI-TOF;
28. Одномерный электрофорез в комбинации с обращенно-фазовой жидкостной хроматографией, совмещенной с тандемной масс-спектрометрической детекцией;
29. Использование безгелевой технологии MudPiTдля многомерного разделения белков с последующим масс-спектрометрическим анализом;

Методика исследований в протеомике



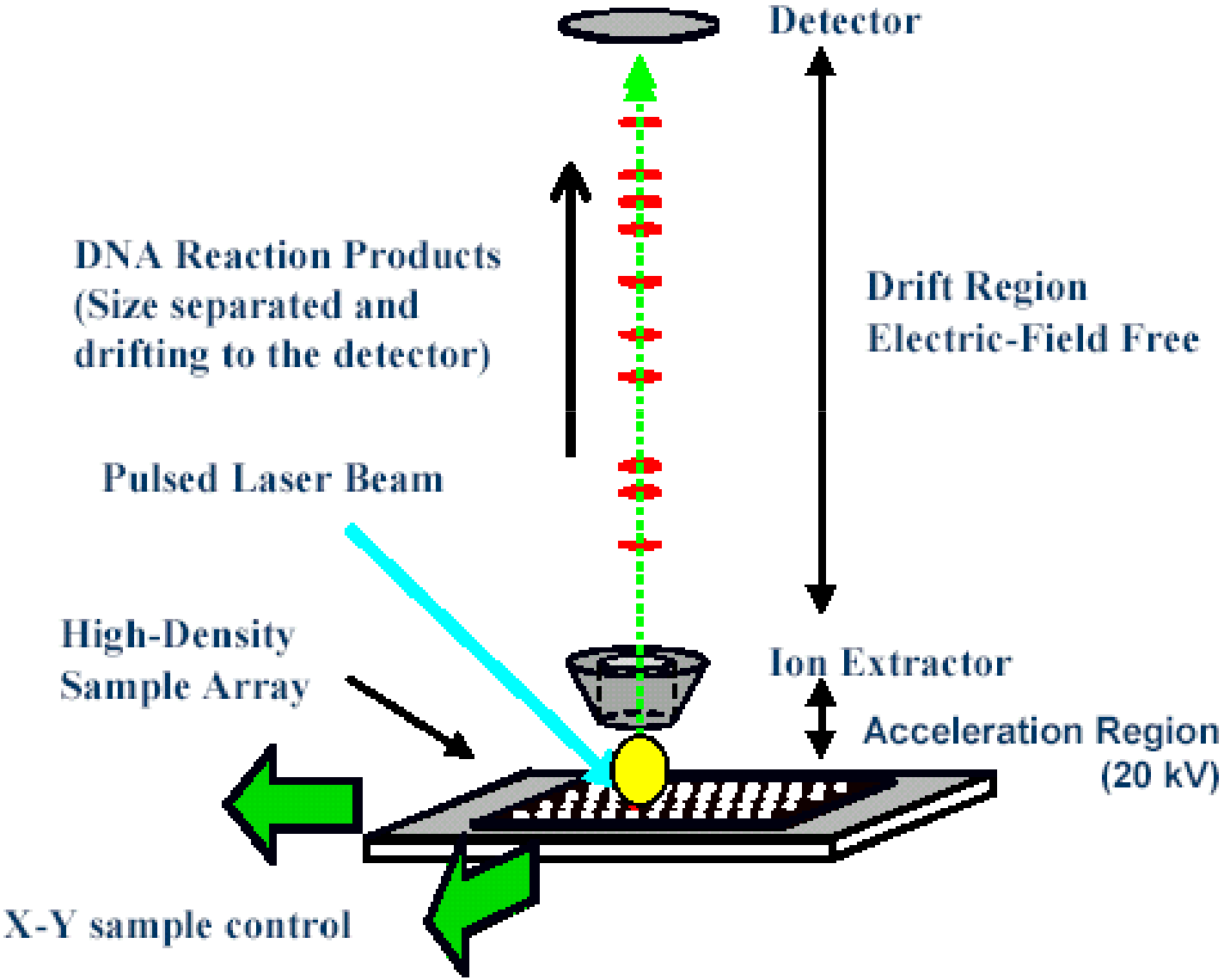
2.6. Методы хроматографии, спектроскопии, проточной цитометрии, как основа проведения массового анализа в интересах персонализированной медицины.



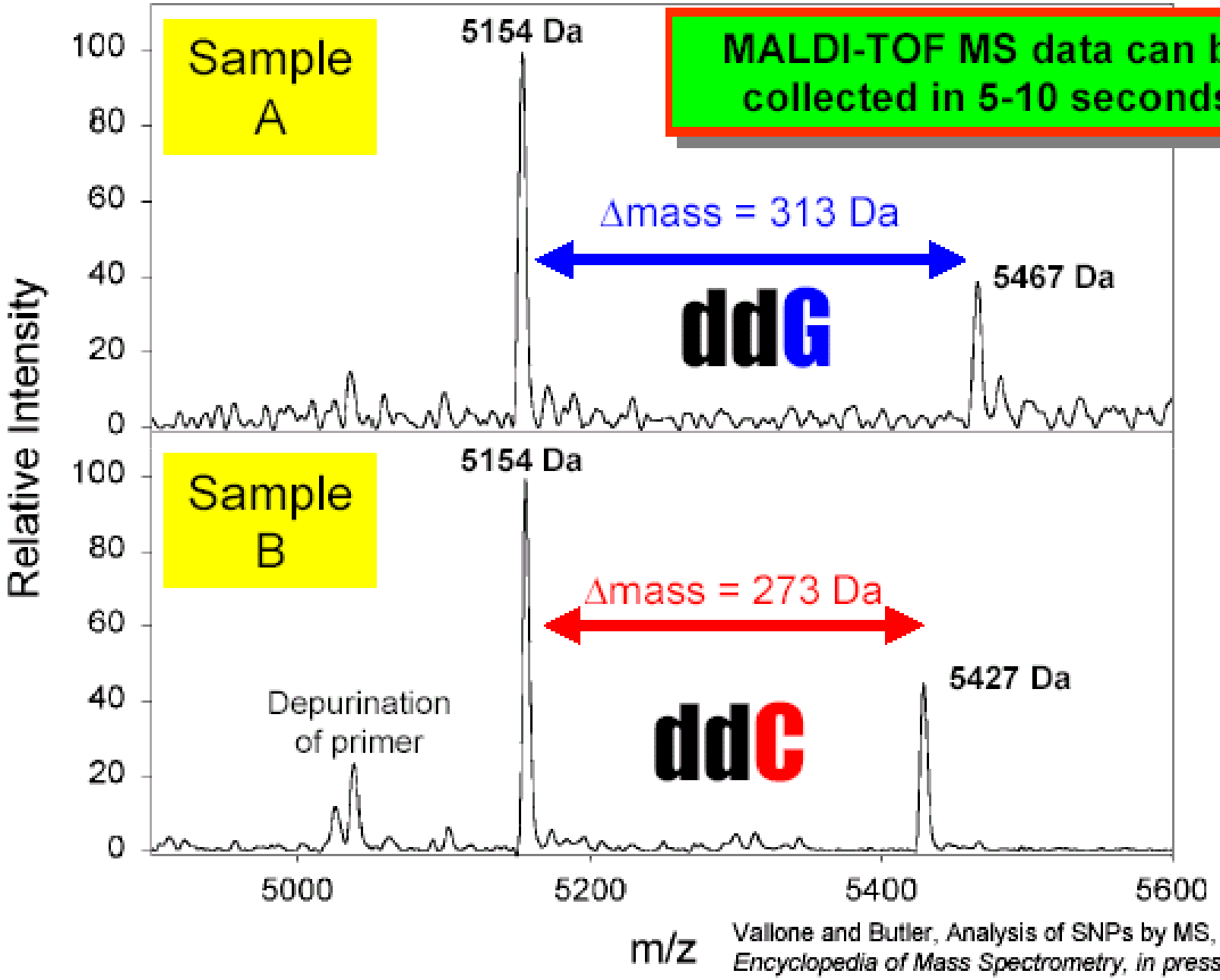
Технология минисеквенирования с последующим анализом продуктов на MALDI-TOF-масс-спектрометре и дает возможность быстро и эффективно идентифицировать ОНП и обладает высокой производительностью

В качестве матрицы, которая подвергается лазерному облучению (MALDI) находится ДНК в которых любые изменения (мутации, аллельные варианты) приводят к изменению массы.

Time-of-Flight Mass Spectrometry (TOF-MS)



MS Data from Y SNP Marker M96

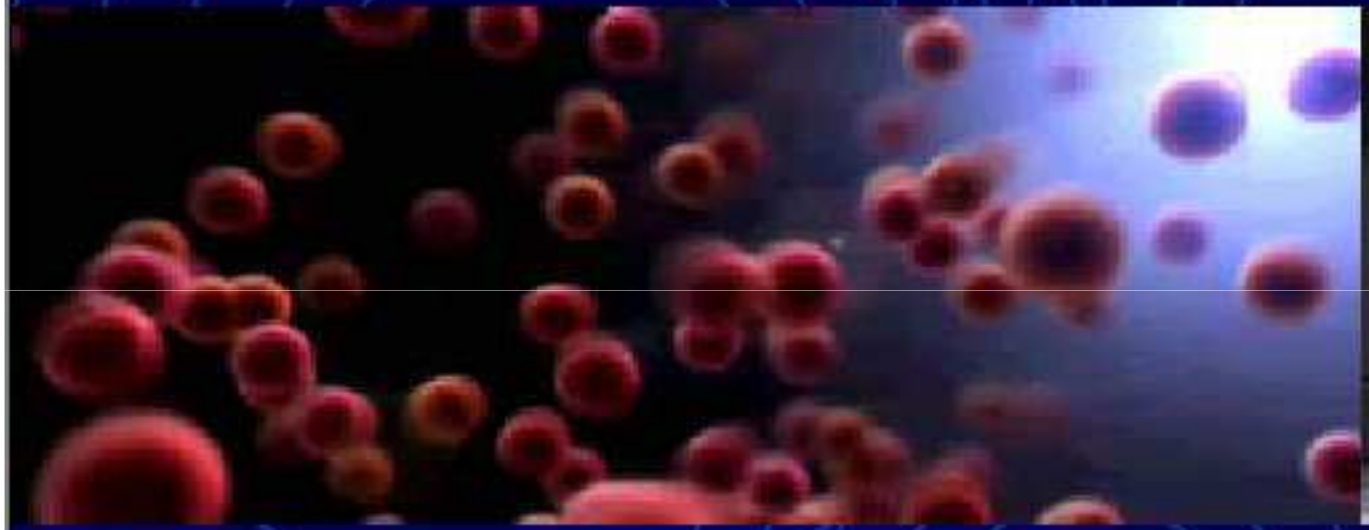


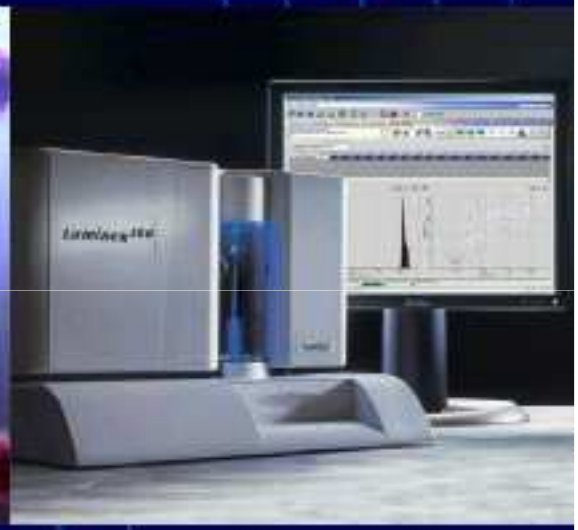
MALDI-TOF MS data can be collected in 5-10 seconds

Vallone and Butler, Analysis of SNPs by MS, *Encyclopedia of Mass Spectrometry, in press*

Что такое технология xMAP?

- Комбинация доказанных технологий





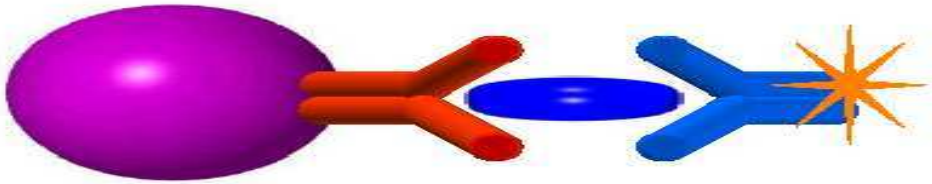
- Микросферы диаметром 5,6 мкм определенного цвета
  - 100 различных цветов, патентованный процесс окрашивания
- Система Luminex 100
  - Совершенная оптика, лазеры, устройство управления потоками, программное обеспечение

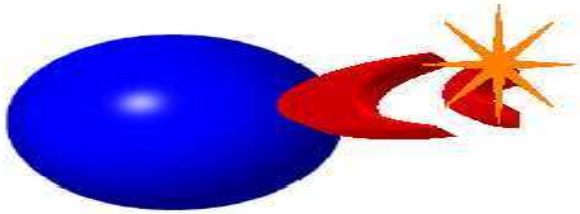
Система, основанная на проточной цитометрии (xMAP-технология)

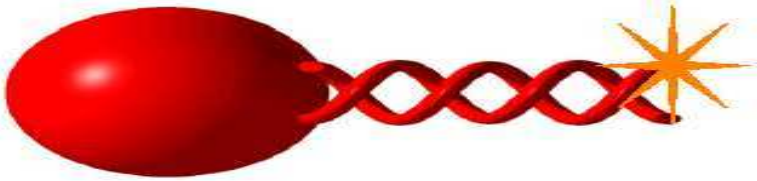
Построена на использовании современнейших технологий: проточной цитометрии, микросфер из полистирола, маркированных красными и инфракрасными флуорофорами, лазерной детекции, цифровой обработки сигнала и традиционной химии, уникальным образом скомбинированных между собой.

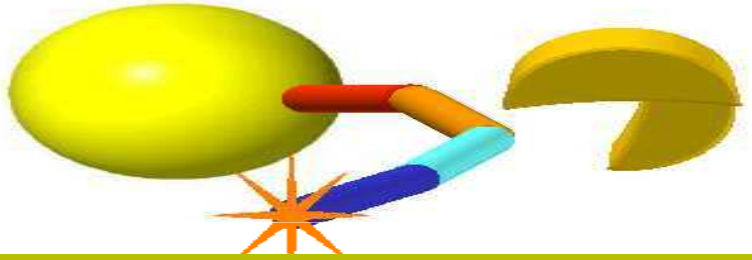
Микросферы покрыты захватывающими реагентами (олигонуклеотидами, антителами) и при смешивании образца с микросферами происходит их гибридизация или взаимодействие с пробами.

Applicable Formats







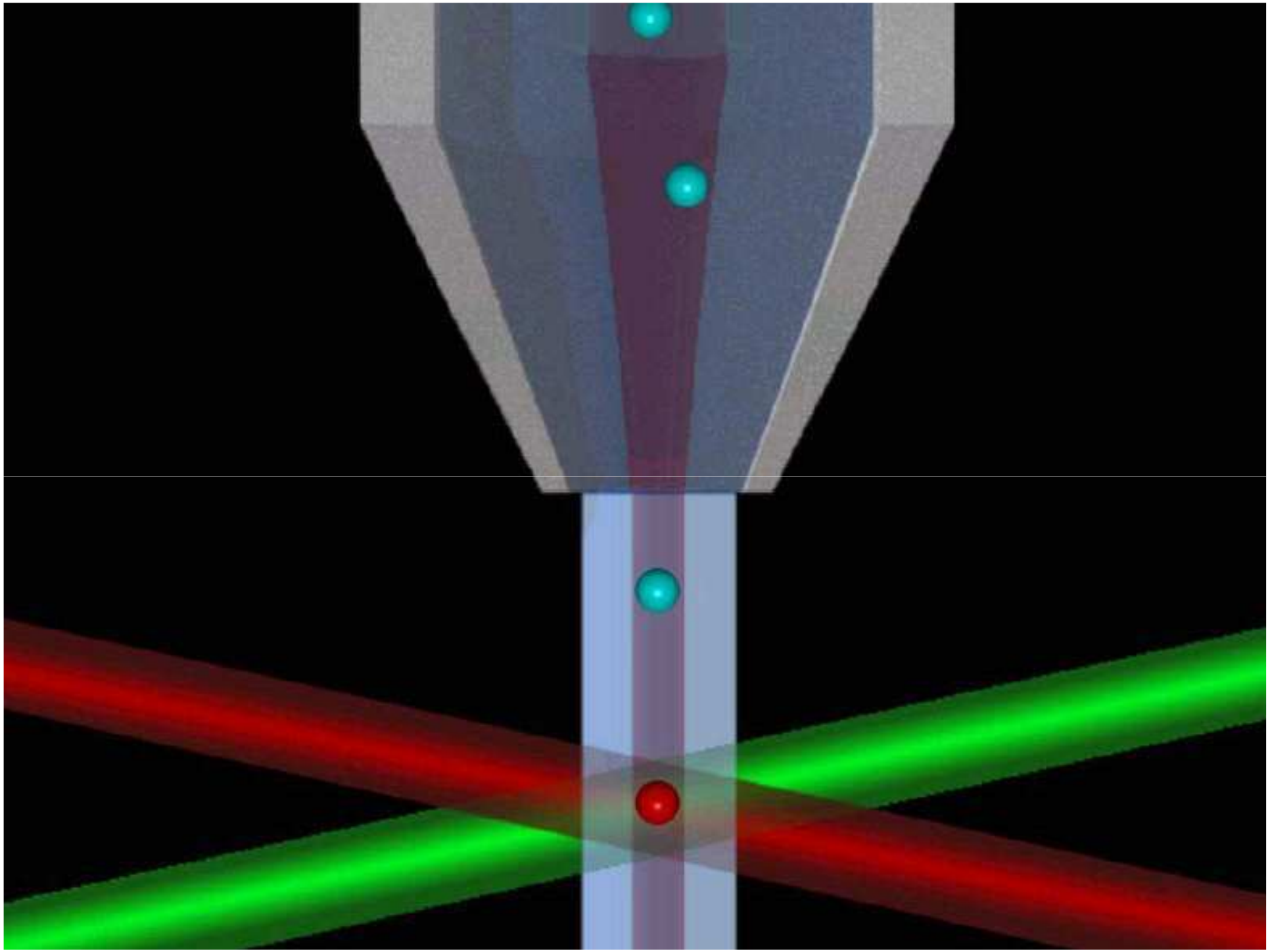


Фермент-субстрат

Рецептор-лиганд

Антиген-антитело

ДНК-ДНК и РНК-ДНК



Генотипирование с использованием x-MAP технологии:

CFTR, Factor V Leiden, Factor II (Prothrombin),

Mitochondrial DNA, Screening, MTHFR, P450-2D6,

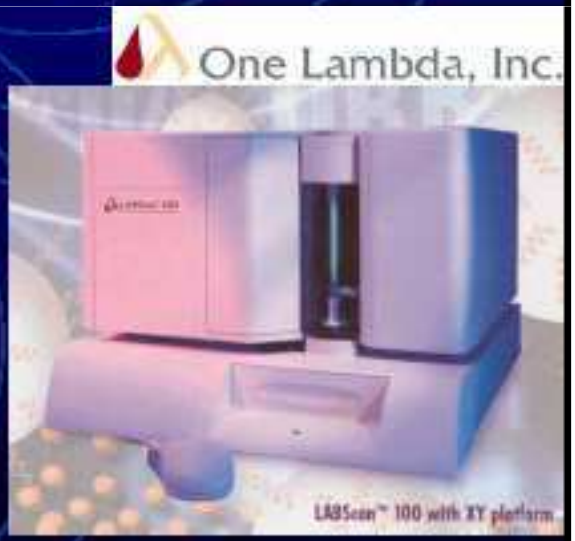
P450-2C9, P450-2C19, SSO A Locus, SSO B Locus,

SSO DQB1, SSO DRB1, SSO DRB3,4,5, Y-SNP

Системы на базе технологии xMAP

Luminex 100 ™

Bio-Plex



LABScan™ 100

Молекулярно-диагностические технологии, используемые в персонализированной медицине:

Нанодиагностика

Интеграция диагностики с терапией на основе наночастиц

Основанные на нанотехнологиях уточнения диагностики для целей фармакогенетики.

МикроРНК диагностика.

Молекулярная визуализация

Функциональная МРТ с контрастом наночастиц

Диагностика в пункте медицинской помощи (point of care)

Генотипирование

- **<u>Геном</u> – совокупность всего генетического материала организма**
- **<u>Генотип</u> – совокупность данных о всех или избранных вариантах генетического материала.**
  - **Точечный нуклеотидный полиморфизм (SNP)**
  - **Делеции, инсерции**
  - **Хромосомные аберрации**
  - **Вариации числа копий (CNV)**

Аллель – один из вариантов гена, встречающийся в популяции

Полиморфизм – ген представлен в популяции двумя и более аллельными вариантами. При этом частота более редкого (минорного) аллеля > 5%

Мутации – редкие (< 1%) и обычно вредные аллели

- **Генотипирование – комплекс лабораторных процедур, направленных на получение информации о генетическом статусе индивидуума.**

Важное замечание…

- Генотипирование – это скрининговая процедура, направленная на анализ наследуемых признаков.
- Процедуру генотипирования достаточно выполнить единственный раз, так как в ходе исследования определяются генетические комбинации единожды унаследованные от генетических родителей.

ПОКАЗАНИЯ К ИССЛЕДОВАНИЮ

ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ К ГРУППЕ РИСКА

СЕМЕЙНЫЙ ХАРАКТЕР ЗАБОЛЕВАНИЯ

РАННЕЕ НАЧАЛО ЗАБОЛЕВАНИЯ

ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ТЕРАПИИ

Генетическое тестирование на наличие предрасположенности к различным заболеваниям названо величайшим изобретением **2008** года

Time, Sunday, January 11, 2009

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ ИНДИВИДУАЛЬНУЮ БАЗУ ДНК-ДАННЫХ, ОТРАЖАЮЩУЮ УНИКАЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КАЖДОГО ЧЕЛОВЕКА, ЕГО ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ТЕИ ИЛИ ИНЫМ НАСЛЕДСТВЕННЫМ, МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫМ И ДРУГИМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ.

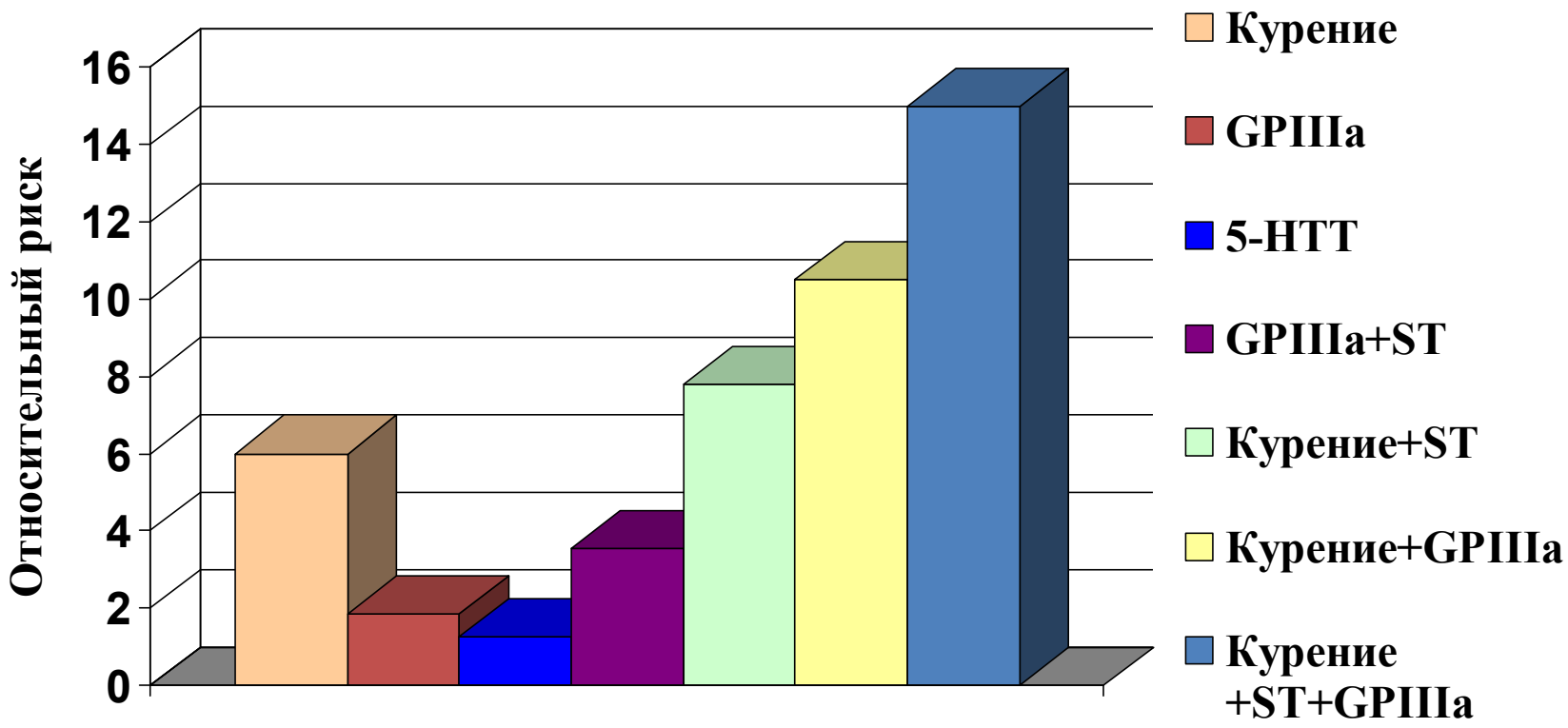
(В.С. Баранов. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб, 2009)

ГЕННЫЕ СЕТИ – ОСНОВА ПРЕДИКТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

ГЕННАЯ СЕТЬ – ЭТО ГРУППА КООРДИНИРОВАННО ФУНКЦИОНИРУЮЩИХ ГЕНОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩАЯ ФОРМИРОВАНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ОРГАНИЗМА (МОЛЕКУЛЯРНЫХ, БИОХИМИЧЕСКИХ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ)

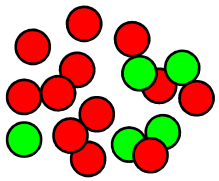
Составление генной сети для каждого мультифакториального заболевания, идентификация в ней центральных генов и генов-модификаторов, анализ ассоциации их полиморфизма с конкретным заболеванием, разработка на этой основе комплекса профилактических мероприятий для конкретного пациента составляют основу предиктивной медицины.

Кооперативный эффект генетических и средовых факторов, определяющих риск развития инфаркта миокарда у мужчин в возрасте до 45 лет



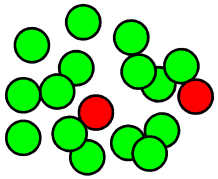
Выявление «генов предрасположенности» к заболеванию проводится путем сопоставлений частот генотипов у больных и здоровых

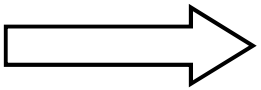
Группа больных



$P_{больные}$ >> $P_{контроль}$

Контроль (здоровые)





● - генотип, указывающий на предрасположенность к заболеванию.

OR – количественная мера предрасположенности (**O**dd **R**atio), показывает во сколько раз повышена вероятность заболеть для носителя «плохого» генотипа

$$\mathbf{OR} = \frac{P_{больные}(1 - P_{контроль})}{P_{контроль}(1 - P_{больные})}$$

Распространенные аллели с большим эффектом, обнаруженные в GWAS *(по Ch.S. Ku, 2010)*

Болезнь	Наименование гена	rs	OR	OMIM	Регион
Возраст-зависимая дегенерация сетчатки	CFH	380390-C	4.60	134370	1q31
Эксфолиативная глаукома	LOXL1	382942-G	20.10	153456	15q24.1
Болезнь Крона	JL23R	10889677	2.13	607562	1p31.3
Рак яичка	KILTG	3782179	3.08	184745	12q22
		4474514	3.07		

ГИПОТЕЗА CV/CD
«часто встречающиеся генные варианты / распространенные заболевания»

Гипотеза, что наличие в геноме данного индивида набора широко распространенных измененных генов (генных вариантов) коррелирует с подверженностью его определенному заболеванию (common variants / common disorder, CV/CD) и что это поможет понять механизм наследования таких сложных заболеваний, как диабет II типа или атеросклероз. Означает ли отсутствие ощутимого вклада часто встречающихся генных вариантов в развитие той или иной патологии, что упомянутая гипотеза неверна? Этот вопрос положил начало расколу в медико–биологическом сообществе.

ГИПОТЕЗА РАБОТАЕТ

Многие ведущие генетики по–прежнему уверены, что гипотеза работает. Так, Эрик Ландер (Eric S. Lander), директор Института Брода, филиала Уайтхедского института, заявил, что «идея подобрать генетические ключи к различным заболеваниям по–настоящему завладела умами исследователей лишь в последние три года, и мы едва коснулись поверхности предстоящих разработок». По его мнению, революция в медицине начнется с внедрением новых технологий, и ее плодами воспользуются наши дети.

ДИСКУССИЯ БИОЛОГОВ 2010 год

Часть биологов настаивает на том, что гипотеза «часто встречающиеся генные варианты / распространенные заболевания» неверна. Жаркие споры по этому поводу развернулись весной 2010 г. на страницах журнала Cell. Генетики Мэри–Клэр Кинг (Mary–Claire King) и Джон Макклеллан (Jon M. McClellan) из Вашингтонского университета утверждают, что «связь подавляющего большинства распространенных генных вариантов с какими–либо заболеваниями четко не установлена, и они бесполезны для прогнозирования или выбора способа лечения». А Уолтер Бодмер (Walter Bodmer), известнейший представитель британской генетики, считает, что стратегия CV/CD ошибочна.

Поиски ответа на вопрос как правильно распорядиться с результатами генетического тестирования могут привести к совершенно новым подходам к патогенезу заболеваний человека и выяснению способов их передачи от поколения к поколению.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ПЦР В ОНКОЛОГИИ

Генетические факторы предрасположенности к онкологическим заболеваниям

Рак молочной железы и яичников

– Делеционные мутации в генах BRCA1 и BRCA2.

Охарактеризовано более 15000 мутаций.

Носители таких мутаций имеют на 80% увеличенный риск развития рака молочной железы и/или яичника в возрасте до 60 лет

Рак считается наследственным в случае наличия в семье 2 случаев рака с ранней манифестацией –до 45 лет-у близких родственников.

Molecular Understanding Of Disease is Unlocking Improved Medical Care

1850s → 1900 → 1920 → 2007 → New Way

Patient clinical signs / symptoms → Cellular Morphology → Molecular mechanism

"White Blood Disease"

- Leukemia
  - Chronic Leukemia
  - Acute Leukemia
  - Pre-leukemia
    - Acute myeloid leukemia
    - Acute lymphoblastic leukemia
    - Acute promyelocytic leukemia
    - Chronic myeloid leukemia
    - Chronic myeloproliferative disorders
    - Myelodysplastic syndromes
    - Mixed myeloproliferative / myelodysplastic syndromes

    And associated sub-types (~40 total)
- Lymphoma
  - Indolent Lymphoma
  - Aggressive Lymphoma
    - Mature B-cell lymphomas
    - Mature T-cell lymphomas
    - Plasma cell neoplasm
    - Immature (precursor) lymphomas
    - Hodgkin's lymphoma
    - Immunodeficiency associated lymphomas
    - Other hematolymphoid neoplasms

    And associated sub-types (~50 total)

→ **Disease and treatment by molecular mechanism**

5YR Survival rate:

<10% → **~20%** → **~50%** → **~65%** → **Significantly improved outcomes**

Source: WHO classification criteria; SEER Cancer Statistics Review 2009

Example: Leukemia and Lymphoma

			5 Year Survival
1950	"Disease of the Blood"		~ 0%
1960	Leukemia	Lymphoma	
1970	Chronic Leukemia Acute Leukemia Preleukemia	Indolent Lymphoma Aggressive Lymphoma	
2007	~38 Leukemia types identified: Acute myeloid leukemia (~12 types) Acute lymphoblastic leukemia (2 types) Acute promyelocytic leukemia (2 types) Acute monocytic leukemia (2 types) Acute erythroid leukemia (2 types) Acute megakaryoblastic leukemia Acute myelomonocytic leukemia (2 types) Chronic myeloid leukemia Chronic myeloproliferative disorders (5 types) Myelodysplastic syndromes (6 types) Mixed myeloproliferative/myelodysplastic syndromes (3 types)	~51 Lymphomas identified: Mature B-cell lymphomas (~14 types) Mature T-cell lymphomas (15 types) Plasma cell neoplasm (3 types) Immature (precursor) lymphomas (2 types) Hodgkin's lymphoma (5 types) Immunodeficiency associated lymphomas (~5 types) Other hematolymphoid neoplasms (~7 types)	~ 70%

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМА РАКОВОЙ КЛЕТКИ

В клетке пациентки, больной острым миелобластным лейкозом нашлось 10 мутаций, из которых восемь оказались редкими и находились в генах, прежде не связываемых с этой болезнью.

К настоящему времени известны общие законы возникновения рака, но индивидуальный характер мутаций у каждого больного остается неизвестным.

Планируется расшифровать полный набор генов раковых клеток у пациентов с раком груди и легких, а также с другими формами лейкозов. Методика позволит развить индивидуальный подход для диагностики и лечения раковых заболеваний и изменить существующие подходы к лечению рака.

Основные причины неблагоприятных лекарственных реакций

- **Ошибочное назначение препарата**
- **Качество лекарственного препарата**
- **Индивидуальная чувствительность**
  - Генетически детерминированная недостаточность или избыточность ферментов, метаболизирующих лекарственный препарат
  - Нарушения в транспорте лекарственных препаратов и др. причины, не связанные с метаболизмом

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЕ ЛЕЧЕНИЕ РАКА

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНТЕФЕРОНА АЛЬФА ОКАЗЫВАЕТСЯ <u>УСПЕШНЫМ ТОЛЬКО У 20-30% БОЛЬНЫХ.</u> У ОСТАЛЬНЫХ НА ФОНЕ ТЕРАПИИ ВВОЗНИКАЮТ РАЗЛИЧНЫЕ ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ. ПОЭТОМУ ПРИМЕНЕНИЕ ИФН ОГРАНИЧЕНО БОЛЬНЫМИ С ДАЛЕКО ЗАШЕДШИМИ СТАДИЯМИ РАКА.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ <u>ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ ГЕННОГО МИКРОЧИПА</u> ПОЗВОЛЯЕТ ВЫЯВЛЯТЬ ПАЦИЕНТОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К ЛЕЧЕНИЮ

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПОДВЕРЖЕННОСТЬ ИНФЕКЦИОННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ МОЖЕТ БЫТЬ РЕАЛИЗОВАНА ТРЕМЯ СПОСОБАМИ:

Редкие мутации, приводящие к дефектам определенных звеньев противоинфекционного иммунитета.

Варианты генов с относительно сильным эффектом в популяциях и родословных, переживших недавнюю эпидемию инфекционной болезни.

Сочетание у индивида «нормальных» аллелей генов, в отдельности имеющих слабый эффект, но совокупность которых приводит к образованию особенности иммунитета, предполагающих к развитию инфекционного заболевания (наиболее вероятный вариант).

ПОКАЗАНА ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ТУБЕРКУЛЕЗУ, САЛЬМОНЕЛЛЕЗУ, ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТАМ, КЛЕЩЕВОМУ ЭНЦЕФАЛИТУ, БОЛЕЗНИ ЛАЙМА, ВИЧ И ДР.

В РАЗНЫХ ПОПУЛЛЯЦИЯХ МИРА ДОКАЗАНА АССОЦИАЦИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗОМ И ЛЕПРОЙ БОЛЕЕ ЧЕМ С 20 ГЕНАМИ. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ SLC11F1, VDR, IL1B, IL1RA, IL1BB ВИДИМО МОЖЕТ ОПРЕДЕЛЯТЬ ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА.

ПОДВЕРЖЕННОСТЬ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМ ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАНА, ПО-ВИДИМОМУ, БОЛЬШОЕ ЗНАЧЕНИЕ В ЭТОМ ИМЕЮТ ГЕНЫ ИММУНОГО ОТВЕТА И ВОСПАЛЕНИЯ. ИЗУЧЕНА АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ПРИМЕРНО 20 ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ С ВГ.

ГЕНОТИП ЧЕЛОВЕКА ИМЕЕТ СУЩЕСТВЕННОЕ ЗНАЧЕНИЕ В ФОРМИРОВАНИИ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ВГ, ТАКИХ КАК ФИБРОЗ ПЕЧЕНИ И ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЕ.

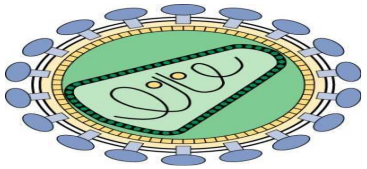
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К СПИД

У людей, принадлежащих к митохондриальной гаплогруппам U5a1 и J, ВИЧ-инфекция прогрессировала в два раза быстрее, чем в среднем. В тоже время у тех, кто принадлежал к гаплогруппе H3, СПИД развивался более чем в два раза дольше.

Митохондриальные гаплогруппы различаются по количеству вырабатываемой ими энергии, причем гаплогруппы U5a1 и J вырабатывают меньшее количество энергии. Провоцируемый ВИЧ апоптоз (клеточная гибель) активнее протекает в тех иммунных клетках, митохондрии которых вырабатывают меньше энергии. Этот факт может служить возможным объяснением ускоренного развития СПИДа у пациентов, принадлежащих к гаплогруппам U5a1 и J.

ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К СПИД

Показано, что наличие одного из вариантов гена HLA-C - rs9264942 - статистически связано со значительно меньшей скоростью размножения ВИЧ в зараженном организме. У людей, обладавших двумя копиями варианта rs9264942, уровни вирусной нагрузки напрямую связанные с вероятностью развития СПИДа, были в среднем на 90% ниже, чем у остальных больных. До 10% европейцев являются счастливыми обладателями двух копий rs9264942, а еще 50% обладают одной копией этого гена, что связано со снижением уровня вирусной нагрузки на 60%.

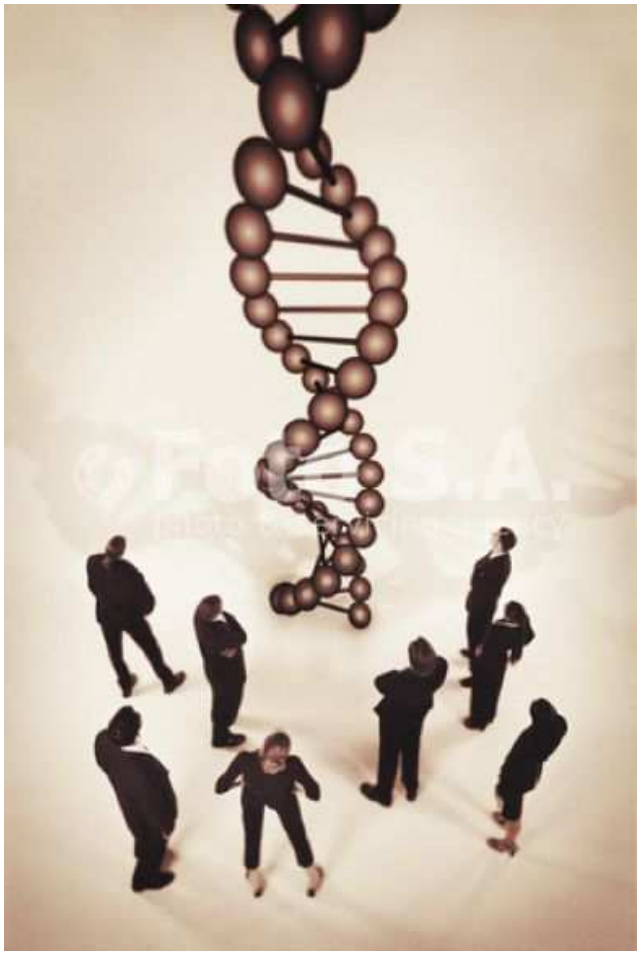


Кровные родственники людей, скончавшихся от гриппа, чаще умирают по той же причине.

Ученые университета штата Юта проанализировали информацию о родственных связях жителей Юты из компьютеризированной генеалогической базе данных населения штата, а также свидетельства о смерти, выданные в штате Юта в течение последних ста лет. За указанный период жертвами гриппа стали примерно 5 тысяч человек, почти половина из которых скончались по время пандемии «испанки» в 1918 году.

Выяснилось, что наиболее часто жертвами гриппа становились кровные родственники погибших, в особенности ближайшие. По данным ученых, братья и сестры погибших от гриппа умирали от этого заболевания на 74% чаще, родители – на 38% чаще, а дети – на 60% чаще, чем не родственники. Дяди погибших от гриппа и их кузены (кровные родственники) умирали от гриппа соответственно на 22 и 16% чаще, чем не родственники.

УСЛУГИ ПО ГЕНЕТИЧЕСКОМУ ТЕСТИРОВАНИЮ



ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ (ГТ) в США, 2010г.

Всего ГТ наследственной предрасположенности применяется для 213 заболеваний

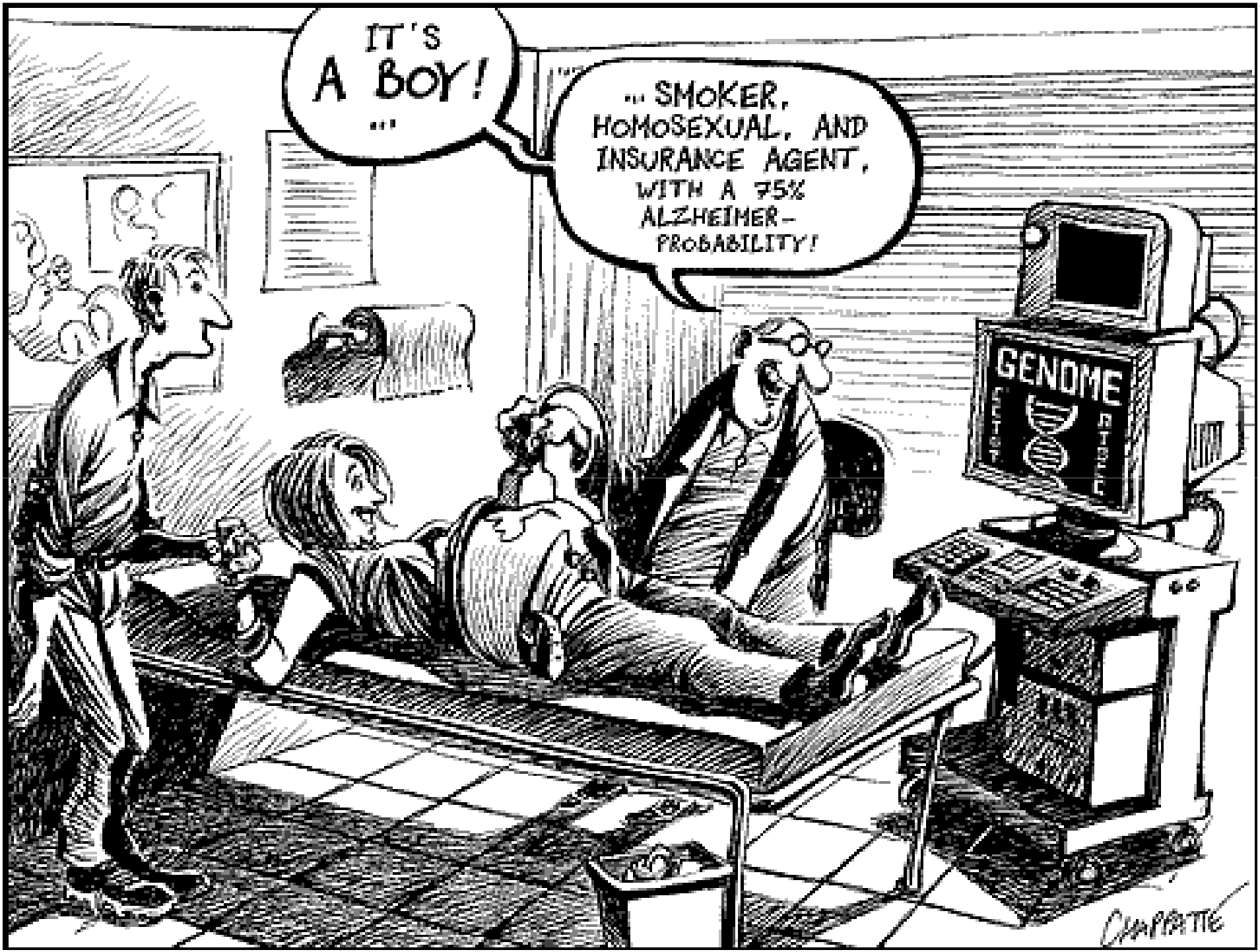
Особенно часто оно проводится для таких заболеваний: рак толстого кишечника, диабет тип 2, глаукома, инфаркт миокарда, рак легких, рассеянный склероз, целиакия , рак молочной железы, ожирение, рак простаты, фибрилляция предсердий, диабет тип1, болезнь Крона, гемохроматоз, волчанка, дегенерация сетчатки, остеоартриты, псориаз, рестеноз коронарных сосудов , болезнь «беспокойных» ног, тромбофилия

Генетическое тестирование по заказу по заказу (Direct to consumer testing) проводится для частых МФЗ основными фирмами: 23andme, deCODEme, Navigenetics, Pathway Genomics, Gene Essence

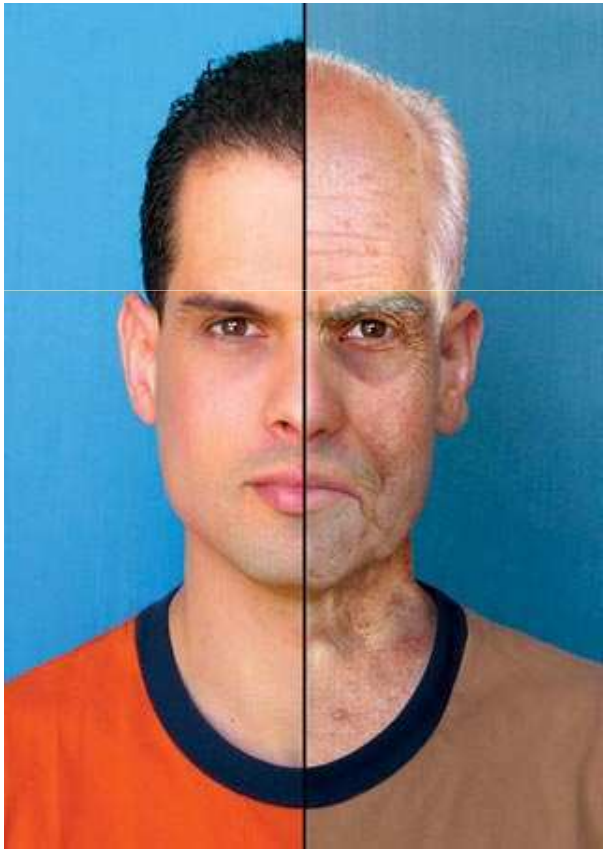
ЛИНДА АВЕЙ у основатель 23andMe частной медицинской компании.

Услуги по секвенированию индивидуальных геномов и выявлению генетических вариантов предлагают следующие фирмы:

Компания	Технология и стоимость	Вы получаете информацию о:
23andMe (Маунтинвью, Калифорния)	микронаборы для выявления генетических вариантов	своем происхождении и генетической предрасположенности к различным заболеваниям, в том числе к различным типам рака
DNA Direct (Сан-Франциско, Калифорния)	зависит от субподрядчика	последовательность всего генома (прилагается анализ, проделанный группой исследователей)
Navigenics (Редвуд-Шорес, Калифорния)	микронаборы для выявления генетических вариантов	рисках развития до 90 заболеваний, своем происхождении, статусе носителя наследственных болезней и чувствительности к определенным препаратам


IT'S A BOY! ...
... SMOKER, HOMOSEXUAL, AND INSURANCE AGENT, WITH A 75% ALZHEIMER-PROBABILITY!
GENOME
CHAPATTE

1.5. ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ И БУДУЩЕЕ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

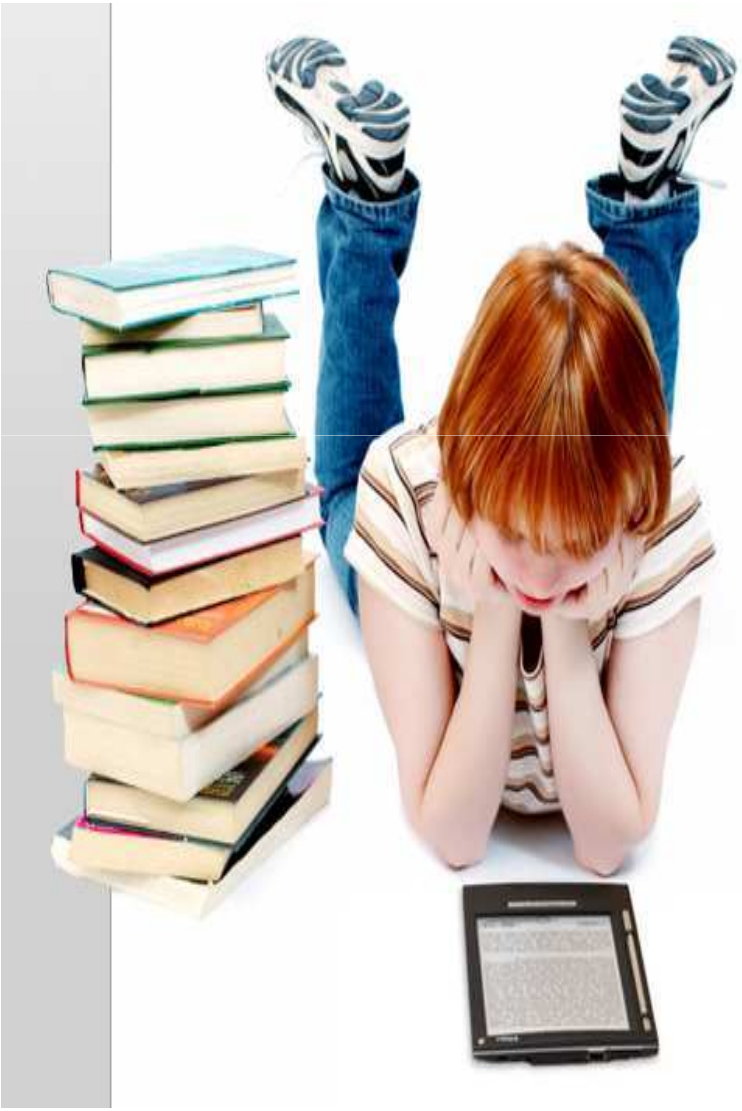


НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ

СТАНДАРТЫ ЛЕЧЕНИЯ И ДИАГНОСТИКИ, КОТОРЫЕ ВКЛЮЧАЮТ ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ ПОДХОД.

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ПРОГРАММЫ НЕОБХОДИМОСТЬ ПОДГОТОВКИ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО АНАЛИЗА ИНФОРМАЦИИ.

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ И ОБРАЗОВАНИЕ В ЭТОЙ ОБЛАСТИ ВРАЧЕЙ РАЗНЫХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ.



Подготовка специалистов лабораторной медицины

Специалисты лабораторной медицины должны готовиться по специальным программам, в основу которых могут быть положены принципы подготовки клинических патологов: проведение экспертной оценки всей совокупности диагностической, клинической информации и выдача рекомендаций по персонализированной диагностике и терапии.

В среднем пациент может нуждаться в информации о ~ 100 генетических рисках, обнаруженных в его геноме. Даже если только 3 минуты тратится на разъяснение риска по одному отклонению, этот процесс займет более 5 часов прямого контакта с пациентом.

Специальности РФ, 2009 г.	Количество
Врач-генетик	226
Врач-лаборант-генетик	141
Другие специалисты (акушеры, функциональные диагносты)	269
ВСЕГО	626

Специальности США. 2010 г.	Количество
Врач-генетик (клинический генетик)	1100
Генетик - консультант	2500
ВСЕГО	3600

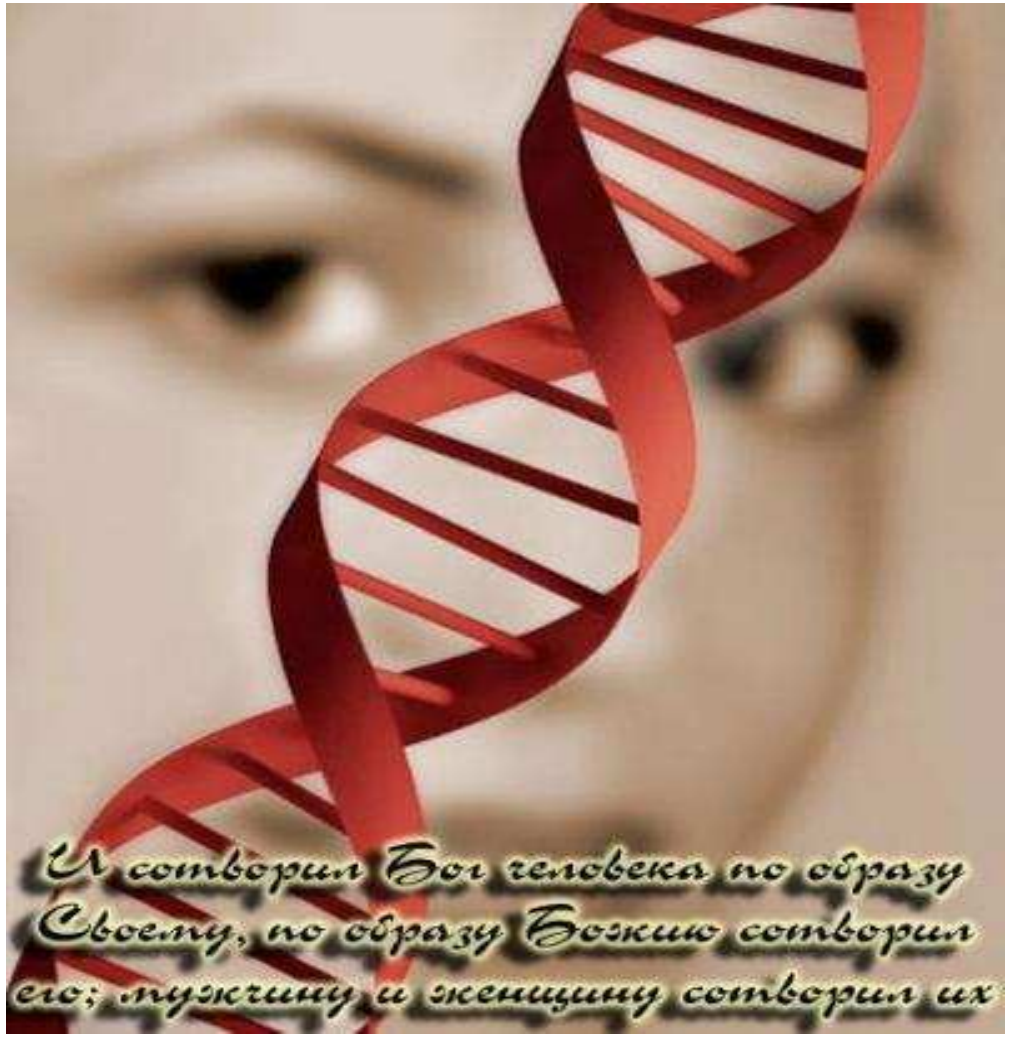
МЕЖДУНАРОДНЫЙ ЭКОНОМИЧЕСКИЙ ФОРУМ 2012 ГОДА

Лидеры Всемирного экономического форума 2012 года <u>назвали 10 важнейших технологий</u>, которым в этом году стоит уделить повышенное внимание. Персонализированная медицина, синтетическая биология, обработка информации представлены в этом списке.

<u>Синтетическая биология и метаболическая инженерия:</u> появилась возможность разрабатывать новые биологические процессы и организмы, призванные служить особым целям — конвертировать биомассу в химические вещества, топливо и материалы, создавать новые терапевтические лекарства.

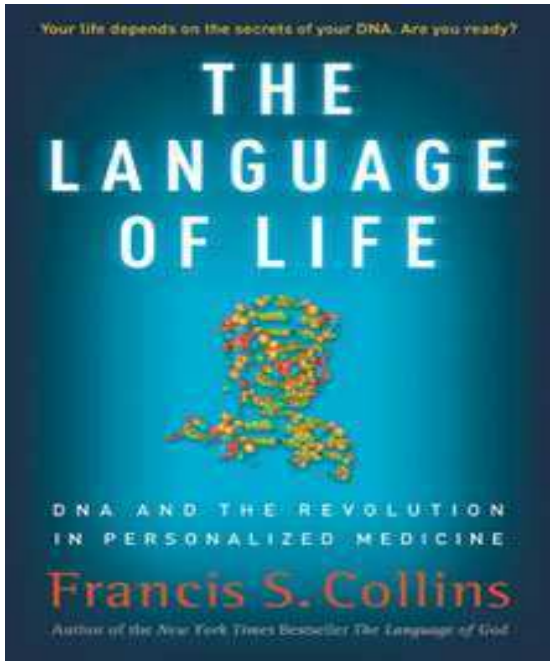
<u>Персонализированная медицина</u> и предотвращение распространения болезней поможет улучшить здравоохранение в мире. Прорыв в таких областях как геномика, протеомика и метаболомика открывают возможности для создания ‘личной’ медицины — лекарств, учитывающих особенности конкретного человека.

Руководитель международной программы «Геном человека» Ф. Коллинз назвал текст, записанный и геноме человека, «языком Бога».



Фрэнсис Коллинз, Директор Национального Института Здоровья, 2009г.:

«В оптимальном варианте персонализированная медицина использует информацию об уникальном геноме человека для выработке стратегии по диагностике, лечению и предупреждению болезней»



2000 год ПРЕДСКАЗАНИЯ Ф. КОЛЛИНЗА:

2010 год – генетическое тестирование, профилактические меры, снижающие риск заболеваний, и генная терапия до 25 наследственных заболеваний. Широко доступна преимплантационная диагностика, активно обсуждаются ограничения в применении данного метода. В США приняты законы для предотвращения генетической дискриминации и соблюдения конфиденциальности. Практические приложения геномики доступны не всем, особенно это чувствуется в развивающихся странах;

2020 год – на рынке появляются лекарства от диабета, гипертонии и других заболеваний, разработанные на основе геномной информации. Разрабатывается терапия рака, прицельно направленная на свойства раковых клеток определенных опухолей. Фармакогеномика становится общепринятым подходом для создания многих лекарств. Изменение способа диагностики психических заболеваний, появление новых способов их лечения, изменение отношения общества к таким заболеваниям.

2000 год ПРЕДСКАЗАНИЯ Ф. КОЛЛИНЗА:

2030 год – определение последовательности нуклеотидов всего генома отдельного индивида станет обычной процедурой, стоимость которой менее $1000. Каталогизированы гены, участвующие в процессе старения. Проводятся клинические испытания по увеличению максимальной продолжительности жизни человека. Лабораторные эксперименты на человеческих клетках заменены экспериментами на компьютерных моделях. Активизируются массовые движения противников передовых технологий в США и других странах;

2000 год ПРЕДСКАЗАНИЯ Ф. КОЛЛИНЗА:

2040 год – Все общепринятые меры здравоохранения основаны на геномике. Определяется предрасположенность к большинству заболеваний (ещё до рождения). Доступна эффективная профилактическая медицина с учетом особенностей индивида. Болезни определяются на ранних стадиях путем молекулярного мониторинга. Для многих заболеваний доступна генная терапия. Замена лекарств продуктами генов, вырабатываемыми организмом при ответе на терапию. Средняя продолжительность жизни достигнет 90 лет благодаря улучшению социально-экономических условий. Проходят серьезные дебаты о возможности человека контролировать собственную эволюцию.

Благодарю за внимание