**Учебные материалы к лабораторным занятиям по дисциплине**

**«Основы фармакологии и фармакогенетики»**

**Алматы**

**Лабораторное занятие 1**

**Руководство по безопасной работе в лаборатории.**

Цель занятия: Изучение студентами лабораторной техники безопасности.

Студенты, успешно прошедшие данный тренинг, должны уметь:

1. Найти и правильно использовать основное аварийное оборудование, такие как станции для промывания глаз, аптечки, огнетушители, телефон и т. д.
2. Всегда носить соответствующую одежду для лаборатории: лабраторные халаты.
3. Мыть руки до и после лабораторных исследований.
4. Никогда не кушать и не пить напитки в лаборатории.
5. Никогда не наносить косметику, не брать контактные линзы, не класть предметы (пальцы, карандаши и т. д.) в рот и не касайтесь лица.
6. Немедленно сообщать инструктору обо всех травмах.
7. Сообщать инструктору обо всех разливах или битой посуде и получать инструкцию по очистке.
8. Продезинфицировать лабораторные столы до и после лабораторных занятий.
9. На лабораторных столах не должно быть посторонние материалы.
10. В случае аварии выполнять действия согласно инструкции.
11. Горелки Бунзена, газовые форсунки и спиртовки. При использовании конфорок Бунзена и спиртовки важно помнить основные правила безопасности:
	* Убирайте длинные волосы назад.

-Застегивайте свободную одежду.

* + Выключайте горелку, когда она не используется.
1. Не касайтесь разливов, битого стекла и других острых предметов.
2. Залейте место разлива и все загрязненные материалы дезинфицирующим средством и накройте бумажным полотенцем.
3. Используйте метлу и совок, чтобы собрать острые предметы и выбросить их в соответствующий контейнер.
4. Перед началом любой лабораторной работы вам следует внимательно прочитать все инструкции, отмечая все правила техники безопасности для лабораторных занятий, назначенных на данный лабораторный период. **Дополнительный визуальный материал:**

Видео: Safety Equipment / Lab Safety Video <https://www.youtube.com/watch?v=IiHEYtnKfF0>

# Литература:

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004

# Лабораторное занятие 2 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

**Реагенты ПЦР. Стадии ПЦР**

Цель занятия: Ознакомление студентов с полимеразной цепной реакцией (ПЦР), реагентами ПЦР и стадией ПЦР анализа.

Полимера зная цепна я реа кция (ПЦР) — метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определѐнных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

***Для ПЦР требуются следующие компоненты:***

-ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.

-Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.

-Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — Thermus aquaticus (Taq- полимераза), Pyrococcus furiosus (Pfu-полимераза), Pyrococcus woesei (Pwo- полимераза), Thermus thermophilus (Tth-полимераза) и другие.

-Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

-Ионы Mg2+, необходимые для работы полимеразы.

-Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — рН, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 циклов, каждый из которых состоит из трѐх стадий:

* Денатурация;
* Отжиг;
* Элонгация.

# Дополнительный визуальный материал:

Видео: «PCR - Polymerase Chain Reaction (IQOG-CSIC)» <https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>

# Литература:

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004
2. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика. Геотар-Медиа. 2007.
3. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Москва, Медицина, 1997.

# Лабораторное занятие 3 Молекулярно-генетические маркеры.

Молекулярные маркеры (синоним – ДНКмаркеры) – это генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК. ДНК-маркеры являются третьим поколением генетических маркеров. Им предшествовали белковые маркеры, а еще ранее – классические генетические маркеры.

Наиболее широко используемые молекулярно-генетические маркеры условно можно подразделить на следующие типы — маркеры участков структурных генов, кодирующих аминокислотные последовательности белков (электрофоретические варианты белков), маркеры некодирующих участков структурных генов и маркеры различных последовательностей ДНК, отношение которых к структурным генам, как правило, неизвестно — распределение коротких повторов по геному (RAPD — случайно амплифицируемая полиморфная ДНК; ISSR — инвертированные повторы; AFLP — полиморфизм в сайтах рестрикции) и микросателлитные локусы (тандемные повторы с длиной элементарной единицы в 2-6 нуклеотидов).

Имеется целый набор современных технологий выявления полиморфизма на уровне ДНК, среди которых можно выделить следующие:

-анализ полиморфизма длин рестриктных фрагментов ДНК (RFLP);

-анализ полиморфизма с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и другие методы на основе амплификации ДНК между повторяющимися последовательностями в геномной ДНК.

# Литература:

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004
2. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика. Геотар-Медиа. 2007.
3. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Москва, Медицина, 1997.

# Лабораторное занятие 4

**Гель электрофорез. Горизонтальный электрофорез ДНК.**

Электрофорез ДНК в агарозном геле — аналитический метод, применяемый для разделения фрагментов ДНК по длине.

Для разделения фрагментов ДНК разной длины используют гель с различной концентрацией агарозы. Чем меньше длина разделяемых фрагментов ДНК, тем больше должна быть концентрация агарозы.

Электрофорез проводится в камере, заполненной буферным раствором. Чаще всего используются буферы, содержащие ЭДТА, трис, а также борную или уксусную кислоты. Соответственно, буфер, содержащий борную кислоту, называется TBE (tris-borate-EDTA), а буфер, содержащий уксусную кислоту,

— TAE (tris-acetate-EDTA).

После разделения (иногда краситель вносят в расплавленную агарозу) фрагменты ДНК разной длины визуализируют при помощи флюоресцентных

красителей, специфично взаимодействующих с ДНК, например, агарозные гели обычно красят бромистым этидием, который интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флюоресцирует в УФ-лучах.

# Дополнительный визуальный материал:

Видео: «Principles of Gel Electrophoresis» <https://www.youtube.com/watch?v=6_4AY3lYRgo> **Литература:**

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004
2. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика. Геотар-Медиа. 2007.
3. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Москва, Медицина, 1997.

# Лабораторное занятие 5 Вертикальный электрофорез.

**Электрофорез в полиакриламидном геле.**

Электрофорез вертикальный — метод разделения макромолекул (белков и нуклеиновых кислот, а также их фрагментов) под действием электрического поля. Разделение в полиакриламидном геле (ПААГ) происходит за счѐт различий заряда разделяемых молекул и отличий молекулярных масс, а также от конфигурации молекул. Оценить размер молекул помогут маркеры молекулярных масс. Последующая детекция на гель-документирующих системах методом колориметрического анализа ПААГ (после окраски белков по Кумасси, серебром или медью, происходит количественная и качественная оценка образца по интенсивности окраски в видимом свете) позволяет визуализировать результат и сохранить результатыработы с образцами.

Электрофорез вертикальный проводят в специальных камерах для вертикального электрофореза. Камеры различаются по количеству гелей (от 1 до 12), по размеру геля (от 7 до 20 см), по толщине геля (0,75;1,0; 1,5 мм), по количеству образцов на гель (от 1 до 120) и по требованию к объему буфера (от 200 до 6000 мл).

**Необходимые реактивы для вертикального электрофореза:** гели для электрофореза белков, маркеры длин фрагментов ДНК, красители интеркалирующие для визуализации НК, красители для нанесения образцов на гель, буферы для электрофореза нуклеиновых кислот, акриламид, бис- акриламид, персульфат аммония, ТЕМЕД.

# Дополнительный визуальный материал:

Видео: «Polyacrylamide Gel Electrophoresis- PAGE - Amrita University» <https://www.youtube.com/watch?v=pnBZeL8nFEo>

# Литература:

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004
2. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Москва, Медицина, 1997.

# Лабораторное занятие 6 Рестрикционный анализ.

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ, англ. Restriction fragment length polymorphism, RFLP) — способ исследования геномной ДНК путѐм разрезания ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов (рестриктов) путѐм гель- электрофореза (электрофореза ДНК).

При использовании данного исследования получаются различные результаты от различных образцов, и при помощи ПДРФ можно идентифицировать некоторые различия в последовательности нуклеотидов ДНК, в случае, когда они располагаются в сайте рестрикции. Ввиду того, что технологии секвенирования ДНК могут охарактеризовать ДНК очень точно, ПДРФ был разработан как первый и дешѐвый метод для массового применения. Анализ разнообразия ПДРФ является важным инструментом в картировании генома, локализации генов, ответственных за генетические заболевания, определения риска заболевания, получения генетических отпечатков и определения родства.

**Необходимые реактивы для вертикального электрофореза:** рестриктазы, гели для электрофореза белков, маркеры длин фрагментов ДНК, красители интеркалирующие для визуализации НК, красители для нанесения образцов на гель, буферы для электрофореза нуклеиновых кислот.

**Дополнительный визуальный материал:** Видео: «Restriction Digest Analysis» <https://www.youtube.com/watch?v=3esTzddSgX8>

# Литература:

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004
2. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика. Геотар-Медиа. 2007.
3. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Москва, Медицина, 1997.

# Лабораторное занятие 7

# Скрининг с зондами Taqman.

TaqMan зонды гидролиз зонды , которые предназначены для увеличения специфичности количественной ПЦР .

Принцип зонда TaqMan основан на 5´ – 3´ экзонуклеазной активности Taq- полимеразы по расщеплению зонда с двойной меткой во время гибридизации с комплементарной последовательностью-мишенью и детекции на основе флуорофора . Как и в других количественных методах ПЦР

, результирующий сигнал флуоресценции позволяет количественно

измерить накопление продукта во время экспоненциальных стадий ПЦР; однако зонд TaqMan значительно увеличивает специфичность обнаружения. Зонды TaqMan были названы в честь видеоигры Pac-Man ( Taq Polymerase + PacMan = TaqMan), поскольку ее механизм основан на принципе Pac-Man.

# Дополнительный визуальный материал:

Видео: «How TaqMan Works -- Ask TaqMan® Ep. 13 by Life Technologies» <https://www.youtube.com/watch?v=fkUDu042xic>

# Литература:

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004
2. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика. Геотар-Медиа. 2007.
3. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Москва, Медицина, 1997.

# Лабораторное занятие 8

# Гибридизация на олигонуклеотидных чипах

ДНК-микрочип (англ. DNA microarray) — это сложная технология, используемая в молекулярной биологии и медицине. ДНК-микрочип представляет собой небольшую поверхность, на которую с большой плотностью в определѐнном порядке нанесены фрагменты одноцепочечной синтетической ДНК с известной последовательностью. Эти фрагменты выступают в роли зондов, с которыми гибридизуются (образуют двуцепочечные молекулы) комплементарные им цепи ДНК из исследуемого образца, обычно меченные флуоресцентным красителем. Чем больше в образце молекул ДНК с определенной последовательностью, тем большее их количество свяжется с комплементарным зондом, и тем сильнее будет оптический сигнал в точке микрочипа, куда был «посажен» соответствующий зонд. После гибридизации поверхность микрочипа сканируется, и в результате каждой последовательности ДНК ставится в соответствие тот или иной уровень сигнала, пропорциональный числу молекул ДНК с данной последовательностью, присутствующих в смеси.

# Дополнительный визуальный материал:

Видео: «DNA microarray» <https://www.youtube.com/watch?v=6ZzFihESjp0>

# Литература:

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004
2. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика. Геотар-Медиа. 2007.
3. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Москва, Медицина, 1997.

# Лабораторное занятие 9

# Гибридизация на олигонуклеотидных чипах с мелкими шариками (beads)

ДНК микрочипов (также известный как ДНК - чип или биочипа) представляет собой набор микроскопических пятен ДНК , прикрепленных к

твердой поверхности. Основным принципом микрочипов является гибридизация между двумя цепями ДНК, свойство комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот специфически спариваться друг с другом путем образования водородных связей между комплементарными парами нуклеотидных оснований. Большое количество комплементарных пар оснований в нуклеотидной последовательности означает более прочную нековалентную связь между двумя цепями. После смываниянеспецифических связывающих последовательностей только сильно спаренные цепи останутся гибридизированными. Флуоресцентно меченые последовательности-мишени, которые связываются с последовательностью зонда, генерируют сигнал, который зависит от условий гибридизации (таких как температура) и отмывки после гибридизации. Общая мощность сигналаот пятна (объекта) зависит от количества целевого образца, связывающегосяс зондами, присутствующими в этом месте. Микромассивы используют относительное количественное определение, при котором интенсивность признака сравнивается с интенсивностью того же признака в различных условиях, а идентичность признака определяется по ее положению.

Существует множество типов массивов, и самое главное различие заключается в том, расположены ли они пространственно на поверхности или на кодированных шариках:

# Дополнительный визуальный материал:

https://ru.qwe.wiki/wiki/DNA\_microarray

Видео: « Illumina Advances Genomic Research with the Infinium Assay»

<https://www.youtube.com/watch?v=lVG04dAAyvY>

# Литература:

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004
2. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика. Геотар-Медиа. 2007.
3. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Москва, Медицина, 1997.

# Лабораторное занятие 10

# Аллель-специфичный ПЦР

ПЦР с аллель-специфическими праймерами является простым и эффективным методом обнаружения мутаций в геномной ДНК обследуемых индивидуумов. В отличие от всех рассмотренных выше методов аллель- специфическая ПЦР в такой постановке позволяет находить небольшое количество мутантных ДНК на фоне большого числа молекул ДНК дикого типа. В случае, например, при онкологических заболеваниях, мутантные ДНК в препаратах суммарной ДНК сильно разбавлены соответствующими последовательностями дикого типа и их трудно обнаружить другими методами. Аллель-специфические праймеры, полностью комплементарные лишь мутантным последовательностям анализируемой ДНК, вовлекаются в амплификацию таких мутантных последовательностей, а последовательности нуклеотидов ДНК дикого типа не амплифицируются. Подобный подход

позволяет обнаруживать несколько десятков или сотен молекул мутантной ДНК на фоне десятков тысяч молекул ДНК дикого типа.

# Дополнительный визуальный материал:

Видео: «Allele-specific oligonucleotide | Immune System | Antigen | Detection | Basic Science Series»

<https://www.youtube.com/watch?v=o2sA5iaJs7Q>

# Литература:

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004
2. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика. Геотар-Медиа. 2007.
3. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Москва, Медицина, 1997.

# Лабораторное занятие 11 Анализ кривых плавления

Анализ кривой плавления представляет собой оценку характеристик диссоциации двухцепочечной ДНК во время нагревания. Температура, при которой денатурируется 50% ДНК, известна как температура плавления . Собранная информация может использоваться для вывода о наличии и идентичности однонуклеотидных полиморфизмов (SNP).

Принципиальной особенностью полимеразной цепной реакции в реальном времени является возможность детекции накопления продуктов амплификации непосредственно во время проведения амплификации. Так как кинетика накопления ампликонов напрямую зависит от числа копий исследуемой матрицы, это позволяет проводить количественные измерения ДНК и РНК инфекционных агентов. Полученная информация может быть использована для проведения мониторинга эффективности проводимой терапии, оценки клинического прогноза. В отличие от других методов количественного определения ДНК матрицы в пробе, ПЦР в реальном времени не требует дополнительных манипуляций, связанных с раститровкой ДНК исследуемой пробы или полученных в ходе ПЦР ампликонов, которые усложняют постановку анализа и могут приводить к появлению ложноположительных результатов. Подобный подход позволяет отказаться от стадии электрофореза, что ведет к резкому уменьшению вероятности контаминации исследуемых проб продуктами амплификации, а также позволяет снизить требования, предъявляемые к ПЦР лаборатории.

**Дополнительный визуальный материал:** Видео: «Melt curve analysis in qPCR experiments» <https://www.youtube.com/watch?v=FvJnXKzejSQ>

# Литература:

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004
2. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика. Геотар-Медиа. 2007.
3. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Москва, Медицина, 1997.

# Лабораторное занятие 12 Секвенирование ДНК

Секвени рование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот — ДНК и РНК) — определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от лат. sequentum — последовательность). В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде. Размеры секвенируемых участков ДНК обычно не превышают 100 пар нуклеотидов (next-generation sequencing) и 1000 пар нуклеотидов при секвенировании по Сенгеру. В результате секвенирования перекрывающихся участков ДНК получают последовательности участков генов, целых генов, тотальной мРНК или полных геномов организмов.

Для секвенирования применяют методы Эдмана, Сенгера и другие; в настоящее время для секвенирования генов обычно применяют метод Сенгера с дидезоксинуклеозидтрифосфатами (ddNTP[en]). Обычно до начала секвенирования производят амплификацию участка ДНК, последовательность которого требуется определить, при помощи ПЦР. Секвенирование полного генома обычно осуществляют при помощи технологий секвенирования нового поколения (next-generation sequencing).

# Дополнительный визуальный материал:

Видео: «DNA Sequencing - 3D» <https://www.youtube.com/watch?v=ONGdehkB8jU&t=54s> **Литература:**

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004
2. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика. Геотар-Медиа. 2007.
3. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Москва, Медицина, 1997.

**Лабораторное занятие 13**

**Применение фармакогенетического тестирования в клинической**

**практике.**

Ряд клинических руководств и рекомендаций уже включают ФГТ в качестве метода персонализации фармакотерапии, что основано на накопленной доказательной базе эффективности подобного рода подходов.

Основное преимущество фармакогенетических исследований – это возможность предсказания эффективности, неэффективности, риска развития неблагоприятных побочных реакций до применения ЛС. Поэтому ФГТ показано как пациентам с высоким риском развития НР или пациентам с наследственным анамнезом по НР, так и в случае планирования длительного/пожизненного применения ЛС или назначения ЛС, эффективного у ограниченного числа пациентов, что особенно актуально в части дорогостоящих ЛС.

# Дополнительный визуальный материал:

1. Видео: «Pharmacogenomics: The Right Drug, for the Right Patient, at the Right Dose»

<https://www.youtube.com/watch?v=WSf6vyP11aQ>

1. Видео: «Pharmacogenomics: Genes and Medicine» <https://www.youtube.com/watch?v=RXmrUhSSSlo>

# Литература

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004
2. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика. Геотар-Медиа. 2007.
3. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Москва, Медицина, 1997.

# Лабораторное занятие 14

**Организация лаборатории для молекулярно-генетических исследований.**

# В настоящее время клиническая практика располагает достаточно широким спектром методов лабораторной диагностики, позволяющим не только диагностировать заболевания, мониторировать терапию, но и осуществлять контроль лечения. До недавнего времени методы лабораторной диагностики, используемые в клинической практике, имели один общий недостаток - они не учитывали предрасположенность пациента к различным заболеваниям согласно генетическим факторам. Вопросы предрасположенности пациента к различным заболеваниям лежат в основе нового направления медицины - персонализированной медицины, которую можно определить как стратегию, профилактику и лечение заболеваний на основе результатов молекулярно-генетических исследований.

# Благодаря научным исследованиям стало известно, что в развитии различных заболеваний большую роль играют генетические полиморфизмы - изменения генома, встречающиеся в человеческой популяции, по крайней мере, в 2 вариантах (аллелях) с частотой не менее 1%. Наиболее частым типом генетического полиморфизма являются однонуклеотидные замены (SNP), которые генетически уникальны для каждого человека [1]. Некоторые полиморфные варианты генов («гены предрасположенности») при определенных неблагоприятных условиях могут способствовать развитию мультифакториальных заболеваний. Неблагоприятные аллельные варианты этих генов могут быть причиной таких частых болезней, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца (ИБС), остеопороз, сахарный диабет, бронхиальная астма, опухоли и др. Сочетания аллельных вариантов различных генов, обеспечивающих нормальный метаболический процесс или вовлеченных в развитие конкретной патологии, получили название «генные сети». Выяснение составляющих генной сети каждого мультифакторного заболевания, разработка на этой основе комплекса профилактических мероприятий для конкретного пациента составляют основу предиктивной (предсказательной) медицины.

# В настоящее время молекулярно-диагностические технологии развиваются, совершенствуются и внедряются в клиническую практику. Так, уже сейчас клиническая лабораторная диагностика располагает широким спектром методов, основанных на выявлении и диагностике методами анализа нуклеиновых кислот - полимеразная цепная реакция (ПЦР), генотипирование, биочипы, секвенирование и т.д.

# ПЦР - один из немногих, используемых в настоящее время в клинической практике методов лабораторной диагностики, характеризующийся высочайшими специфичностью и чувствительностью в выявлении таких заболеваний, как бактериальный вагиноз, трихомониаз, сифилис, вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекция, туберкулез и др. [2, 3].

# Метод ПЦР особенно эффективен при выявлении трудно культивируемых и некультивируемых вирусов и бактерий, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях. Следует отметить, что диагностические возможности ПЦР, в отличие от бактериологического и вирусологического методов диагностики, не ограничены способностью микроорганизмов и вирусов расти на искусственных средах или в культуре клеток. Основное преимущество ПЦР перед бактериологическим и вирусологическими методами диагностики состоит в способности идентифицировать, определять свойства и работать с большим разнообразием микроорганизмов, которые не удается по тем или иным причинам размножать в лабораторных условиях.

# ПЦР-диагностика также очень эффективна в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов. Помимо этого, ПЦР имеет следующие преимущества перед другими методами клинической лабораторной диагностики:

# - универсальность (способность обнаруживать любые ДНК и РНК бактерий и вирусов даже в случаях, когда другими методами лабораторной диагностики это сделать невозможно); вне зависимости от объекта и области применения ПЦР (клиническая медицина, криминалистика, ветеринария, генетика, молекулярная биология) используется стандартный комплект приборов;

# - высокая специфичность (до 100%) метода обусловлена тем, что благодаря подбору специфических праймеров определяется уникальный фрагмент ДНК или РНК, характерный только для данного возбудителя;

# - высокая чувствительность (в настоящее время порог чувствительности некоторых амплификационных тест-систем позволяет определять единичные копии в исследуемом образце [4]);

# - высокие технологичность и автоматизация метода позволяют получать результаты исследования в руки врача и пациента в день проведения исследования;

# - выполнение анализа возможно в минимальном объеме пробы (до нескольких микролитров), что крайне важно в неонатологии, судебной медицине, клинической генетике и т.п.;

# - возможность одновременной диагностики нескольких возбудителей заболеваний или аномальных генов в одной пробе без ущерба для чувствительности или специфичности результата исследования.

# В настоящее время с использованием метода ПЦР разработаны методы исследования генома человека - секвенирование по Сэнгеру, Эдману, пиросеквенирование. Цель данных исследований - определение последовательности нуклеотидов. Уже сейчас в клиническую практику внедряется метод пиросеквенирования, основанный на принципе «секвенирование путем синтеза». При включении нуклеотида в исследуемую цепь ДНК высвобождаются пирофосфаты, затем происходит цепь химических реакций с их участием, что приводит к образованию квантов света. Интенсивность свечения определяется специальным прибором. В настоящее время разработаны серии реагентов, позволяющие определять предрасположенность к заболеваниям сердечно-сосудистой системы (артериальная гипертония, инфаркт миокарда), сахарному диабету, ожирению, остеопорозу, бронхиальной астме и т.д. При получении данной информации врач может разработать для пациента индивидуальные рекомендации по профилактике, а пациент, в свою очередь, может принять своевременные меры и тем самым предотвратить развитие заболевания.

# Особенно важным является изучение полиморфных генов, ответственных за метаболизм антикоагулянта варфарина. Известно, что три единичных нуклеотидных полиморфизма (SNP), два гена в CYP2C9 и один в VKORC1 играют ключевую роль в определении влияния терапии варфарином на коагуляцию. Носители определенных аллелей этих генов подвергаются более высокому риску кровотечений при применении стандартных доз варфарина. Для таких пациентов проводится индивидуальный подбор терапии.

# Молекулярно-генетические исследования являются неотъемлемой частью диагностики и выбора лечения в современной онкологии. В настоящее время стала возможной разработка лекарственных препаратов, действующих непосредственно на молекулярную мишень в опухолевой клетке, не вызывая серьезного повреждения других органов и тканей пациента. Применение таких препаратов носит название «таргетная терапия». Большое значение имеет также выявление наследственно обусловленных форм рака. Применение новых препаратов, ориентированных на «точечное» воздействие на молекулярные механизмы, обусловливает необходимость обязательной идентификации генетических нарушений.

# Детекция генетических нарушений методом аллельспецифичной ПЦР в реальном времени (PCR-HRM) позволяет относительно быстро проводить детекцию и количественное определение мутаций в онкогенах, что необходимо для назначения схемы лечения и контроля эффективности терапии. Используя метод пиросеквенирования, можно также определять наиболее часто встречающиеся мутации в онкогенах BRCA1 и BRCA2, являющиеся причиной наследственно обусловленного рака молочной железы, яичников, поджелудочной железы, простаты. Применение современных диагностических подходов для выявления соматических мутаций в онкогенах и определения генетической предрасположенности к развитию рака позволяет проводить целенаправленное лечение в зависимости от индивидуального генотипа некоторых видов рака.

# Описанные выше методы относительно доступны для любого лечебно-профилактического учреждения за счет использования услуг сторонних коммерческих лабораторий. В то же время необходимо отметить, что, если диагностика инфекционных заболеваний методом ПЦР - это широко распространенная услуга, то диагностика генетических предрасположенностей пациента - относительно новое направление, поэтому количество адекватных предложений на рынке диагностических услуг пока ограничено.

# Кроме того, при работе со сторонними лабораториями клинико-диагностическая лаборатория (КДЛ) сталкивается с большим количеством проблем на всех этапах анализа. На преаналитическом этапе использование услуг сторонних лабораторий часто влечет за собой необходимость использования дополнительных расходных материалов для сбора и транспортировки биологического материала, отличающихся от используемых в КДЛ. При этом КДЛ, как правило, вынуждена отказаться от универсальной методики забора биологического материала, что может повлечь ошибки как со стороны клиницистов, так и на этапе сортировки и транспортировки биологического материала: на аналитическом этапе - отсутствие возможности контроля качества выполняемых работ и оперативной информации об использовании той или иной методики проведения определенного исследования, на постаналитическом этапе - значительные сроки выдачи результатов, необходимость приведения единиц измерения к привычным для клиницистов [5].

# Очевидно, что себестоимость исследования при передаче его на аутсорсинг будет значительно выше себестоимости аналогичных услуг, предлагаемых пациентам аутсорсером. Таким образом, сторонняя коммерческая лаборатория получает значительное конкурентное преимущество в борьбе за пациента.

# Учитывая эти обстоятельства, большинство лечебно-профилактических учреждений, использующих в своей работе ПЦР-диагностику и диагностику генетических предрасположенностей, стремятся к оснащению собственных КДЛ соответствующим оборудованием.

# Вместе с тем такие направления, как диагностика инфекций методом ПЦР и генетические исследования, производятся силами сторонней коммерческой лаборатории.

# При планировании центра было решено исходить из следующих задач:

# - организация высокопроизводительной ПЦР-диагностической лаборатории;

# - организация генетической лаборатории;

# - максимальная автоматизация всех этапов лабораторного процесса;

# - использование оборудования «открытого» типа, позволяющего понизить зависимость лаборатории от поставщиков тест-систем;

# - возможность интеграции геномного центра в лабораторную информационную систему;

# - полная совместимость методик забора биологического материала с уже используемыми;

# - максимальное следование официальным инструкциям и рекомендациям по организации лабораторий, работающих с молекулярно-биологическими методами в целях повышения безопасности и качества оказания услуг.

# С учетом необходимости выдачи наиболее точных результатов в качестве основы ПЦР-лаборатории был выбран широко распространенный в научных и практических медицинских учреждениях прибор Rotor-Gene Q («QIAGEN», Германия).

# Технология пиросеквенирования в полной мере реализована на приборе PyroMark Q24 («QIAGEN», Германия), который был запланирован в качестве прибора, на котором будут проводиться повседневные генетические исследования (рис. 4).

# Пиросеквенатор PyroMark Q24 («QIAGEN», Германия). Самым дорогостоящим прибором в запланированном составе молекулярно-генетической лаборатории стал сканер для биочипов высокой плотности iScan System («Illumina», США;).

# Сканер для биочипов высокой плотности iScan System («Illumina», США).

# Это оборудование характеризуется высочайшим качеством получаемых данных, высокой производительностью и гибкостью. Так, при использовании одного биочипа можно проанализировать почти 5 млн различных признаков на 4 образцах одновременно.

# Как показывает практика, для повышения эффективности работы КДЛ недостаточно только модернизировать парк оборудования. Оно является основой, которую необходимо выстроить таким образом, чтобы обеспечивать решение всех поставленных задач.

# Учитывая особенности работы с методами амплификации нуклеиновых кислот, при планировании помещений для размещения молекулярно-генетической лаборатории руководство поликлиники использовало ряд санитарно-эпидемиологических правил и норм (СП) [7]. Кроме того, в работе были использованы соответствующие методические указания (МУ), разработанные на основе СП [8]. Помимо уверенности в высоком уровне качества и безопасности работы в КДЛ, следование этим МУ позволит облегчить процесс получения соответствующего разрешения на работу с патогенами в надзорных органах.

# В соответствии с упомянутыми МУ при строительстве новых или реконструкции имеющихся помещений лабораторию размещают в отдельно стоящем здании

# Организация работы лаборатории основана на разделении ее на 5 рабочих зон, соответствующих этапам проведения анализа, поточности движения персонала и материалов: 1) зона выделения нуклеиновых кислот; 2) зона приготовления ПЦР-смесей; 3) зона проведения реакции амплификации и детекции продуктов амплификации; 4) зона подготовки материала для генетического анализа; 5) зона проведения генетического анализа (рис.6).

# Ввиду контаминационной опасности рабочая зона генетической части лаборатории дополнительно отделена от остальных помещений в соединяющем коридоре.

# С учетом запланированной высокой пропускной способности все ключевые элементы лаборатории связаны не только в поточной схеме, но и соответствующим программным обеспечением.

# Таким образом, использование высокотехнологичного оборудования в молекулярно-генетической лаборатории, создаваемой на базе ФГБУ «Поликлиника №1» Управления делами Президента Российской Федерации, позволит стать крупным диагностическим центром, проводить точную диагностику инфекционных заболеваний, анализировать геном пациента с целью выявления предрасположенностей к тем или иным заболеваниям для своевременного осуществления превентивных мер в индивидуальном порядке. Наличие такого центра позволит перевести медицинское обслуживание в ФГБУ «Поликлиника №1» Управления делами Президента Российской Федерации на качественно новый уровень и составить соответствующую конкуренцию коммерческим генетическим лабораториям на рынке лабораторных услуг.

# Дополнительный визуальный материал:

Видео: « Genome-Wide RNA Analysis in Transcriptome Analysis Console Webinar» <https://www.youtube.com/watch?v=nXMUYTyEzyA> **Литература**

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004
2. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика. Геотар-Медиа. 2007.
3. Грачев В.Г., Сычев Д.А., Раменская Г.В. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины (Руководство для врачей) ГЭОТАР-Медиа. 2008.
4. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Москва, Медицина, 1997.

5 Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико- фармакологические аспекты. М., Реафарма. 2004

# Лабораторное занятие 15 Перспективы индивидуализированной медицины

Безопасность ЛС зависит от индивидуальных особенностей организма, и требует персонализированного подхода к каждому конкретному человеку. Подобный адресный подход, лежащий в основе персонализированной медицины, позволит не только повысить безопасность медикаментозного лечения, но и сократить расходы на коррекцию нежелательных реакций.

Благодаря достижениям молекулярной медицины и, прежде всего, молекулярной генетики сегодня появились высокоэффективные технологии, делающие персонализированную медицину реальностью. Очевидно, что персонализация применения ЛС может оказать существенное влияние на частоту развития нежелательных реакций, в т.ч. со смертельным исходом.

Однако концепция биомаркеров, называемая фармакопротеомикой, находится в начальной стадии развития. На роль инструментов персонализированной медицины претендуют и абсолютно новые направления, такие как фармакотранскритомика (изучение работы гена на основе изучения матричных РНК) и фармакометаболомика (изучение

«интимных» метаболических процессов, происходящих с ЛС).

# Дополнительный визуальный материал:

1. Видео: «What is Personalized Medicine?» <https://www.youtube.com/watch?v=008M6cGX2Zo>
2. Видео: « Personalised medicine could lead to a breakthrough in cancer…..» <https://www.youtube.com/watch?v=JGk2k1mWMk8>

# Литература

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М. - МИА. 2004
2. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика. Геотар-Медиа. 2007.
3. Грачев В.Г., Сычев Д.А., Раменская Г.В. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины (Руководство для врачей) ГЭОТАР-Медиа. 2008.
4. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Москва, Медицина, 1997.

5 Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико- фармакологические аспекты. М., Реафарма. 2004

6. Нанолекарства: концепции доставки лекарств в нанонауке / ред. Алф Лампрехт; пер. с англ. О. В. Таратиной; науч. ред. рус. изд. Н. Л. Клячко.Москва: Научный Мир, 2010.230 с., [2] л. цв. ил.: ил.; 7.(Фундаментальные основы нанотехнологий: исследования и разработки / Моск. гос. ун-т им. М. В. Ломоносова, Науч.-образоват. центр по нанотехнологиям).Пер. изд.: Nanotherapeutics / edited by Alf Lamprecht. (Pan Stanford Publishing, 2009).Библиогр. в конце гл.Предм. указ.: с. 228-230.ISBN 978-5-91522-221-1((в пер.)), 1000.

8. Клиническая фармакология: учебник для студентов медицинских вузов / [Кукес В. Г. и др.]; под ред. акад. РАМН, проф. В.Г. Кукеса.Изд. 4-е, перераб. и доп.Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2009.1052 с.: ил., портр., табл.; 21 см+ 1

электрон. опт. диск (CD-ROM).Авт. указаны на 8-й с.Библиогр.: с. 1039 (16 назв.).Указ. лекарст. средств: с. 1040-1052.?ISBN 978-5-9704-1182-7((в пер.)), 2000.