



МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

**Ассистент кафедры лабораторной диагностики ИПО
БГМУ**

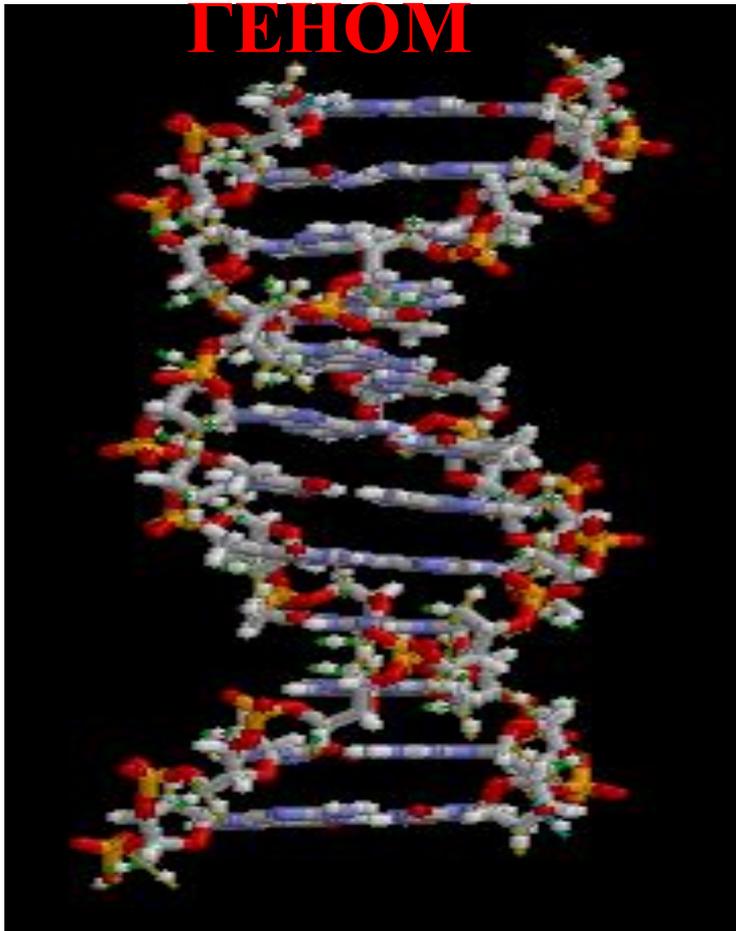
к.м.н. Билалов Ф.С.

Молекулярная медицина

Своевременное выявление **предрасположенности**
к возникновению патологии

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ:

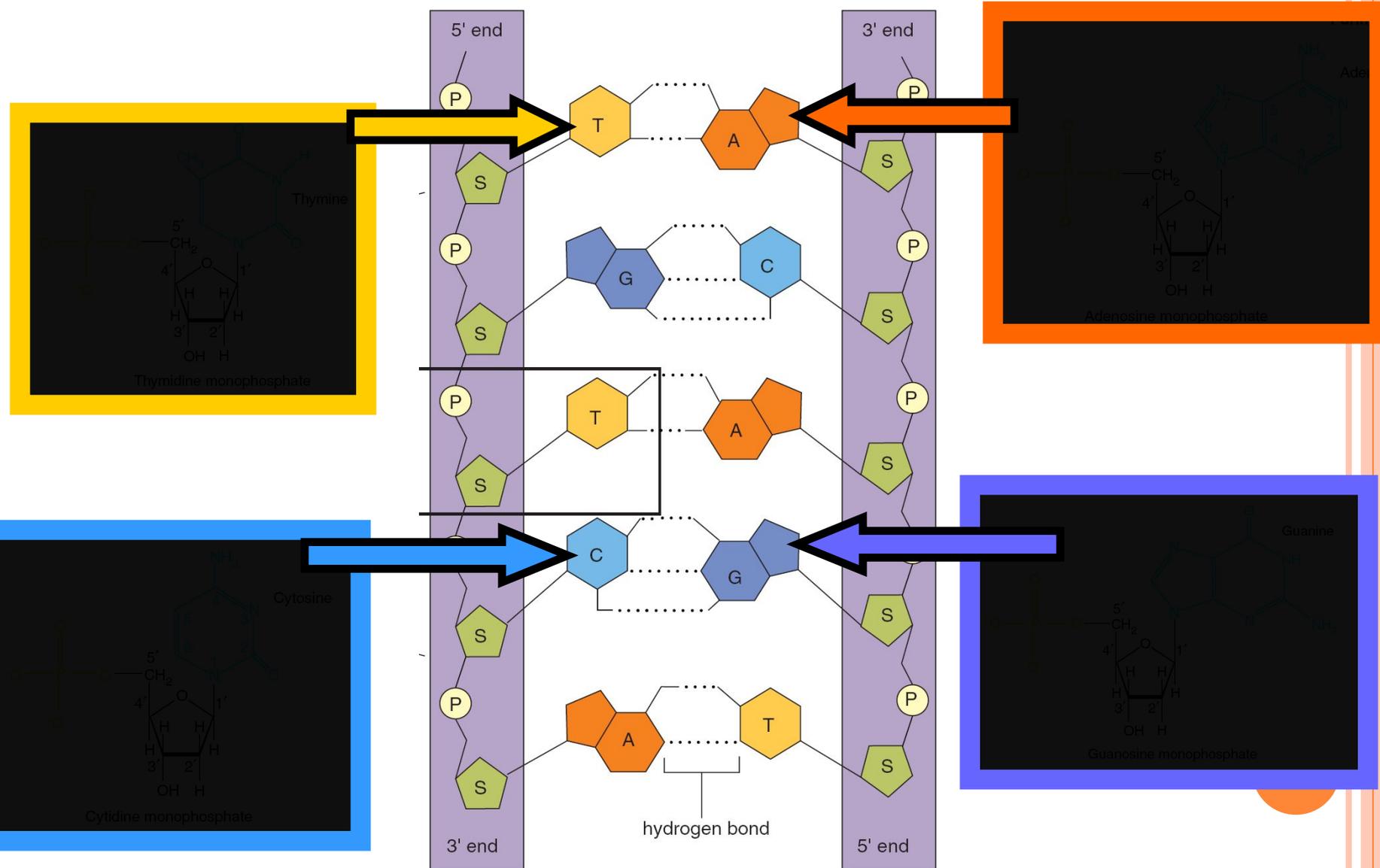
ГЕНОМ



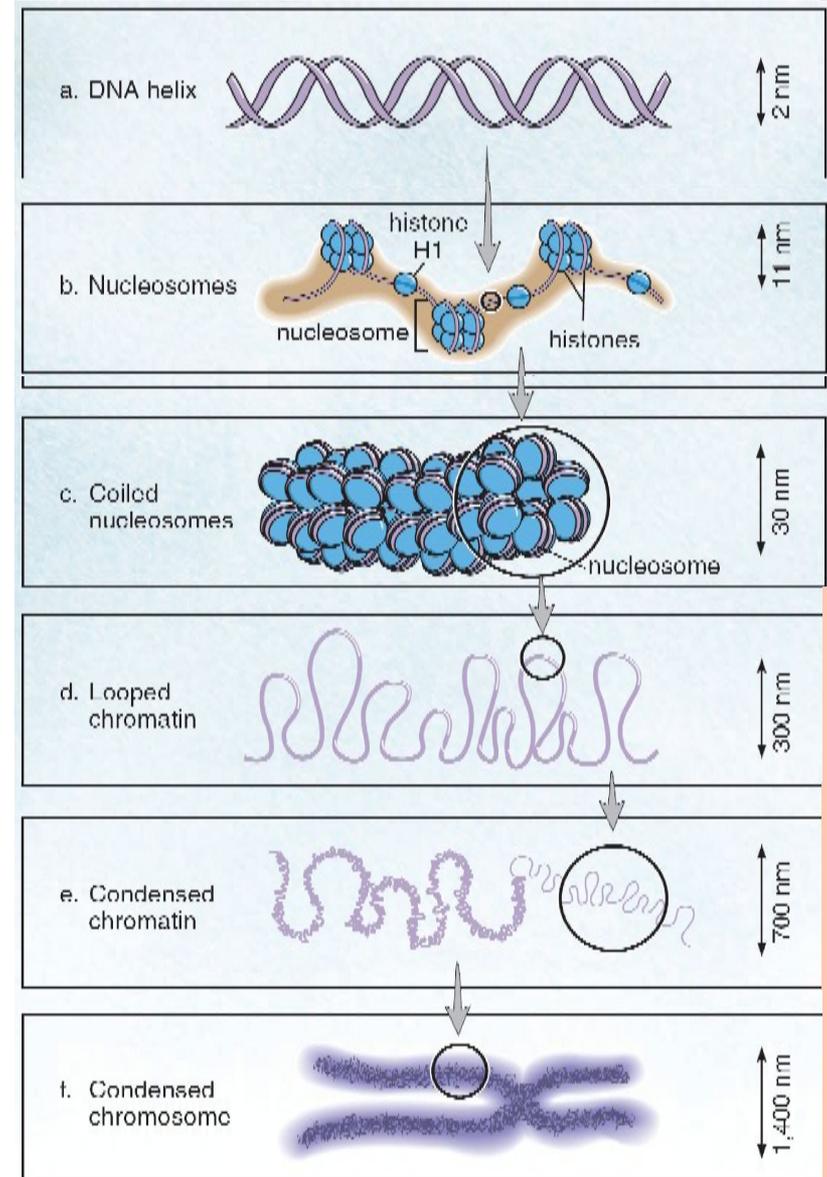
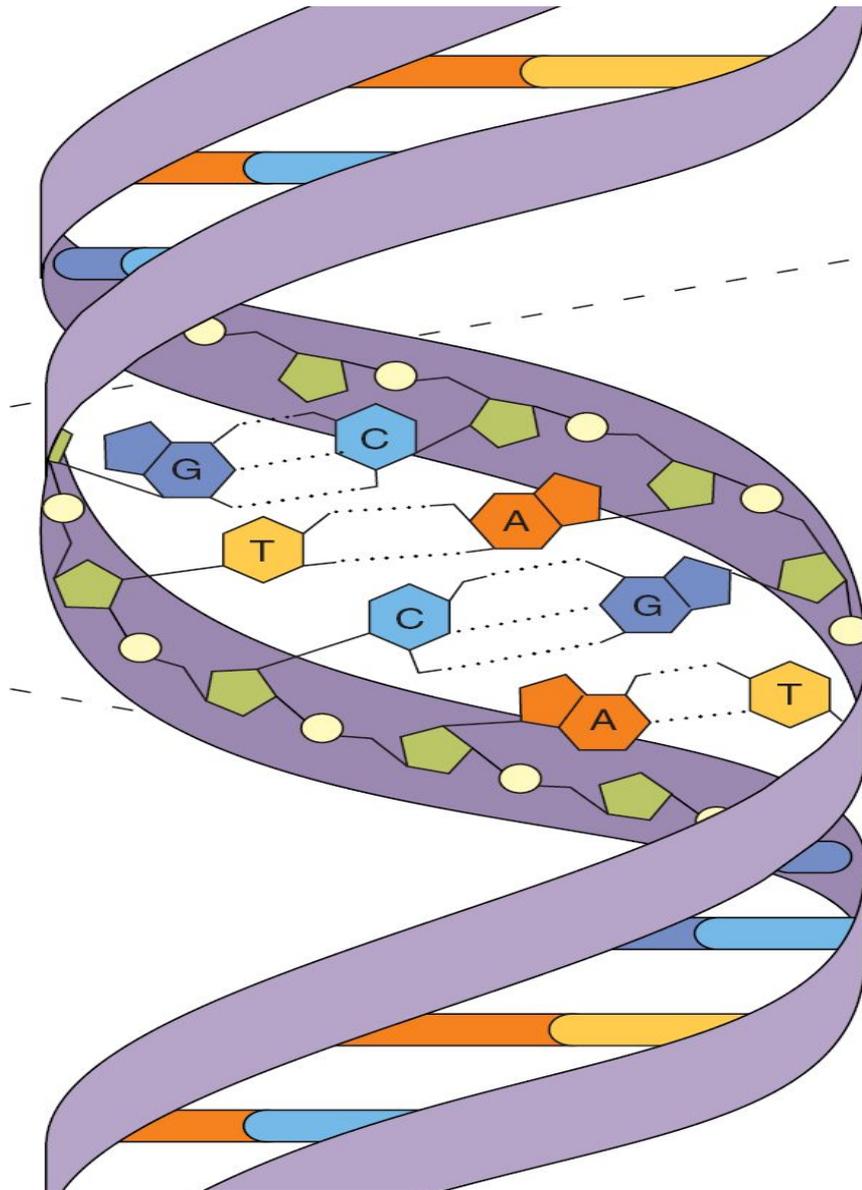
Геном – полный набор генов, содержащий весь объем информации, необходимой для развития организма, его существования в определенных условиях среды и передачи всех наследственных свойств в ряду поколений.



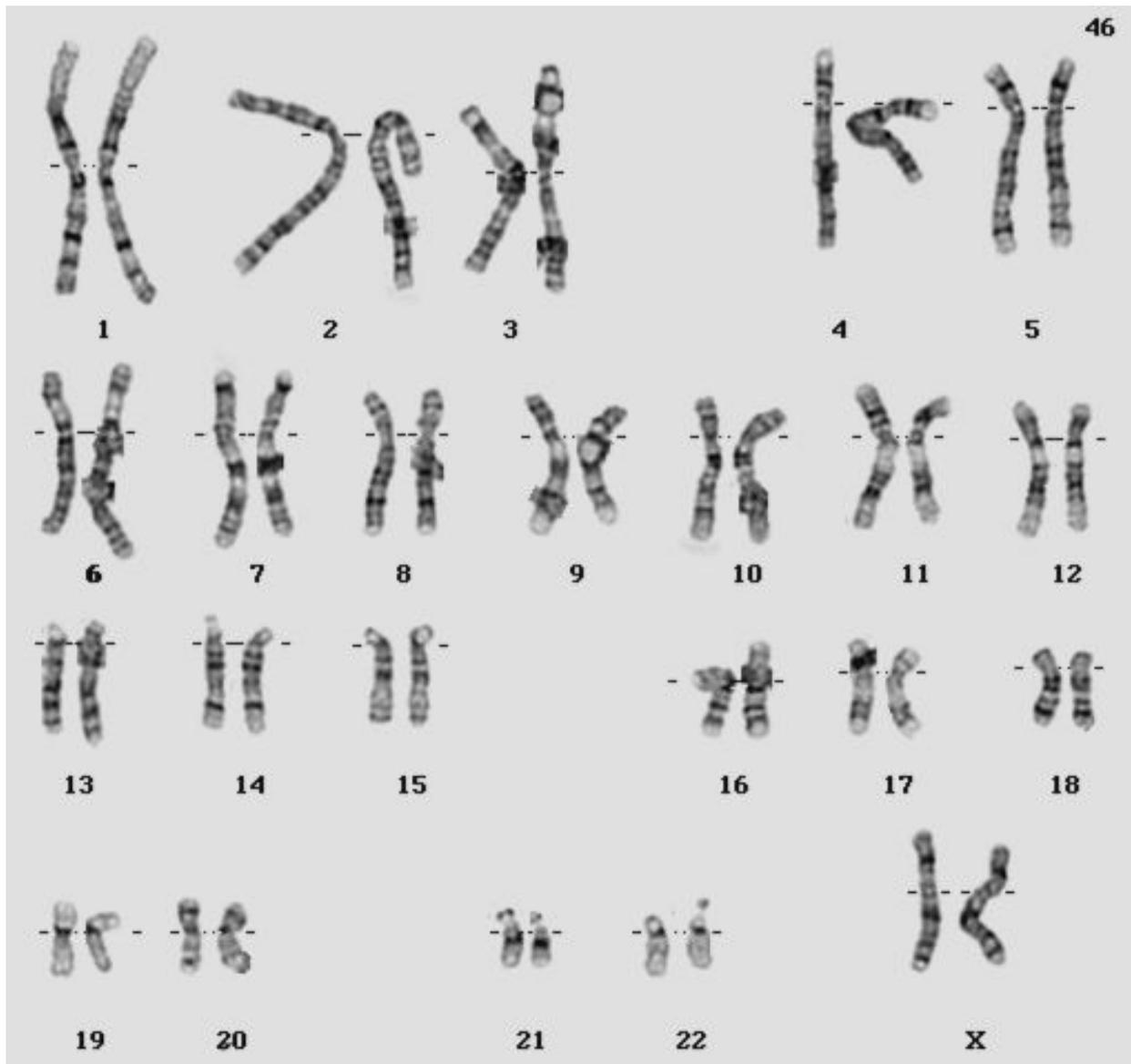
Организация генома: состав и структура ДНК



Организация генома: ДНК – хроматин – хромосома



НОРМАЛЬНЫЙ КАРИОТИП ЧЕЛОВЕКА



● 46, XX (жен.)

или

46, XY (муж.)

● 22 пары

аутосом

2 половые

хромосомы

Гаплоидный

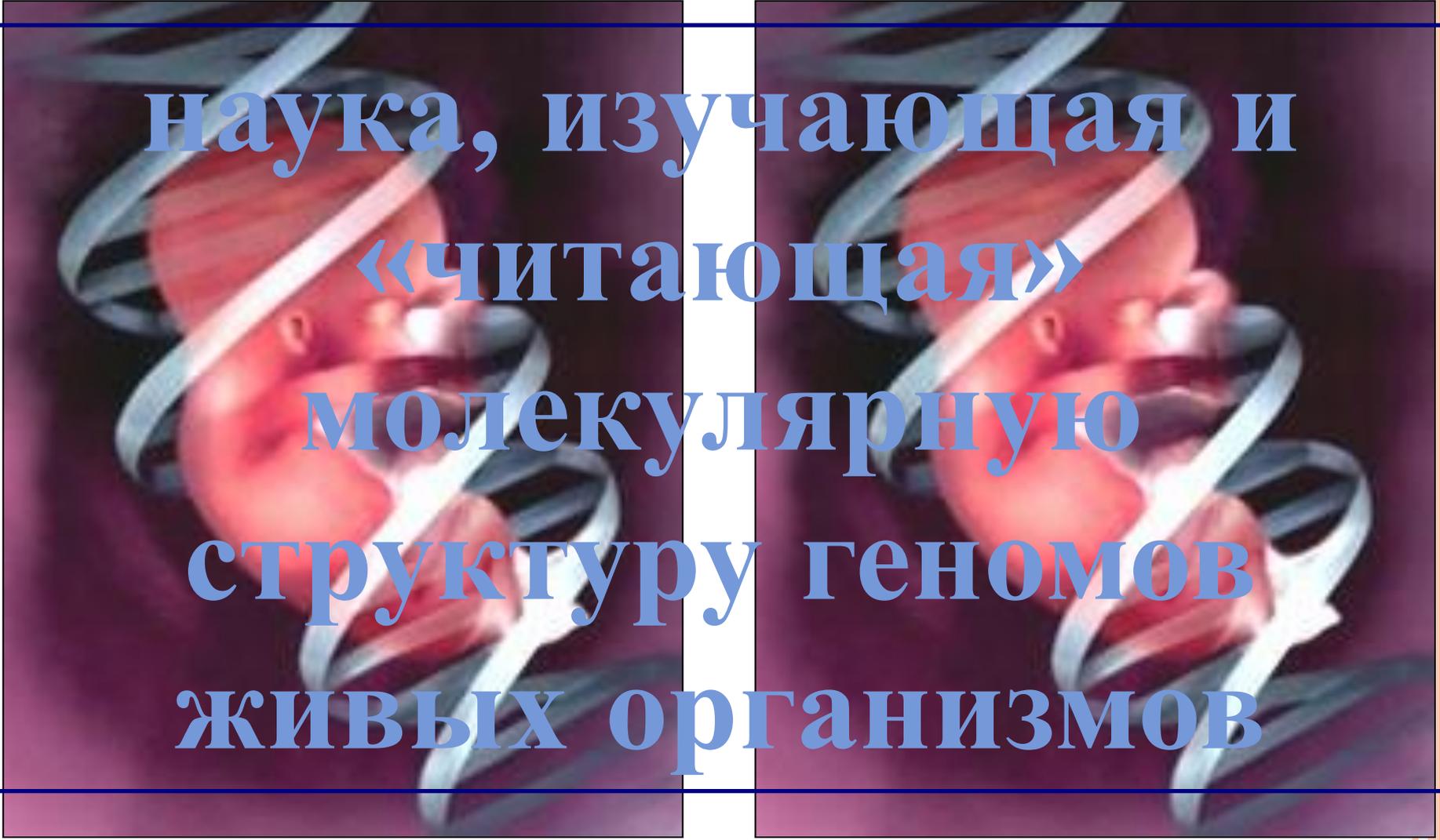
набор (n)

Диплоидный

набор (2n)

ГЕНОМИКА

инструмент молекулярной медицины



**наука, изучающая и
«читающая»
молекулярную
структуру геномов
живых организмов**

Основа геномики –

расшифровка генома человека

Проект «Геном человека» 1990-2003 г («двойная спираль» открыта в 1953 г.!)

Идентификация 3 миллиардов нуклеотидов!!!
Прочтены гены многих наследственных
моногенных заболеваний

Обнаружены естественные вариации генома –
однонуклеотидные замены –

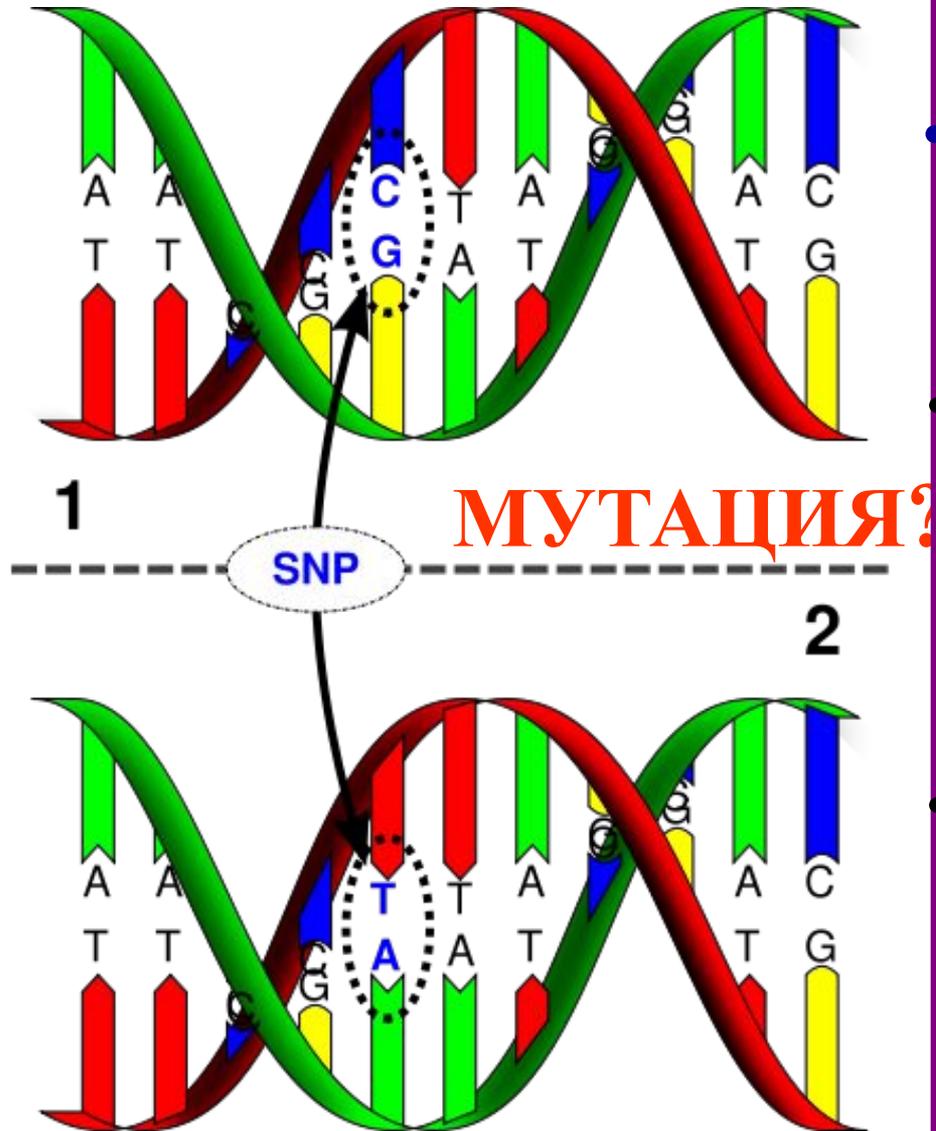
полиморфизмы единичных нуклеотидов –

SNP

Создание карты SNP - до 600 000 вариаций



Естественные Вариации Генома???



- **Моногенные болезни чаще всего вызваны мутацией одного гена – однонуклеотидными заменами.**
- **Для этих болезней характерно менделевское наследование – аутосомно-доминантное, аутосомно-рецессивное и X-сцепленное.**
- **Муковисцидоз, Фенилкетонурия, Спинальные амиотрофии, Нейросиндромальная тугоухость**

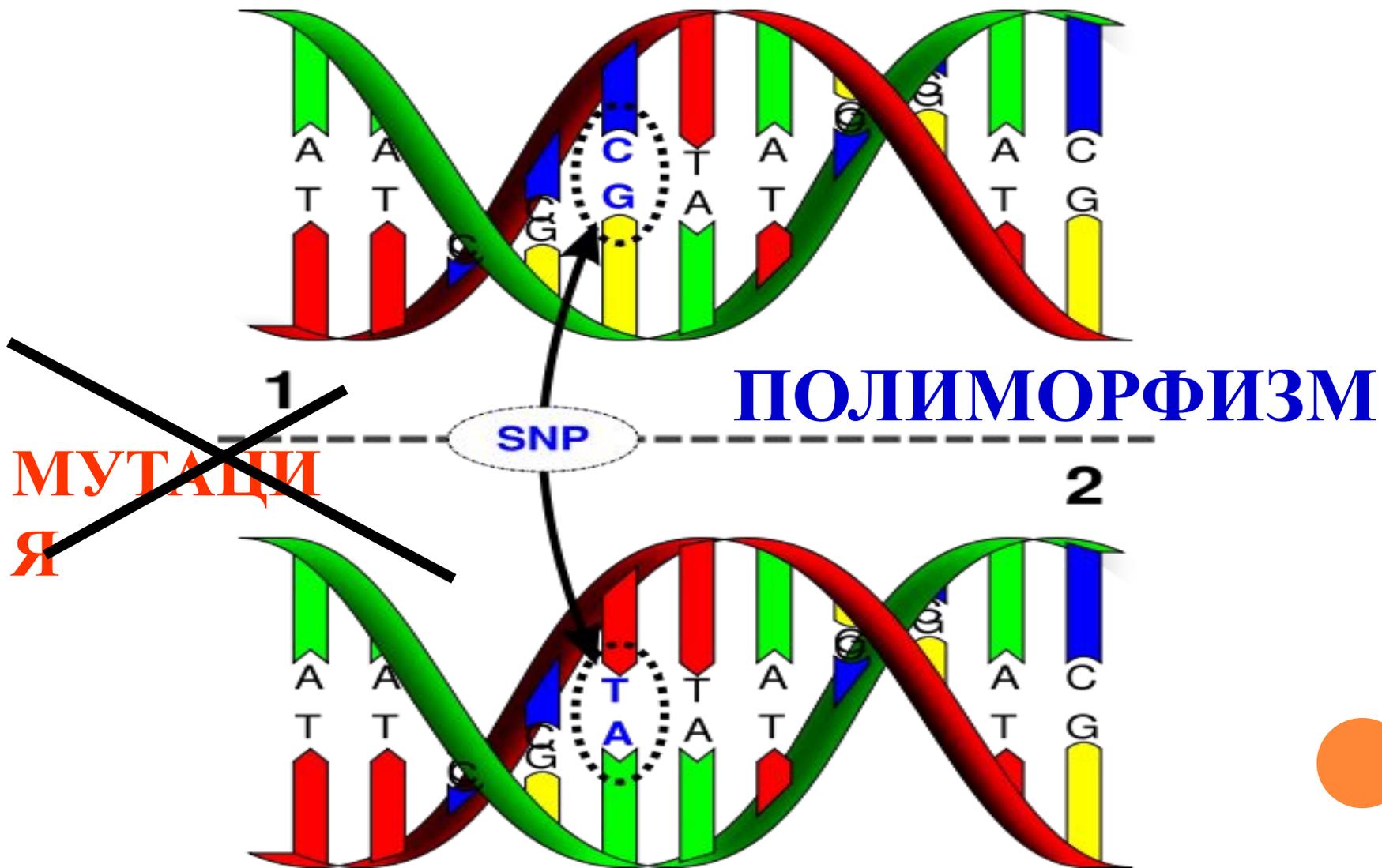
Мутации и естественные вариации генома - полиморфизмы

Мутация – это изменение в последовательности нуклеотидов ДНК, встречающиеся в популяции с частотой менее 1% и приводящие к состоянию несовместимому с жизнью, либо ведущему к неэффективному функционированию генома (моногенные болезни).

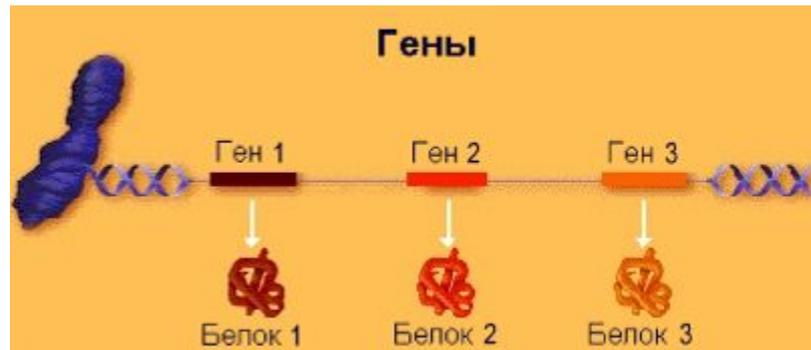
Полиморфизм – это «мутации», встречающиеся в популяции с частотой 2% и выше и проявляющиеся в фенотипе не столь очевидно, и не приводящие к заметным нарушениям функции гена.



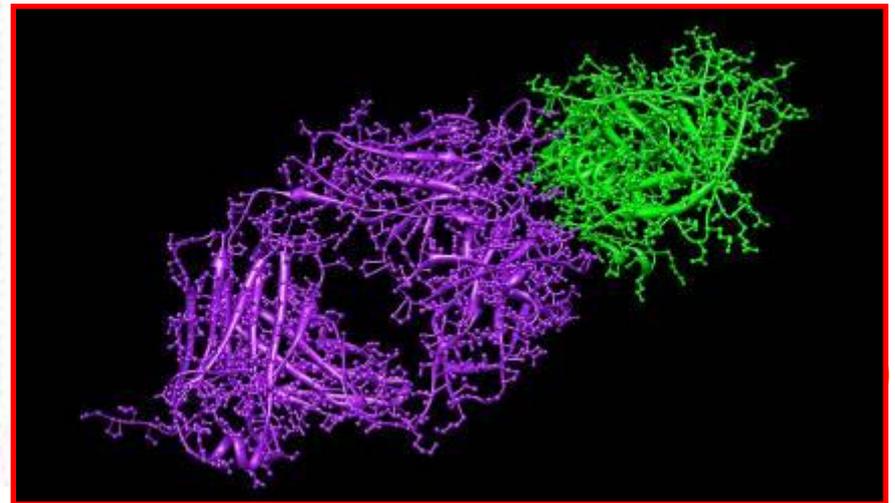
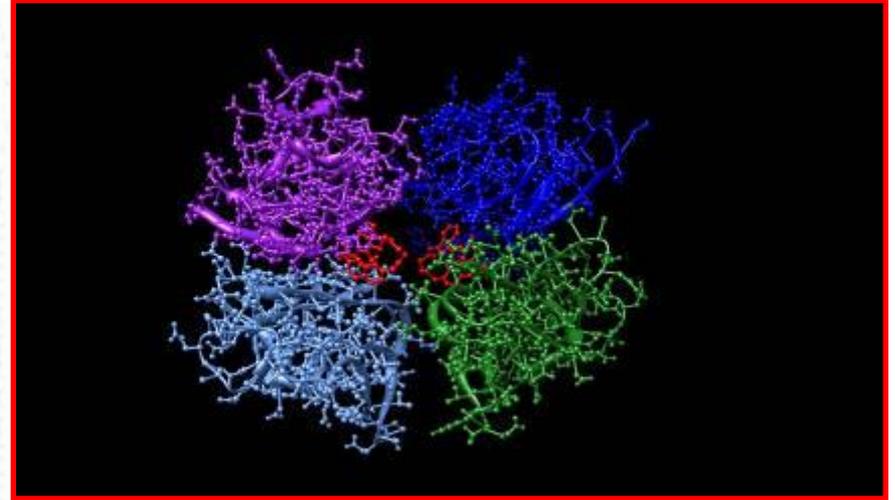
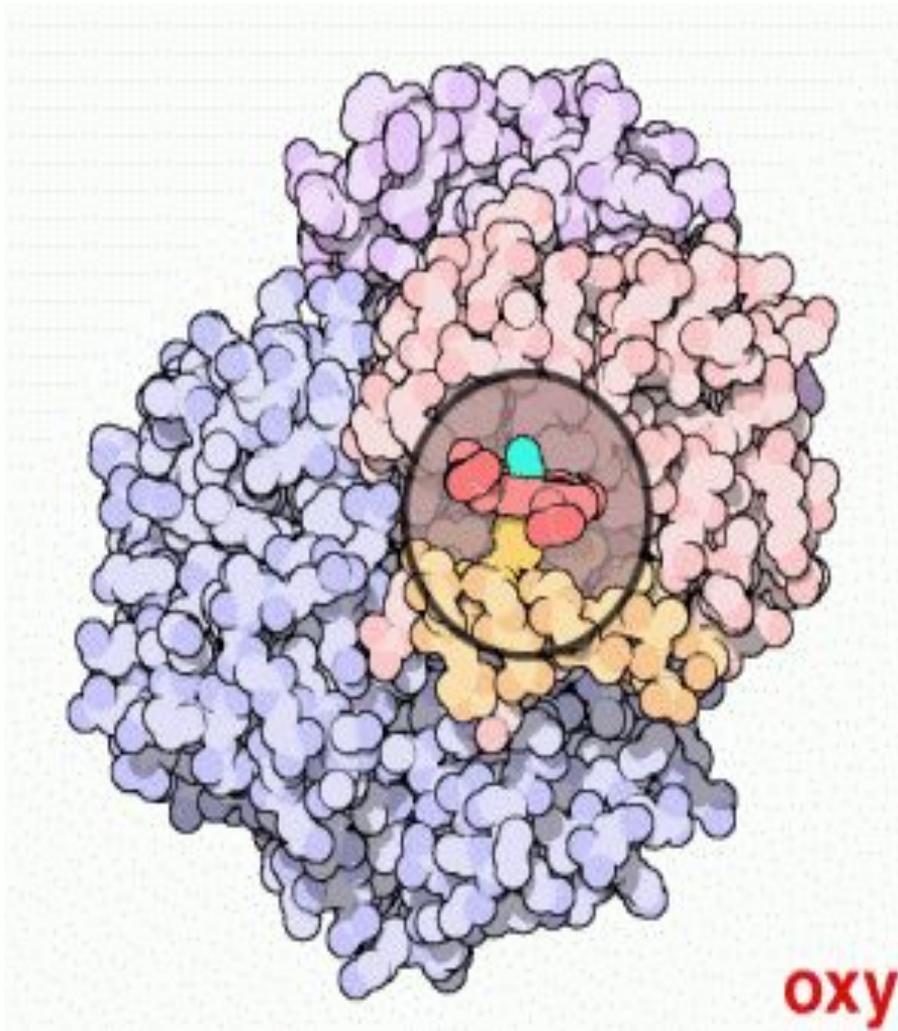
Естественные Вариации Генома



ГЕНЫ КОДИРУЮТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ АМИНОКИСЛОТ В БЕЛКАХ



SNP – молекулярные свойства белка



SNP – молекулярные свойства белка

**SNP – приводят к
появлению белковых
продуктов с незначительно
измененными физико-
химическими свойствами**



SNP – молекулярные свойства белка

□ **Конформация** - 3D - формы молекул, которые могут динамически изменяться в пространстве.

□ **Аффинность** - термодинамическая характеристика, количественно описывающая силу взаимодействия антигена и антитела или лиганда и рецептора.

□ **Связь с субстратом** - величина, характеризующая прочность связи между ферментом и субстратом (насыщение химической реакции, обусловленная соотношением между концентрацией субстрата и скоростью реакции)

□ **Температурный оптимум активности фермента**

□ **Время «жизни» молекулы**

□ **Посттрансляционная модификация** – достройка белковой молекулы углеводными, липидными и пр. молекулярными компонентами.

□ **Избыточный синтез белка** – нарушение регуляции

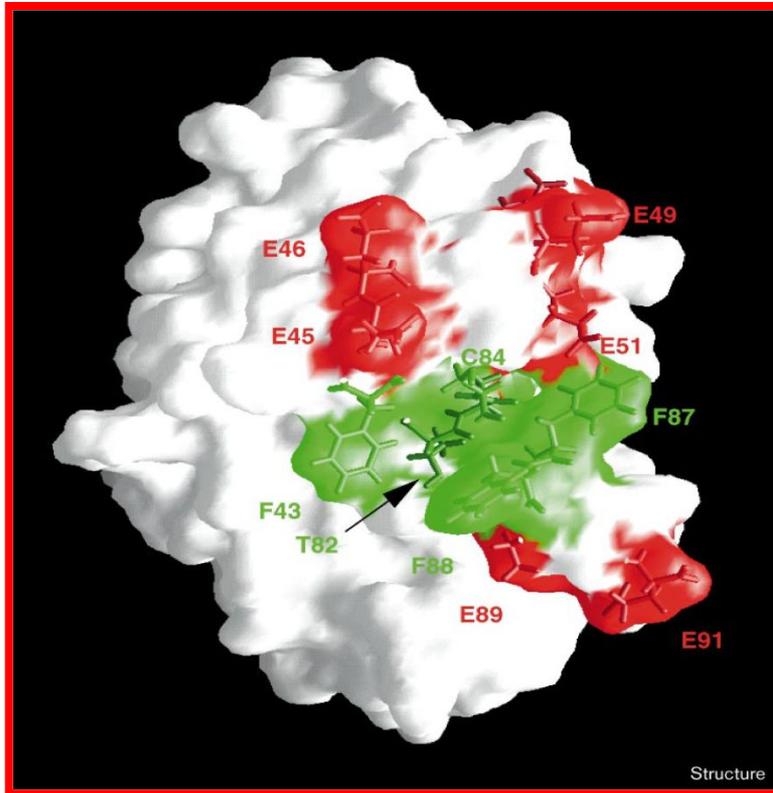


Как это представить?

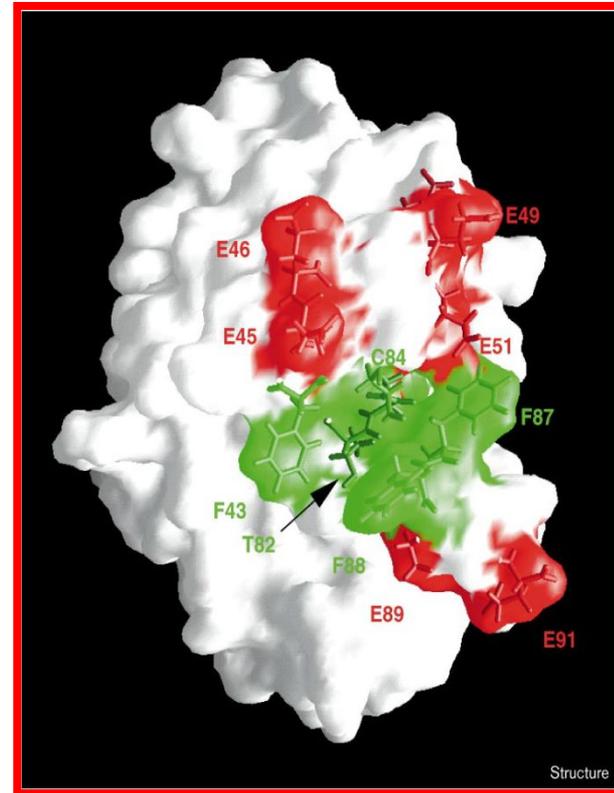
МУТАЦИЯ!!!-моногенное заболевание!!!



Нормальный белок



Полиморфизм



Как это представить (по другому)?

МУТАЦИЯ!!!-моногенное заболевание!!!



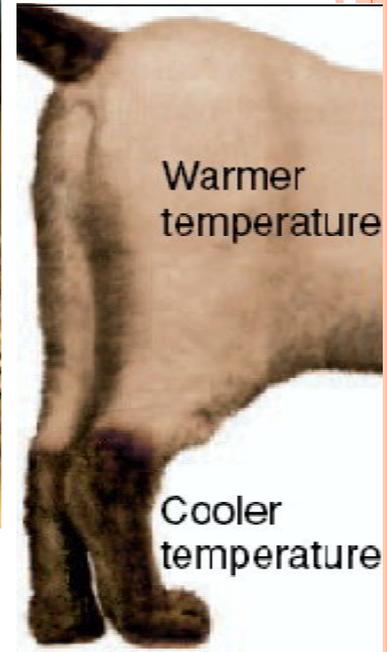
Норма



Полиморфизм



Как это увидеть?

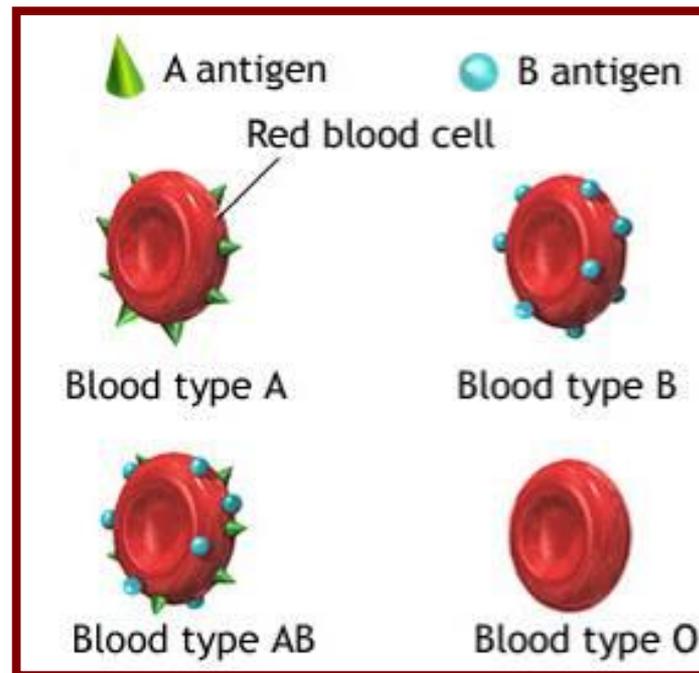




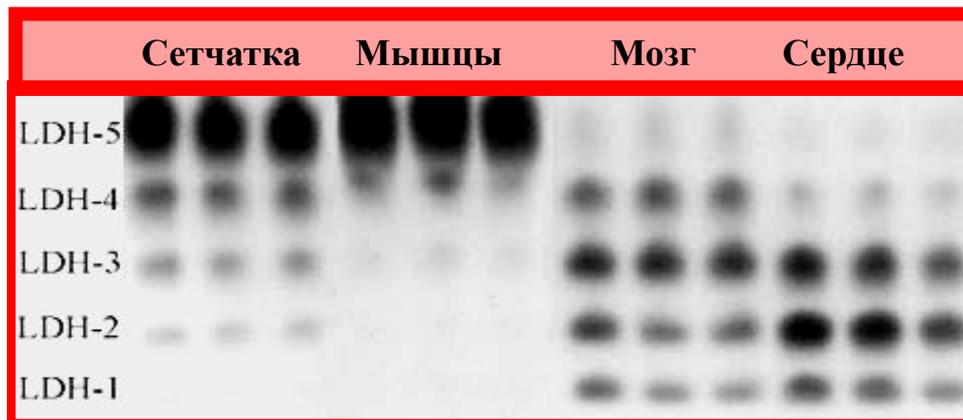
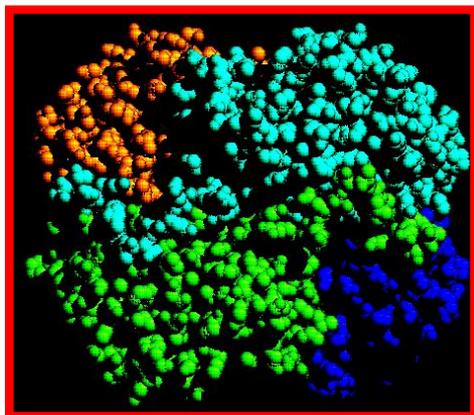
Цвет глаз



Группы крови



Изоферменты лактатдегидрогеназы



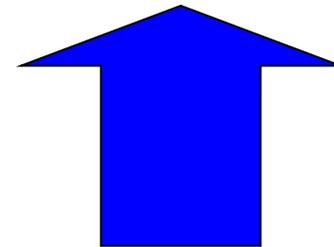
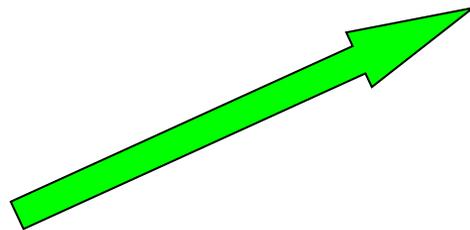
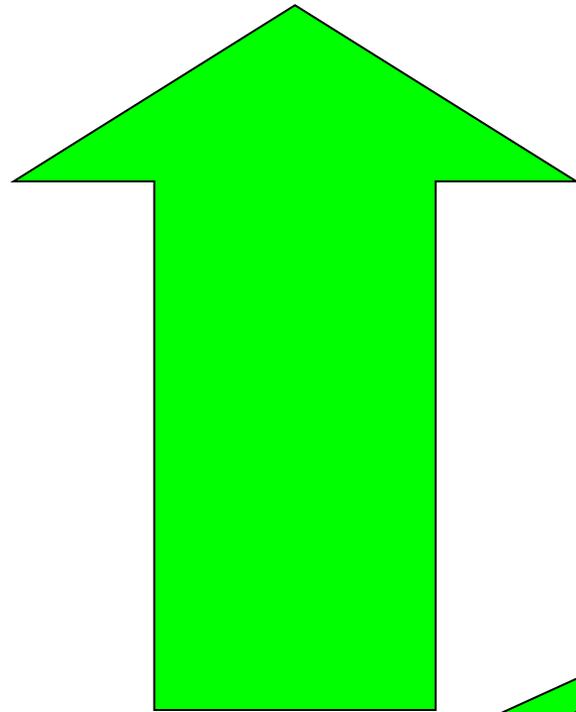
Геномика и болезни цивилизации

Моногенные болезни

Сахарный диабет , подагра , гипертоническая болезнь , ИБС, тромбофилии, язвенная болезнь, астма и онкопатология , нейродегенеративные заболевания, проблемы репродуктивного здоровья.

Наследственность

Окружающая среда





ГЕНОМИКА

Индивидуальный подход к человеку на основе его генетической уникальности **позволяет предсказывать:**

особенности строения и жизнедеятельности организма

развитие патологии и проводить устранение опасных факторов окружающей среды до возникновения болезни

• **Болезнь – любое патофизиологическое состояние, увеличивающее вероятность смерти.**



Относительный риск (OR) и ГЕНОМИКА

- Степень **взаимосвязи** между наличием генетического фактора и риском развития заболевания.
- Величина OR указывает, **во сколько раз** риск данного заболевания выше у носителей данного генетического фактора, чем у лиц, не имеющих данного генетического фактора.



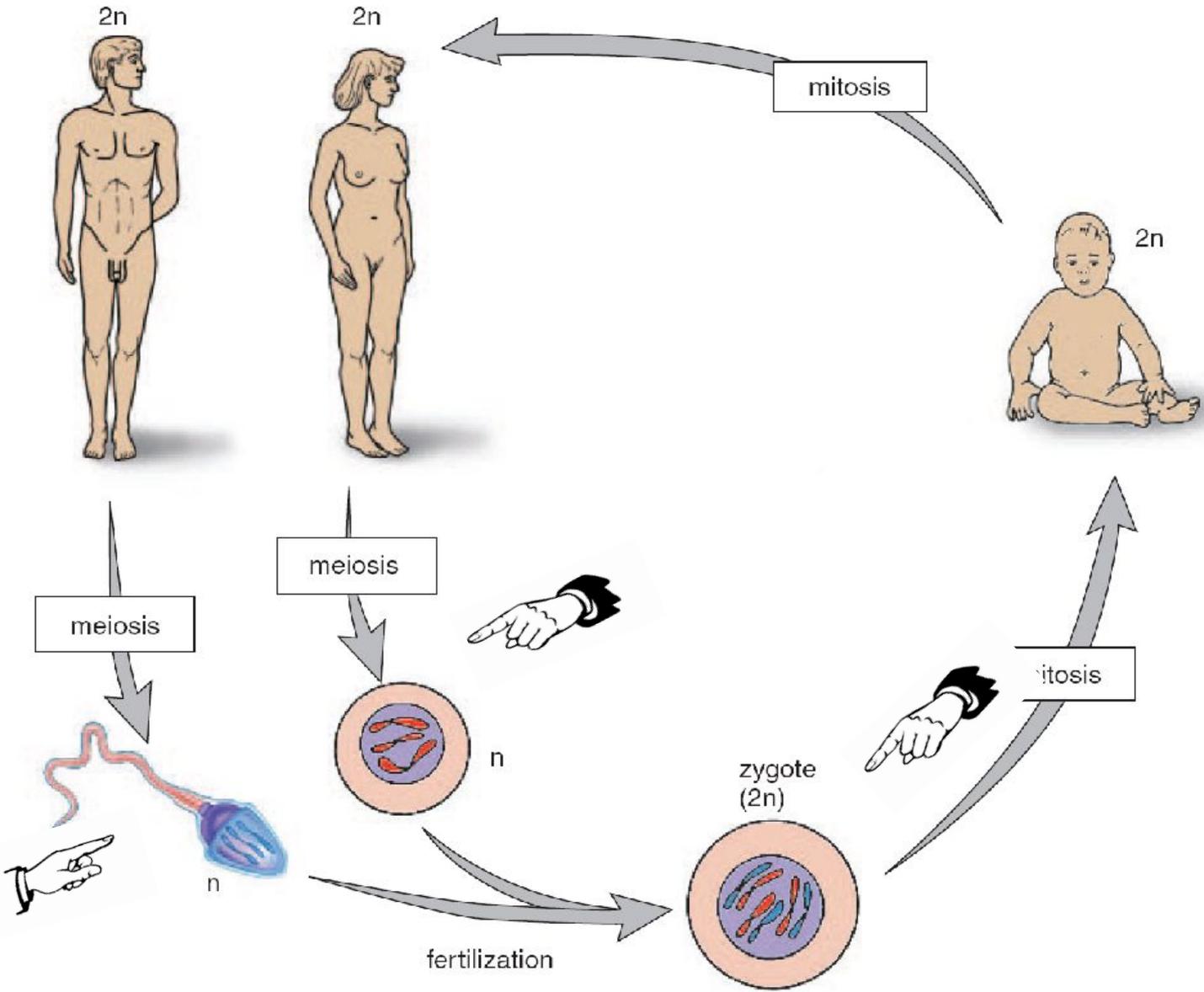


КРИТЕРИИ ВЫБОРА КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ

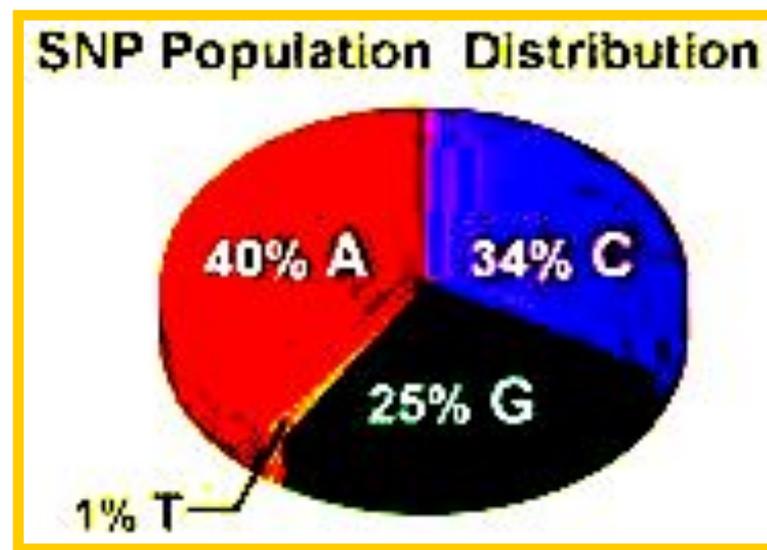
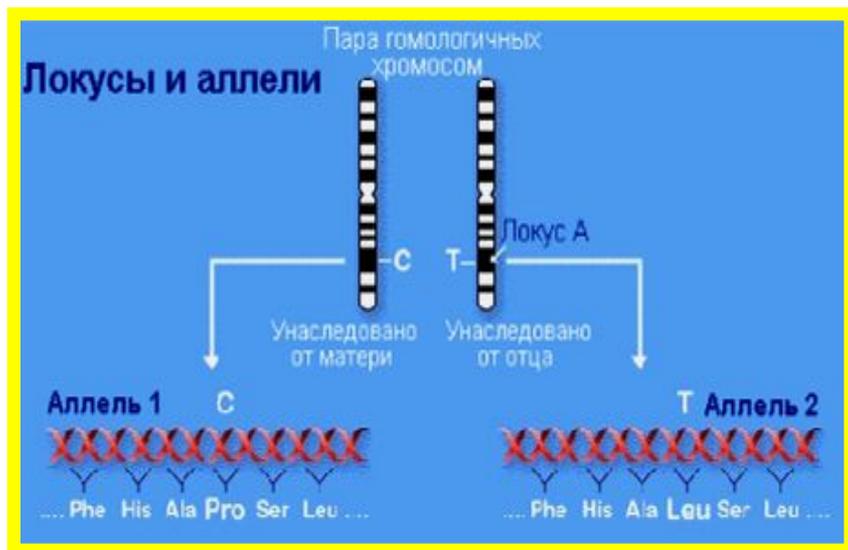
- ✓ Белок, кодируемый геном участвует в патогенетическом пути развития заболевания
- ✓ **Полиморфный аллель изменяет структуру и/или функциональную активность белка**
- ✓ Достоверные ассоциации заболевания с данным генетическим вариантом показаны несколькими независимыми группами исследователей (+ метаанализ)



У каждого двойной «комплект» генов



АЛЛЕЛЬ (от греч. *allelon* - друг друга, взаимно) - различные формы одного и того же гена, расположенные в одинаковых локусах (участках) гомологичных (парных) хромосом, контролирующие один и тот же белок. Все гены любых клеток, за исключением генов, расположенных в половых хромосомах, представлено двумя аллелями, один из которых унаследован от отца, а другой - от матери.



CCGAAATTTTTCGTC CAGCATA CGTACCA
 CCGAAATTTTTCGTA CAGCATA CGTACCA
 CCGAAATTTTTCGTT CAGCATA CGTACCA
 CCGAAATTTTTCGTT G CAGCATA CGTACCA





ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ И ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К МУЛЬТИФАКТОРНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ: ПРИНЦИПЫ

- ❖ **Распространенность SNP зависит от географии и этнической принадлежности.**
- ❖ **SNP – либо предрасполагают, либо препятствуют проявлению и развитию заболевания.**
- ❖ **Гены аллельные варианты которых содержат SNP и при наличии определенных условий (диета, экология, вредные привычки, образ жизни, лекарства) предрасполагают к определенным мультифакторным заболеваниям – гены предрасположенности.**
- ❖ **Сочетание аллельных вариантов генов с SNP, вовлеченных в развитие конкретной патологии – «генные сети». У гомозигот риск развития заболевания выше, чем у гетерозигот.**



Профили обследования SNP

□ Системы свёртывания крови и фибринолиза

Лейденская мутация (коагуляционный фактор V)	F5	Arg506Gln (LEIDEN)
Мутация протромбина (коагуляционный фактор II)	F 2	20210 G/A
Мутация 1 метилентетрагидрофолатредуктазы	MTHFR	Ala222Val (C677T)
Мутация 2 метилентетрагидрофолатредуктазы	MTHFR	Glu429Ala 1298 A>C
Мутация редуктазы метионинсинтазы	MTRR	Ile22Met (66 a-g)
Мутация метионинсинтазы	MTR	Asp919Gly
Мутация коагуляционного фактора F VII	F7	Arg353Gln
Мутация промотора гена коагуляционного фактора FVII	F7	-323 ins 10 bp (аллель A2)
Мутация интегрина, бета-3 (тромбоцитарный рецептор фибриногена)	ITGB3	Leu33Pro
Мутация-1 интегрина альфа-2 (тромбоцитарный рецептор коллагена)	ITGA2	C807T
Мутация тромбоцитарного гликопротеина 1b, α -субъединицы	GP1BA	Thr145Met
Мутация АДФ-рецептора тромбоцитов	P2RY12	H1/H2
Мутация фибриногена, бета	FGB	-455G-A
Мутация ингибитора активатора плазминогена SERPINE (PAI) 1	SERPINE (PAI) 1	-675 5G/4G

Профили обследования SNP

Сердечно-сосудистые заболевания - гипертензия

Инсерция/делеция Alu-элемента в гене ангиотензин-превращающего фермента *Постановка по отдельной методике	<i>ACE</i>	Alu Ins/Del I>D
Мутация ангиотензиногена 1	<i>AGT</i>	Thr174Met
Мутация ангиотензиногена 2	<i>AGT</i>	Met235Thr
Мутация рецептора 1-го типа ангиотензиногена-2	<i>AGTR1</i>	A1166C
Мутация 1 синтазы окиси азота 3	<i>NOS3</i>	C786T
Мутация АМФ-дезаминазы 1	<i>AMPD1</i>	Gln12Ter



ПРОФИЛИ ОБСЛЕДОВАНИЯ SNP

- ▣ Сердечно-сосудистые заболевания – нарушения липидного обмена

Мутация липопротеиновой липазы	<i>LPL</i>	S447X
Мутация аполиipoproteина E	<i>APOE</i>	Leu28Pro
Мутация параоксоназы 1	<i>PON1</i>	Gln192Arg
Мутация аполиipoproteина C3	<i>APOC3</i>	C3238G (аллель SstI или S2)
Мутация - 1 печеночной липазы	<i>LIPC</i>	-250 G>A
Мутация - 2 печеночной липазы	<i>LIPC</i>	C-514T
Мутация рецептора к глюкагону	<i>GCCR</i>	A1220G Asn363Ser
Мутация 4 С-реактивного белка	<i>CRP</i>	A-717G



ПРОФИЛИ ОБСЛЕДОВАНИЯ SNP

- ▣ **Индивидуальное лекарство – подбор дозы варфарина (антикоагулянтов ряда кумарина)**

Чувствительность к варфарину-1 Аллель CYP2C9*2	<i>CYP2C9</i>	Arg144Cys
Чувствительность к варфарину-2 Аллель CYP2C9*3	<i>CYP2C9</i>	Ile359Leu
Мутация – 1 эпоксидредуктазы витамина К (чувствительность к варфарину)	<i>VKORC1</i>	C1173T
Мутация – 2 эпоксидредуктазы витамина К (резистентность к варфарину)	<i>VKORC1</i>	G3730A
Мутация - 3 эпоксидредуктазы витамина К	<i>VKORC1</i>	G3673A

- ▣ Полимеразная цепная реакция (ПЦР) -метод молекулярной диагностики, применяемый в клинической практике для обнаружения специфической НК возбудителя в исследуемом материале.



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



ПРИНЦИП МЕТОДА

- Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка НК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*).



МЕТОДИКА ПЦР

1. Выделение ДНК
2. Амплификация ДНК
3. Детекция ДНК



- *Преаналитический этап*

сбор, хранение, транспортировка

- *Выделение НК*

экспресс-методы, универсальные методы

- *Сборка амплификационной смеси*

- *Амплификация*

денатурация, отжиг, элонгация

- *Детекция*

электрофорез, конечная точка, real-time



ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП В ПЦР

Цели

- Правильное определение информативного для ПЦР вида биологического материала.
- Сохранение ДНК возбудителя в материале до момента доставки в лабораторию.
- Препятствие попаданию в материал ингибиторов ПЦР-реакции.
- Предварительная очистка материала для облегчения выделения из него ДНК возбудителя.



МАТЕРИАЛ

- ✓ соскоб эпителиальных клеток
- ✓ моча
- ✓ секрет простаты
- ✓ эякулят
- ✓ цельная венозная кровь
- ✓ мокрота
- ✓ СПИНО-МОЗГОВАЯ ЖИДКОСТЬ, выпоты, слюна и проч.

▣ **Все, что содержит ДНК!**



**подготовка
пациента**

прием системных
препаратов

местная терапия

состояние пациента

**взятие образца
для исследования**

протоколы взятия для разных
видов биологических сред

**условия транспортировки
и хранения образцов**

транспортные среды

температурный режим

сроки доставки

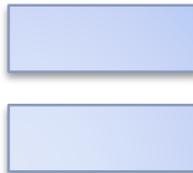
ИНГИБИТОРЫ ПЦР

1. Гепарин
2. Соли тяжелых металлов
3. Слизь
4. Кровь (гемоглобин)
5. Некоторые лекарственные формы
6. Мочевая кислота и ее соединения



ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

- Экспресс-методы (термический)



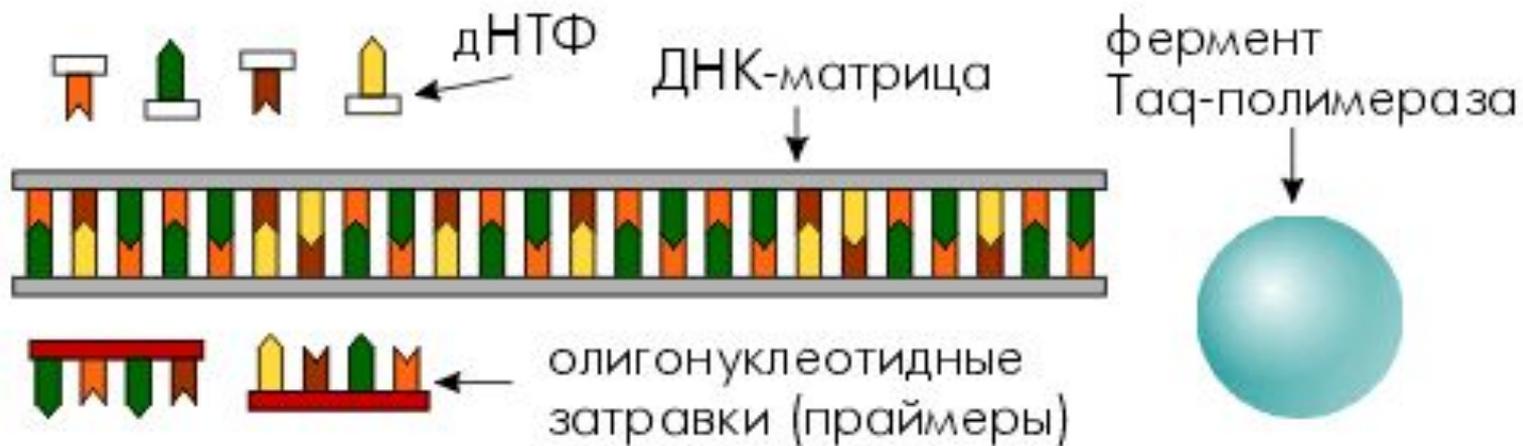
СОРБЕНТНЫЙ МЕТОД

Классический сорбентный метод

Преимущества: - чистота выделенной НК
- универсальность
использования

Недостатки: - длительность
- трудоемкость





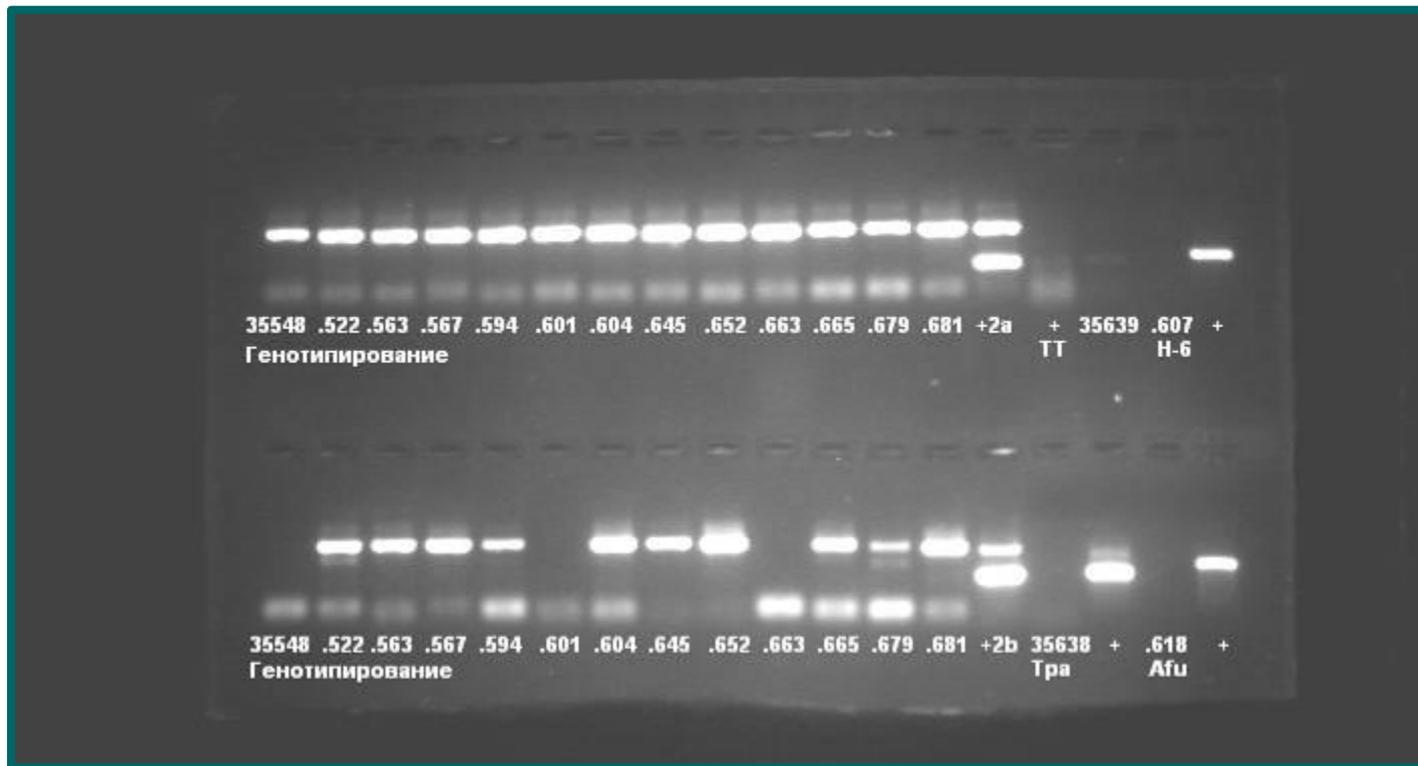
Исходные компоненты ПЦР



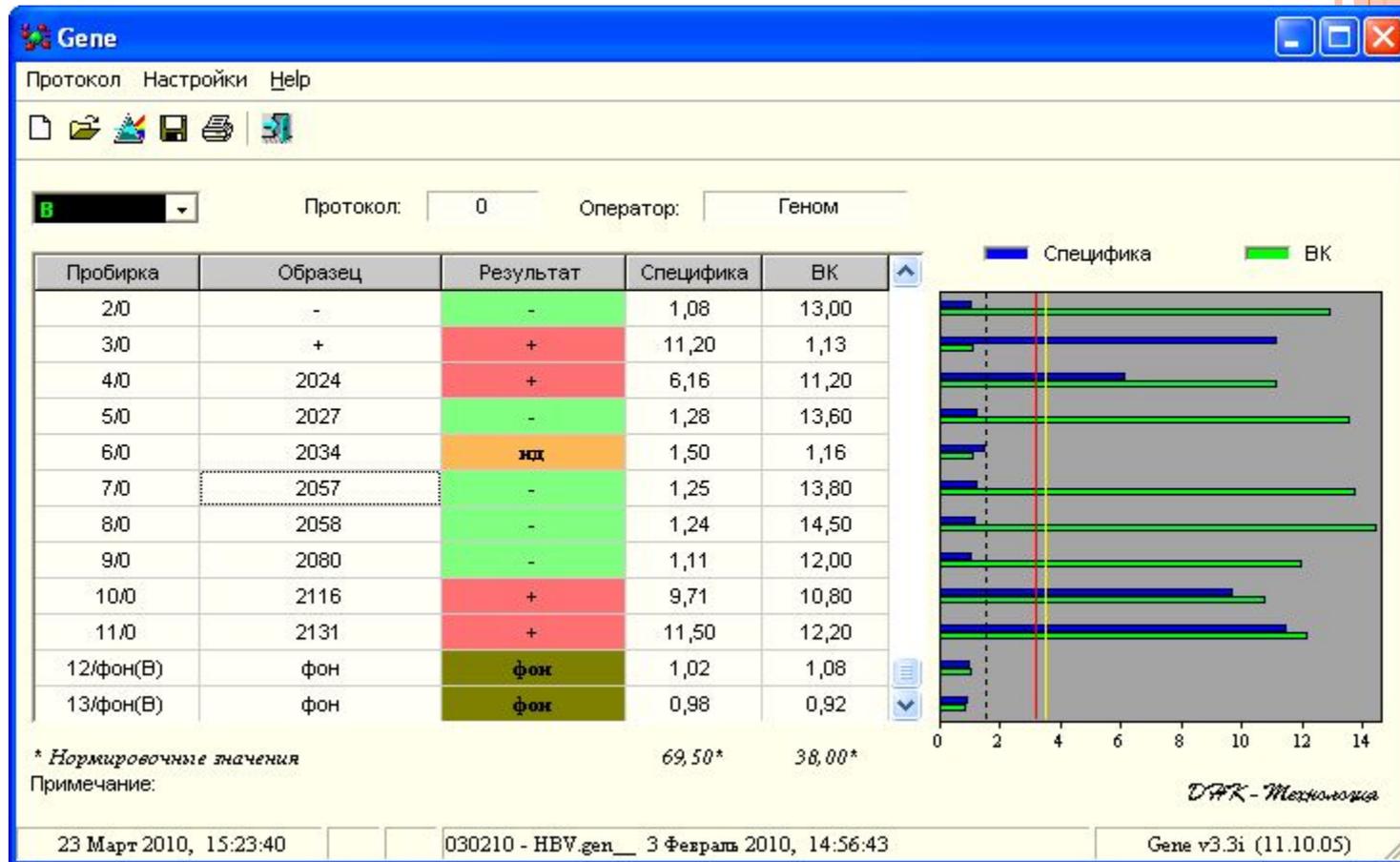
АМПЛИКАЦИЯ



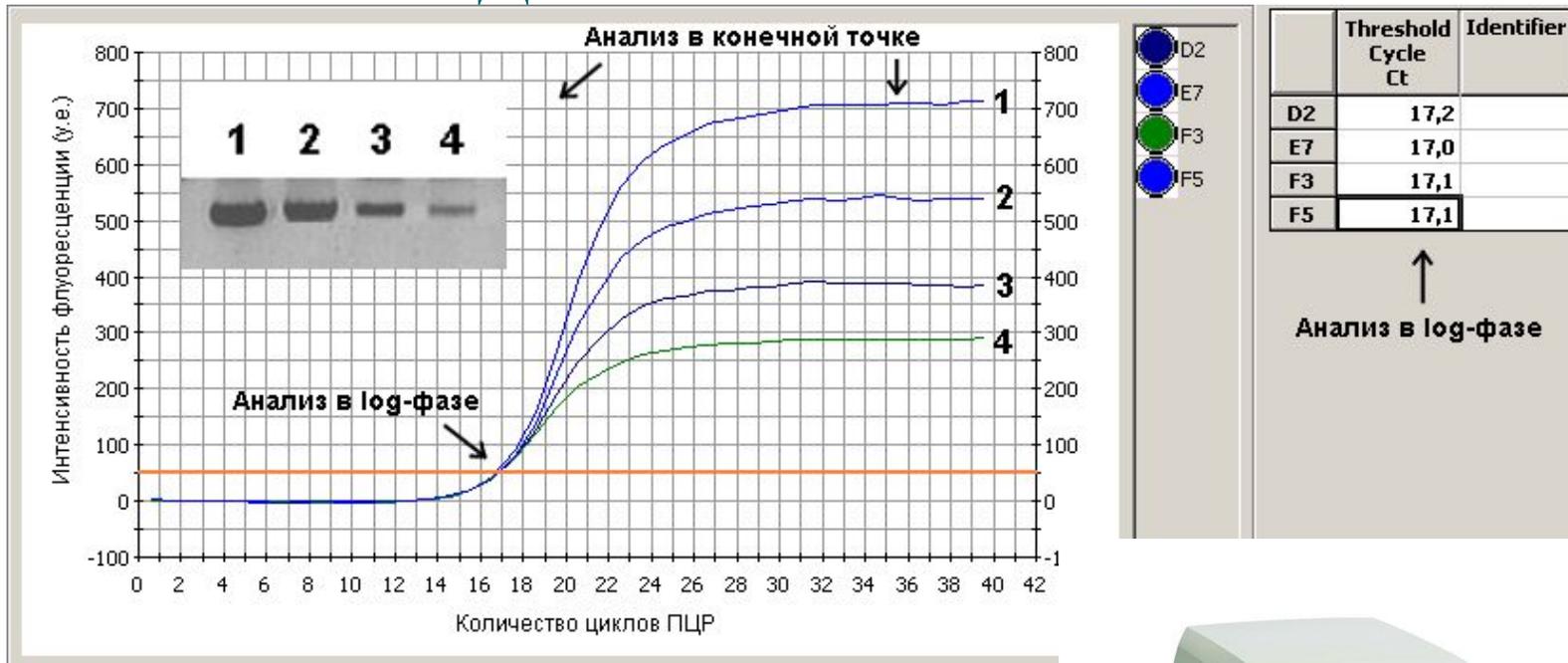
ДЕТЕКЦИЯ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА



ДЕТЕКЦИЯ ПО КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ



РЕЗУЛЬТАТЫ ПЦР НА ОБРАЗЦАХ С ОДИНАКОВЫМ КОЛИЧЕСТВОМ ДНК



ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отрицательный ответ

1. НК возбудителя не обнаружено
2. Концентрация НК ниже 1000 ДНК-копий/мл
3. Неправильно выбран материал для исследования

Положительный ответ

- Присутствие НК возбудителя
- Присутствие фрагментов НК возбудителя



ПРЕИМУЩЕСТВА ПЦР-МЕТОДА

- *Прямое определение наличия возбудителей.*
- *Высокая специфичность.*
- *Высокая чувствительность.*
- *Универсальность процедуры выявления различных возбудителей.*
- *Высокая скорость получения результата анализа*





Спасибо за внимание!

