

«Генетическое тестирование с помощью ПЦР: Для кого? Как? Зачем?»



к.б.н. Маценко Н.Ю.
АО «Вектор-Бест»

Персонализированная медицина: уроки будущего



«Мы входим в новую эру — персонифицированной, профилактической и предиктивной медицины, основанной на новых биомедицинских методах и разработкахВнедрение этих подходов приведет к смене социально-экономического уклада общества».

Министр здравоохранения РФ, чл.-корр.
РАН, проф. В.И. Скворцова, Совет
Федерации, март 2015 г.

Развитие персонализированной медицины закреплено в правовом акте «Стратегия развития медицинской науки РФ до 2025 г.»

Персонализированная медицина –
подход к улучшению качества медицинской
помощи и функционирования системы
здравоохранения путем использования
информации о биомаркерах и «молекулярных
путях» заболевания, геномики, протеомики и
метаболомики.

Генетическое тестирование

- методика, позволяющая определить повреждения молекулы ДНК, которые могут приводить к тяжелым и неизлечимым заболеваниям.

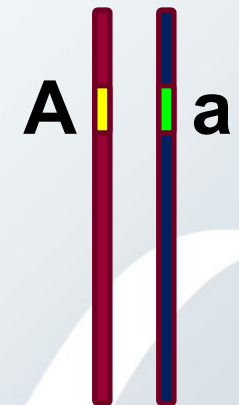
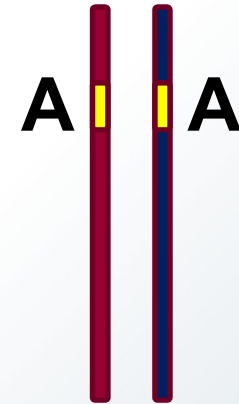
Генетика человека

- Размер генома $3 \cdot 10^9$ п.н., около 30 тыс. генов;
- Гены расположены в хромосомах, 23 пары;
- Набор хромосом двойной (один материнский, другой отцовский);



Генетика человека

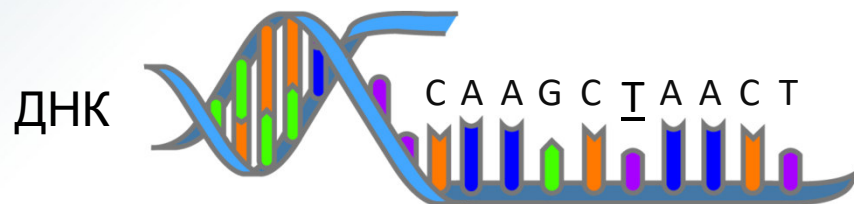
- **Гомозигота** – клетка (или организм), содержащая два одинаковых аллеля в конкретном локусе гомологичных хромосом (**АА**, **аа**)
- **Гетерозигота** – организм, имеющий две различные формы данного гена (разные аллели) в гомологичных хромосомах (**Аа**)



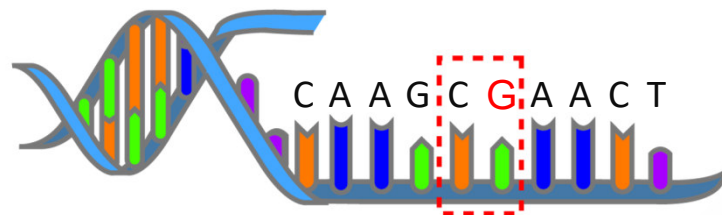
Генетика человека

- **Доминантный аллель** – аллель, подавляющий проявление другого аллельного варианта гена, проявляется в фенотипе как в гомозиготе, так и в гетерозиготе
- **Рецессивный аллель** – аллель, проявляющийся в фенотипе только в гомозиготе
- **Неполное доминирование** – оба аллеля в гетерозиготе дают свой вклад в формирование фенотипа

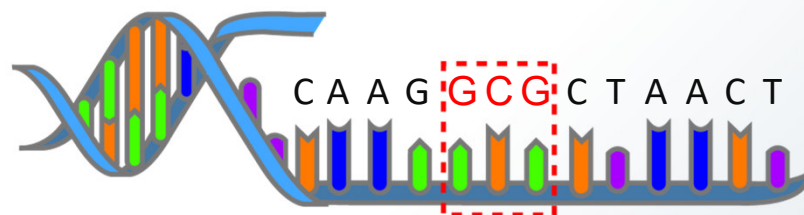
Точечные мутации в ДНК (single nucleotide polymorphism, SNP)



Нормальный ген



Замена
нуклеотидного
основания



Инсерция



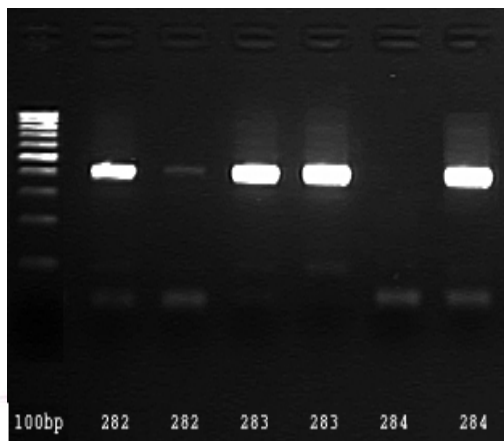
Делеция

ПЦР - основа генетического тестирования

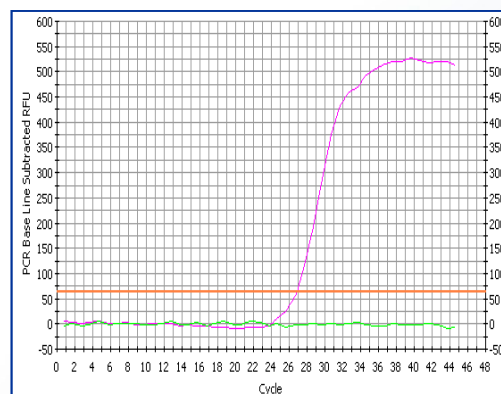
Один из наиболее чувствительных доступных и быстрых способов детекции SNP

Аллель-специфичная ПЦР с различными вариантами детекции

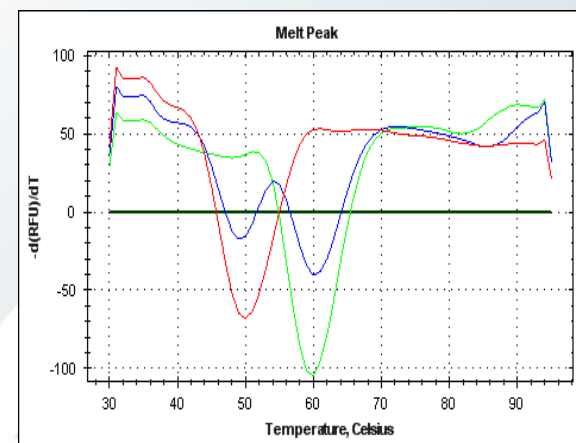
Электрофорез



В режиме
реального времени



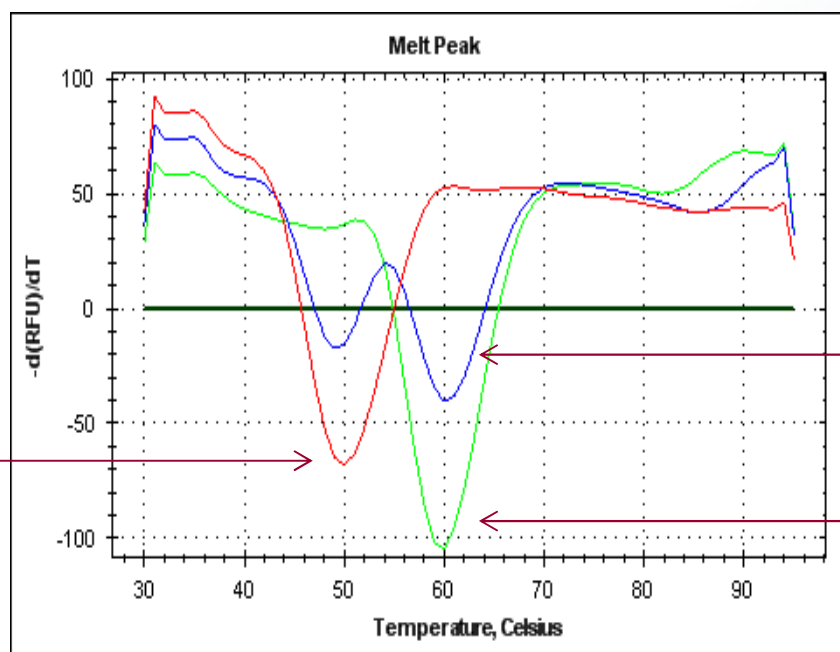
Анализ кривых
плавления



Наборы серии «РеалБест Генетика» (АО Вектор-Бест)

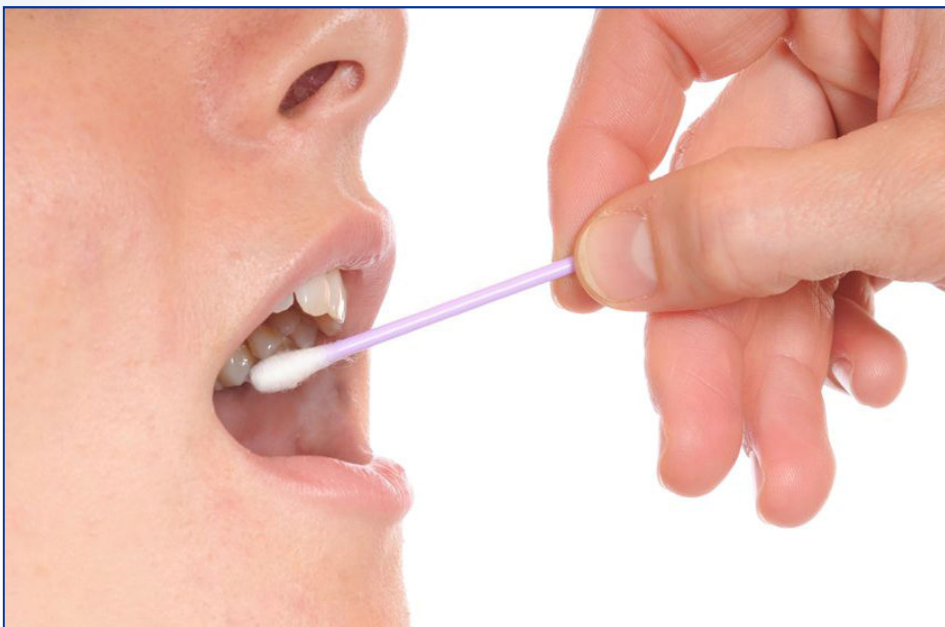
Принцип выявления полиморфизмов	анализ кривой плавления
Приборы	CFX-96 (Bio-Rad, США), ДТ-прайм (ДНК-технология, Россия)
Длительность анализа:	1 час 20 минут
Формат	Планшеты, пробирки
Форма выпуска	Готовые к использованию лиофилизированные реакционные смеси. Просто добавь образец.
Готовые решения	2-3 полиморфизма в одной реакционной смеси, профильные панели
Однозначность интерпретации результатов	
Простота транспортировки и хранения	Ллиофилизованная форма выпуска не требует заморозки

Наборы серии «РеалБест Генетика»: как это работает?

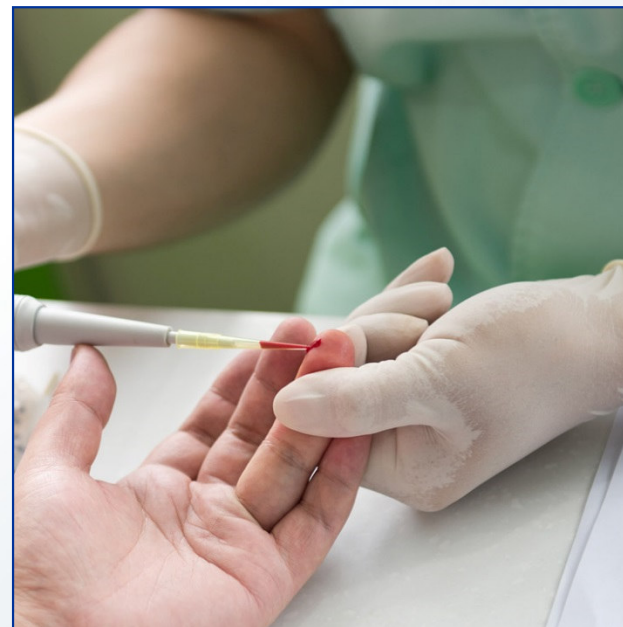


Биологический материал для генетического тестирования

Соскоб буккального эпителия



Кровь



Области применения генетического тестирования

1. **Диагностика моногенных наследственных заболеваний у плода, детей и взрослых:**
 - 1) Преимплантационная генетическая диагностика;
 - 2) Пренатальная генетическая диагностика;
 - 3) Скрининг новорожденных;
 - 4) Пресимптоматическая диагностика наследственных заболеваний развивающихся у взрослых;
2. **Определение риска появления патологий в будущем для мультифакторных заболеваний;**
3. **Предсказание ответа на введение лекарств, подбор дозы, прогноз успешности терапии;**
4. **Генетическая идентификация личности, установление отцовства;**
5. **Лабораторное подтверждение клинического диагноза наследственного заболевания.**

I. Диагностика моногенных заболеваний



Муковисцидоз (1 : 5000), аутосомно-рецессивные мутации в гене **CFTR**;



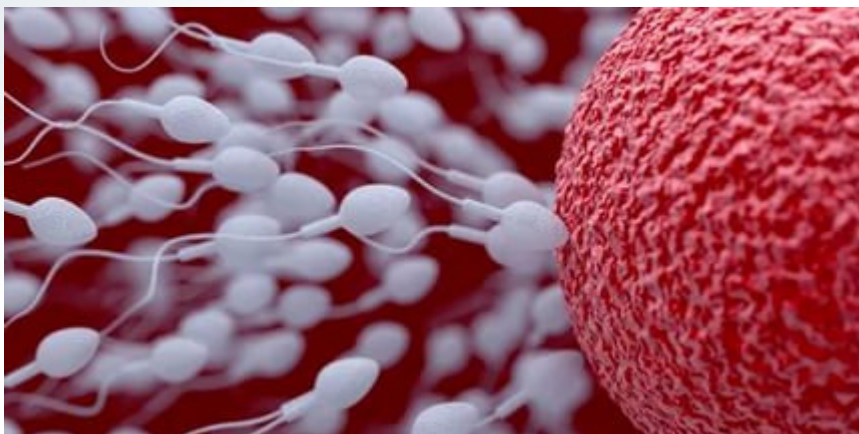
Фенилкетонурия (1:10.000) аутосомно-рецессивные мутации в гене **PAH**;

Кому необходимо пройти диагностику?

- супружеские пары с неотягощенной наследственностью, анализ на наиболее частые мутации;
- супружеские пары с отягощенной наследственностью, анализ на мутации конкретного гена:
 - носительство мутаций родителями;
 - пренатальная диагностика;

Микроделеции в Y-хромосоме

«РеалБест Генетика AZF-микроделеции»
(ПУ № РЗН 2017/5476)



Делеция района AZFa (sY84, sY86);

Делеция района AZFb (sY127, sY133 или sY134);

Делеция района AZFc (sY254, sY255 (ген DAZ));

Кому необходимо пройти диагностику?

**Пациенты с азооспермией и олигозооспермией для выбора
тактики лечения**

Непереносимость лактозы

«РеалБест-Генетика МСМ6»

(РУ № РЗН 2016/4760)

Генотип	Влияние полиморфизма
-13910 С/С	Непереносимость лактозы; Большой риск развития остеопороза, требуется назначение препаратов кальция у женщин в менопаузе;
-13910 С/Т	Вариабельный уровень активности лактазы; Риск развития вторичной лактазной недостаточности;
-13910 Т/Т	Хорошая переносимость лактозы

Кому необходимо пройти диагностику?

- Женщины в постменопаузе – для оценки риска остеопороза;
- Дифф. диагноз ЛН и других заболеваний желудочно-кишечного тракта у взрослых;
- Обследование детей младшего возраста в период прекращения грудного вскармливания;

II. Диагностика мультифакторных заболеваний

- Клиническое проявление зависит от взаимодействия нескольких генов и окружающей среды;
- Частота встречаемости полиморфизмов (SNP) более 1-2% в популяции;
- Наличие генетической предрасположенности повышает риск развития заболевания при наличии «неблагоприятных» факторов внешней среды;

Генетическое тестирование дает возможность выявить наличие неблагоприятных аллелей

Генетическое тестирование мультифакторных заболеваний. Зачем?

- Возможность заранее исключить влияние «неблагоприятных» факторов;
- Использование эффективных методов профилактики заболевания, к которому есть генетическая предрасположенность;
- Возможность диагностики и лечения заболевания на ранней стадии;
- Выбор наиболее эффективной терапии;

Диагностика полиморфизмов в генах системы гемостаза и фолатного цикла

- **«РеалБест-Генетика Гемостаз (12)»**
12 полиморфизмов генов системы свертывания крови и фолатного цикла (4 пробирки по 3 SNP);
- **«РеалБест-Генетика Гемостаз (F2/F5)»**
замена G20210A в гене F II (протромбин);
замена G1691A в гене F V (мутация Лейден);
- **«РеалБест-Генетика Гемостаз (MTR/MTRR/MTHFR)»**
выявления 4 полиморфизмов генов фолатного цикла
(2 пробирки по 2 SNP);

SNP	Эффект полиморфизма	Факторы, усиливающие эффекты
F2 G20210A	Повышение уровня протромбина в плазме, увеличение риска развития венозного тромбоза. Увеличение риска инфаркта миокарда в 4 раза (жен) и в 1,5 раза (муж).	G1691A F5. Курение.
F5 G1691A (Лейден)	Гиперкоагуляция кровяных сгустков и развитие венозных тромбозов. У гетерозигот повышен риск венозных тромбозов и эмболии в 7 раз, у гомозигот - в 20 раз.	Гормон.контрацепция, дефицит белков C и S, курение., гипергомоцистеинемия. G20210A F2.
F7 G10976A	Снижение концентрации фактора VII в кровотоке на 30%. Снижает риск развития тромбозов и инфаркта миокарда в 2 раза, даже при наличии атеросклероза коронарных сосудов.	Отсутствие мутаций G1691A F5, G20210A F2. Наличие G103T F13.
F13 G103T	Снижает влияние факторов риска кардиоваскулярных заболеваний	Отсутствие мутаций G1691A F5, G20210A F2, G-455A FGB. Наличие G10976A F7.

SNP	Эффект полиморфизма	Факторы, усиливающие эффекты
PAI-1 5G/4G (-675)	Снижение фибринолитической активности крови. Привычное невынашивание беременности, увеличение риска развития тяжелого гестоза в 2-4 раза. Гипоксия, задержка развития и внутриутробная гибель плода.	T1565C <i>ITGB3</i> , G1691A <i>F5</i> , G20210A <i>F2</i> , del287 <i>ACE</i> .
ITGA2 C807T	Увеличение адгезии тромбоцитов. У гомозигот повышен риск послеоперационных тромбозов, инфаркта миокарда и ишемического инсульта	G1691A <i>F5</i> , G20210A <i>F2</i> .
ITGB3 T1565C	Гиперагрегация тромбоцитов. Повышен риск инфаркта миокарда, тромбоэмболия; замена ассоциирована с повышением риска разрыва атеросклеротических бляшек.	G1691A <i>F5</i> , G20210A <i>F2</i> .
FGB G-455A	Повышение уровня фибриногена крови на 10-20%. У гомозигот содержание фибриногена крови выше, чем у гетерозигот. Маркер ишемических и кардиоваскулярных заболеваний.	Курение. G-854A <i>FGB</i> .

«РеалБест-Генетика Гемостаз (MTR/MTRR/MTHFR)»

SNP	Эффект полиморфизма	Неблагоприятные факторы
MTHFR C677T	У гомозигот 10-кратное повышение риска развития гипергомоцистеинемии; дефекты нервной трубки у новорожденных, венозные тромбозы.	G1691A F5, G20210A F2, дефицит витаминов B6, B12, фолиевой кислоты, дефекты др. генов фолатного цикла. Курение.
MTHFR A1298C	Снижение активности фермента на 35%. Развитие гипергомоцистеинемии.	
MTR A2756G	Снижение концентрации метионина и накопление гомоцистеина в кровотоке.	A66G MTRR, G1691A F5, G20210A F2, дефицит B6, B12, фолиевой кислоты. Курение.
MTRR A66G	Снижение активности фермента в 4 раза, повышает риск развития гипергомоцистеинемии; дефекты нервной трубки плода, сочетанного с дисплазией спинного мозга	A2756G MTR, G1691A F5, G20210A F2, дефицит B6, B12, фолиевой кислоты. Курение.

Кому необходимо пройти диагностику полиморфизмов в генах системы гемостаза и фолатного цикла?

- При наличии родственников с тромботическими осложнениями в возрасте до 50 лет (тромбозы глубоких вен, тромбоэмболия легочной артерии, инсульт, инфаркт миокарда, внезапная смерть);
- **При длительном постельном режиме;**
- При планировании продолжительных и обширных операций;
- **Назначение гормональной контрацепции;**
- При нескольких неудачных попытках ЭКО;
- **При наличии в прошлом двух и более остановок развития плода на ранних сроках беременности;**
- При наличии в прошлом тяжелых осложнений беременности (тяжелых форм позднего токсикоза, внутриутробной гибели плода, задержки развития плода);
- **При наличии в прошлом тромботических осложнений при беременности или после родов;**

Риск развития рака молочной железы и рака яичников

ген **BRCA1** – к 70 годам риск РМЖ 55% и РЯ 39%;

ген **BRCA2** – к 70 годам риск РМЖ 47% и РЯ 17%;

Спектр мутаций, актуальных для славянских популяций:

- BRCA1 **5382insC** (68%-90% мутаций BRCA1 в России);
- BRCA1 **4153delA** второе место по встречаемости ;
- BRCA1 **185delAG** в России редкая, частая у евреев;
- BRCA1 **3819del5, 3875del4, -300T>G, 2080delA** редкие;
- BRCA2 **6174delT** в России редкая;

Проведение обследования на мутации в генах BRCA1 / BRCA2 обязателен если:

- в семье есть хотя бы еще один онкологический больной;
- заболевание появилось ранее 45 лет;
- обнаружена билатеральная форма рака молочной железы.

Анализ **крайне желателен для всех больных РМЖ и
особенно РЯ с целью:**

- оптимизации схемы лечения больных РМ или РЯ;
- выявления здоровых носителей мутации в семье.

Риск развития гемохроматоза

«РеалБест-Генетика HFE H63D»,
«РеалБест-Генетика HFE S65C»,
«РеалБест-Генетика HFE C282Y».



избыточное накопление железа в
тканях организма, цирроз,
пенетрантность 70-80%

Кому показано генетическое тестирование?

- наличие клинических симптомов особенно у пациентов в возрасте до 35 лет;
- наличие близких родственников – больных гемохроматозом;
- проведенное генетическое тестирование у родственников, показавшее наличие мутаций в гене HFE, особенно у родственников I степени родства;

Наборы реактивов АО Вектор-Бест

Мультифакторное заболевание	Набор реактивов серии РеалБест Генетика	Мишень для анализа
Синдром Жильбера	«РеалБест-Генетика UGT1A1»	число ТА-повторов в гене <i>UGT1A1</i> .
риск преэклампсии, невынашивания беременности	РеалБест-Генетика ACE Del287 / AGT 704 T>C РеалБест-Генетика NOS3 -786 T>C / 894 G>T РеалБест-Генетика AGT 521 C>T / F7 del10 РеалБест-Генетика EDN1 Lys198Asn / CRP C3872T	полиморфизмы в генах ACE, AGT, NOS3, F7, EDN1
Риск гипертонии и сердечно-сосудистых заболеваний	РеалБест-Генетика ADD1 1378 G>T / CYP11B2 (-344)C>T РеалБест-Генетика AGT 521 C>T / AGTR1 1166 A>C РеалБест-Генетика GNB3 825 C>T / AGTR2 1675 G>A РеалБест-Генетика ACE Del287 / AGT 704 T>C РеалБест-Генетика NOS3 (-786)T>C / 894 G>T РеалБест-Генетика GP1BA c.482C>T	полиморфизмы в генах ADD, CYP11B2, ACE, AGT, AGTR1, AGTR2, NOS3, GNB3, GP1BA

**III. Генетическое тестирование для
предсказания ответа на введение
лекарств, подбор дозы, прогноза
успешности терапии**

=

**ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОЕ
ТЕСТИРОВАНИЕ**

Недостаточная эффективность лекарственных препаратов

Эффективность мед. препаратов	%	
Болезнь Альцгеймера	30	♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥
Анальгетики (Сох-2)	80	♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥
Астма	60	♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥
Аритмия	60	♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥
Деперссия	62	♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥
Диабет	57	♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥
Гепатит С	47	♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥
Недержание	40	♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥
Мигрень	52	♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥
Мигрень (профифилактика)	50	♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥
Онкология	25	♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥
Остеопороз	48	♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥
Ревматоидный артрит	50	♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥
Шизофрения	60	♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥

Неблагоприятные побочные реакции (НПР) - проблема современной фармакотерапии

- 2 миллиона серьезных НПР ежегодно;
- 100-240 тысяч смертей от НПР ежегодно;
- НПР выходят на 4-6 место по причинам смертности;
- 10-16% госпитализаций приходится на НПР;
- 10-20% расходов, идущих на здравоохранение тратиться на лечение пациентов с НПР;
- В США 136 миллиардов \$ тратится на лечение НПР ежегодно

Неблагоприятные побочные реакции при приеме антибиотиков



Сыпь при приеме амоксициллина

Варфарин-ассоциированный некроз кожи



Некроз кожи вследствие тромбоза при дефиците протеинов С или S, антитромбина III.



**Стандартизованный
подход к выбору
терапии**



**персонализированная
терапия необходима!**

«Ответ» на лекарство

50%

Пол;
Возраст;
Особенности питания;
курение, алкоголь и др.;
Тяжесть течения
болезни;
Другие заболевания;
Другие ЛС и БАД;



50%

Генетические
особенности
человека

Кому прежде всего необходимо проводить фармакогенетическое тестирование?

КАКИМ ДОЛЖНО БЫТЬ ЛС?

- Безальтернативное ЛС;
- ЛС с большим спектром и выраженностью НПР;
- ЛС с узкой терапевтической окном;
- При длительном применении ЛС ;

КАКИМ ДОЛЖЕН БЫТЬ ПАЦИЕНТ?

- Пациент из группы риска развития НПР;
- С наследственным анамнезом по НПР;

Лекарственные средства, для которых FDA регламентировало внесение ФГ информации в инструкции (2011)

Лекарственный препарат	Полиморфизм гена
непрямые антикоагулянты: варфарина, аценокумарола	<i>CYP2C9</i> и <i>VKORC1</i>
клопидогрел / празугрел ; вориконазол	<i>CYP2C19</i>
антидепрессанты (флуоксетин) и нейролептики; Кодеин, атомоксетин	<i>CYP2D6</i>
изониазид, пиразинамид, рифампицин	<i>NAT2</i>
оральные контрацептивы	«мутация Лейдена» в гене V фактора свертывания
аторвастатин	рецепторы LDL
иринотекан	<i>UGT1A1</i>
целекоксиб	<i>CYP2C9</i>
разбуриказа, примахин	СГ-6-ФДГ
карбамазепин	Полиморфный маркер <i>HLA-B*1502</i>
5-фторурацил, капецитабин	DPD
абакавир	Полиморфный маркер <i>HLA-B*5701</i>
азатиоприн, 6-меркаптопурин	<i>TPMT</i>

Антикоагулянты непрямого действия:

Варфарин

- Варфарин для лечения венозных тромбозов, врожденных тромбофилий, снижает риск развития постоперационного тромбоза;
- Полиморфизмы генов *CYP2C9* и *VKORC1* является одной из важнейших причин вариабельности эффективности действия варфарина у пациентов после протезирования клапанов сердца;
- Дозу варфарина подбирают с учетом генетических особенностей человека.

ФГ тестирование показано всем пациентам с мерцательной аритмией и больным с искусственными клапанами сердца

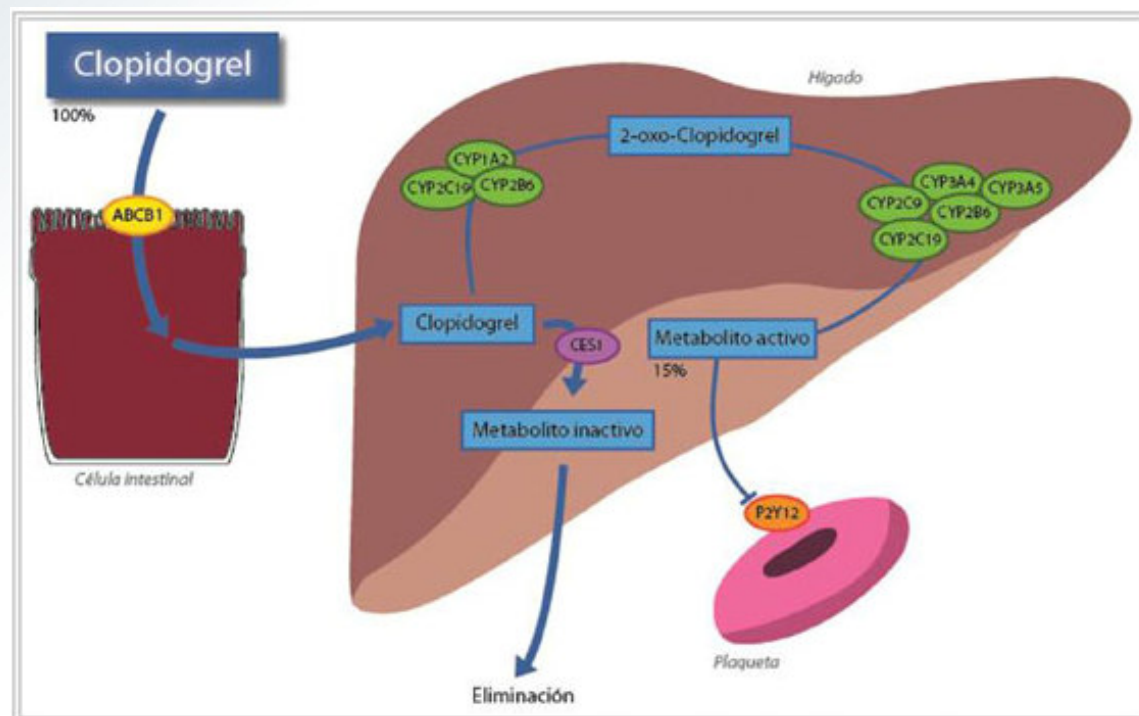
«РеалБест-Генетика Варфарин»

выявление 7 полиморфизмов, влияющих на подбор дозы
варфарина

Маркер	Влияние полиморфизма	Доза варфарина
CYP2C9*2	Хуже выведение Варфарина	Необходимо снижать
CYP2C9*3		
VKORC1	Меньше «мишени» Варфарина	Необходимо снижать
CYP4F2*3	Остается больше «мишени» Варфарина в крови	Необходимо повышать
GGCX	Замедленный метаболизм Варфарина	Необходимо снижать
CYP2C9*5		
CYP2C9*6		

Антиагреганты: Клопидогрел (Плавикс)

Используется в кардиологии, для профилактики тромбозов.



Аллели гена CYP2C19*2, CYP2C19*3 и полиморфизм T3435C гена ABCB1 снижают эффективность препарата

«РеалБест-Генетика Клопидогрел»

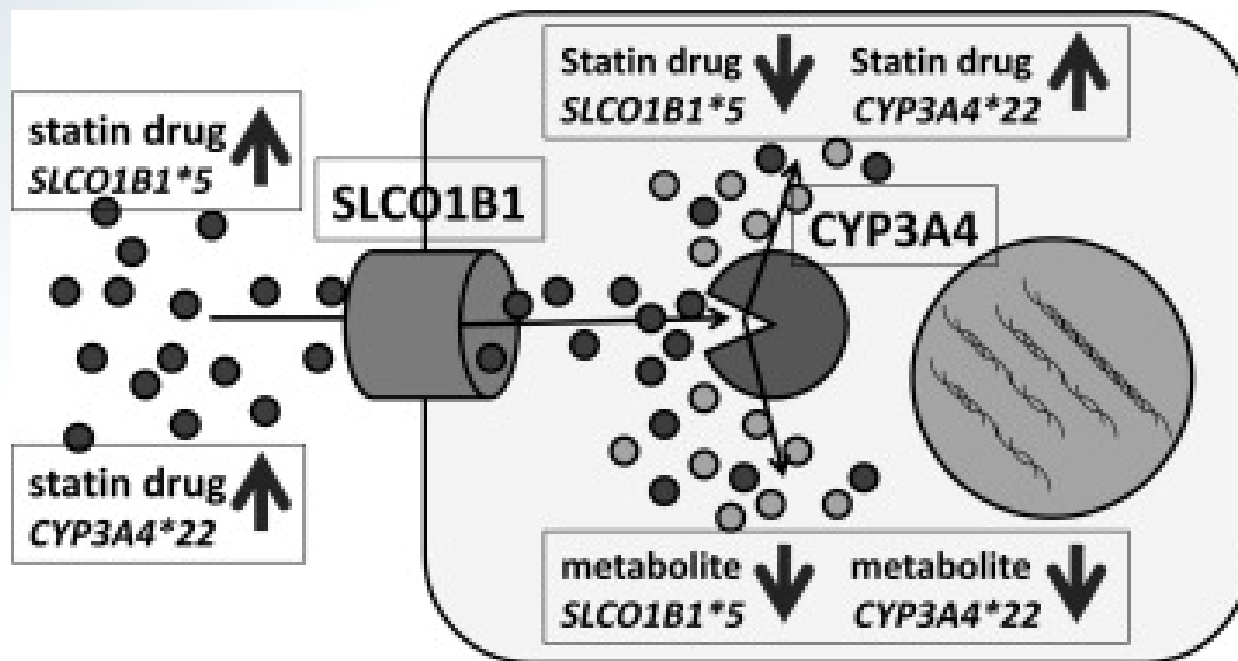
выявление 4 полиморфизмов, влияющих на подбор дозы
Клопидогрела (Плавикса)

Маркер	Влияние полиморфизма	НЛР при приме ЛС
CYP2C19*2	Снижен метаболизм ЛС	Повышенный риск инфаркта миокарда, тромбоз стента
CYP2C19*3		
CYP2C19*17	Повышен метаболизм ЛС	повышенный риск кровотечений
ABCB1 (C3435T)	Сниженная биодоступность ЛС	Повышенный риск инфаркта миокарда, тромбоз стента

ФГ тестирование особенно показано пациентам после
стентирования

Гиполипидная терапия: Статины

(Симвастатин, Аторвастатин, Правастатин, Флувастатин)



W.Sadee, J.Pharm.Sci, 2013

Полиморфизм
SLCO1B1*5
ассоциирован с
высоким риском
развития
миопатии, вплоть
до рабдомиолиза,

ФГ тестирование показано пациентом при

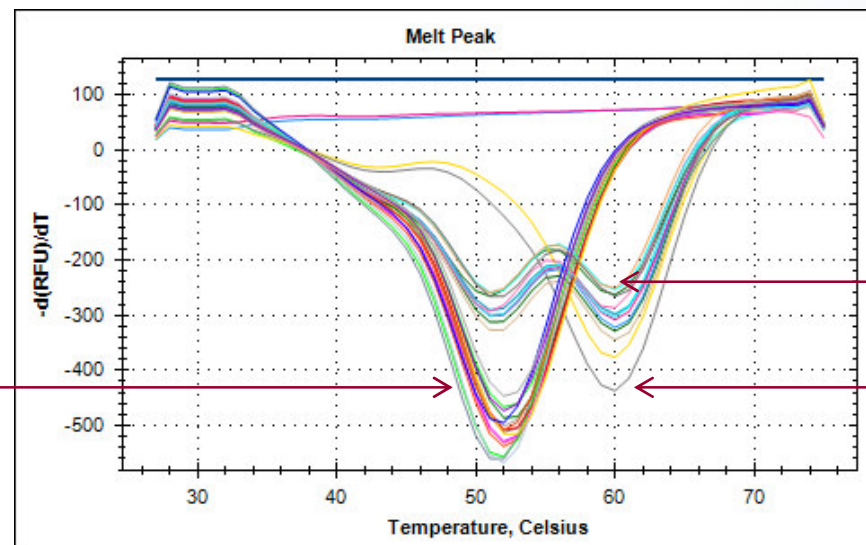


назначении статинов с целью уменьшения риска
развития НПР

«РеалБест-Генетика SLCO1B1»

Выявление полиморфизма в гене **SLCO1B1**, влияющего на эффективность приема статинов

Маркер	Влияние полиморфизма	НЛР при приеме ЛС
SLCO1B1*5	Нарушение транспорта ЛС	Повышенный риск миопатий, рабдомиолиз



норма

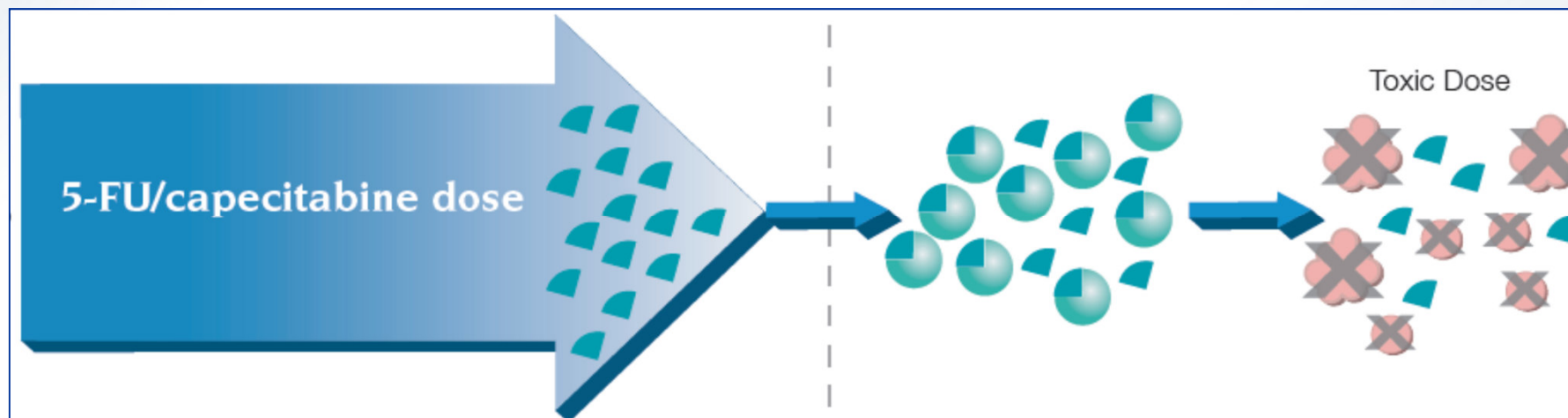
Гетерозигота
(риск в 2 раза)

Мутация
(риск в 17 раз)

Противоопухолевая терапия : 5-фторурацил

(Капецитабин, Кселода)

Полиморфизм DPYD*2 резко снижает активность фермента, ассоциирован с острым токсичным ответом на ЛС

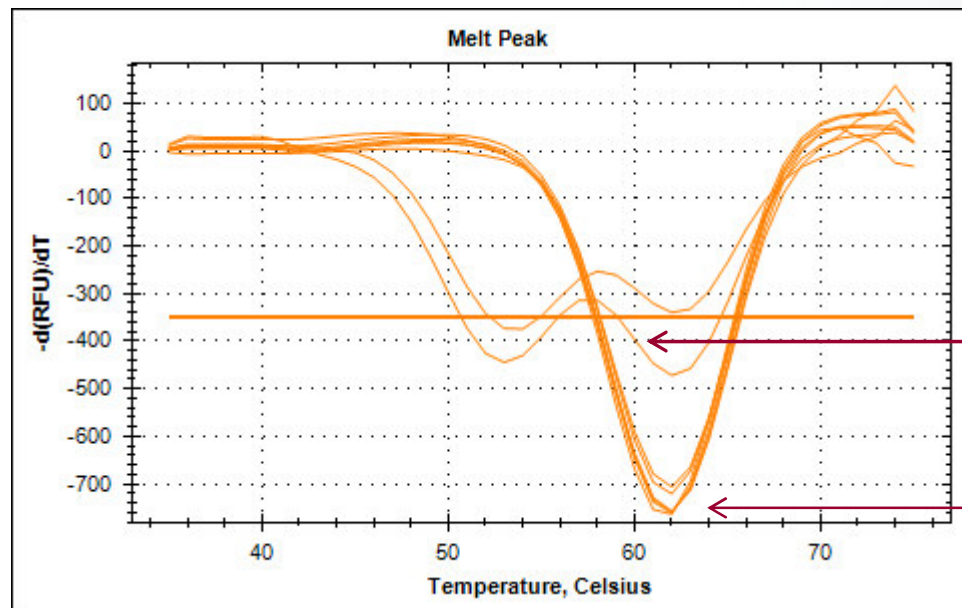


ФГ тестирование показано всем пациентам перед назначением терапии 5-ФУ и его аналогами с целью снижения риска развития острой токсичности

«РеалБест-Генетика DPYD*2»

Выявление полиморфизма DPYD*2, связанного с риском развития острой токсичности при терапии 5-ФУ

Маркер	Влияние полиморфизма	НЛР при приме ЛС
DPYD*2	Отсутствие фермента - метаболизера	Повышенный риск острой лекарственной токсичности, летальный исход;

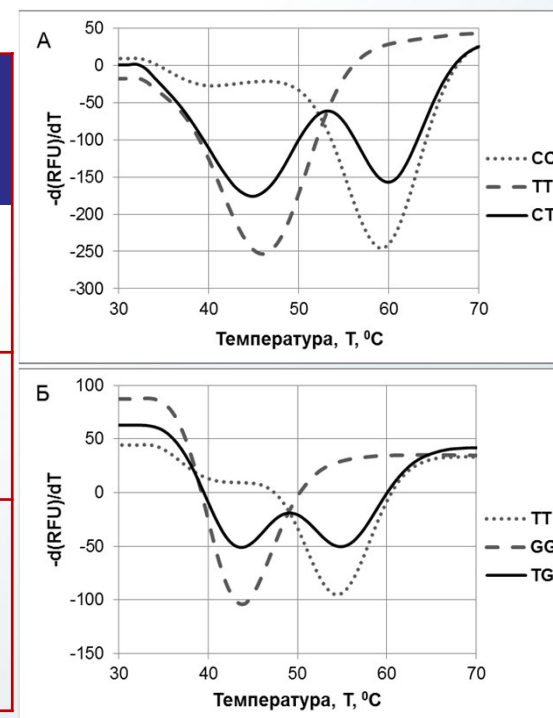


«РеалБест-Генетика Интерлейкин 28В»

РУ № РЗН 2016/4767

выявление полиморфизмов в гене интерлейкина 28 влияющие на успех лечения ВГС-инфекции

Маркер	Влияние полиморфизма
rs12979860 (CC) норма	повышение в 2 раза вероятности положительного ответа на лечение
rs8099917 (TT) норма	спонтанное разрешение инфекции, независимо от лечения.
rs8099917 (генотип GG) мутантный	ассоциирован с низким уровнем ответа на терапию



Генетическое тестирование показано для прогнозирования
успеха лечения ВГС-инфекции интерфероном и
рибаверином

Доктор, я
переживаю что
медицинская
помощь стала
слишком
обезличенной

Чепуха....
Просто
расслабьтесь и
ложитесь спиной
на сканнер бар-
кода!

Rob Rogers / Pittsburgh Post-Gazette

Спасибо за внимание!

 **РеалБест**

