

СТРЕСС ПОД КОНТРОЛЕМ



Научно-практический журнал
2019 год №3



Главный редактор

Акарачкова Е.С., Президент Международного общества «Стресс под контролем»,
член-корр. РАЕН, д.м.н.

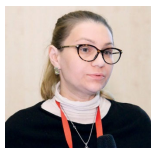
Зам. главного редактора

Замерград М.В., д.м.н., профессор Кафедры неврологии ГБОУ ДПО РМАПО

Редакционная коллегия

Артеменко Ада Равильевна	Котова Ольга Владимировна
Байдаулетова Алия Иманалиевна	Кулуа Тасо Карловна
Блинов Дмитрий Владиславович	Курушина Ольга Викторовна
Борисов Владимир Викторович	Лебедева Джинна Ивановна
Головкова-Кучерявая Мария Сергеевна	Мельникова Ирина Михайловна
Громова Ольга Алексеевна	Орлова Александра Сергеевна
Джобава Элисо Мурманова	Остроушко Надежда Игоревна
Исайкин Алексей Иванович	Преображенская Ирина Сергеевна
Кадырова Лидия Ринадовна	Радченко Ирина Александровна
Клименко Алеся Александровна	Сюняков Тимур Сергеевич
Кондрашов Артем Александрович	Царева Елена Вячеславовна
Косивцова Ольга Владимировна	Шавкута Галина Владимировна

Вступительное слово



Уважаемые читатели!

Перед вами новый выпуск нашего журнала. В этом номере мы продолжили хорошую традицию публиковать наших молодых коллег из Международной школы «Медицина будущего» Сеченовского Университета.

Как и в предыдущем номере информация представлена в необычном для журнальных статей виде - формате воркшопов. Данный формат вызвал большой интерес у читателей. Мы получили много положительных откликов от коллег-клиницистов, что дает нам возможность поднимать интересные темы к обсуждению на страницах нашего журнала.

Президент Международного общества «Стресс под контролем», член-корр. РАЕН, д.м.н.
Акарачкова Е.С.



Уважаемые коллеги!

Данный номер журнала является второй частью проекта, посвященного персонализированной медицине, который был создан благодаря усердной работе студентов Сеченовского Университета на кафедре патологии человека ИКМ под руководством заведующего кафедрой, д.м.н., профессора С.Б. Болевича, д.б.н., профессора С.И. Воробьева, д.м.н., профессора Е.В. Силиной, д.м.н., профессора М.Л. Колотиловой и к.м.н., доцента А.С. Орловой. Надеемся, что статьи, представленные в данном номере, позволят Вам получить новые и интересные знания по данной дисциплине.

К.м.н., доцент кафедры патологии человека ЛФ ФГАОУ ВО Первый Московский
государственный университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет)
Орлова А.С.

Содержание

	Стр.
Таргетная терапия почечно-клеточного рака Климентова Д.А.	05-29
Персонифицированный подход в лечении болевых синдромов Голубенко Е.О.	31-53
Персонализированная медицина в лечении наследственных миодистрофий Дюшенна и Беккера Карасёва А.Д.	55-77
Персонализированная медицина в оториноларингологии Сивохин Д.А.	79-104
Молекулярно-генетические исследования при подозрении Синдрома Линча Филиппов К.Г.	105-124
Молекулярные маркёры, основанные на ПЦР Титова Н.А.	125-149

ФГАОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
Кафедра патологии человека лечебного факультета



Таргетная терапия почечно-клеточного рака

Выполнила студентка 5 курса, группы 86,
Международной школы «Медицина Будущего» (ДОП)
Климентова Диана Андреевна

Москва
2019

Актуальность

- В общей (оба пола) структуре онкологической заболеваемости злокачественные новообразования почки занимают 10-е место (4,0%)
- В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями мужского населения России опухоли почки занимают 8-е место (4,8%)

Первичная заболеваемость злокачественными новообразованиями почек в 2006-2016 гг. среди мужчин

Абсолютное число впервые в жизни установленных диагнозов
злокачественного новообразования в России в 2006-2016 гг.

Локализация, нозологическая форма	Код МКБ 10	Годы										
		2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Мужчины												
Все новообразования	C00-96	220817	226204	228198	235093	237982	240107	240938	245180	259425	270046	273585
Губа	C00	2845	2652	2649	2545	2469	2106	2124	2028	1958	1880	1801
Полость рта	C01-09	4819	4860	5067	5236	5251	5469	5448	5728	6058	6268	6427
Глотка	C10-13	3592	3729	3709	3929	3925	3782	4004	4057	4320	4658	4647
Пищевод	C15	5407	5550	5601	5556	5671	5817	5706	5855	5973	6263	6289
Желудок	C16	23739	23810	22876	22936	22464	21846	21193	21179	21371	21416	21375
Ободочная кишка	C18	12331	12709	12925	13342	13645	14019	14146	14550	15823	16395	17099
Прямая кишка, ректосигмоидное соединение, анус	C19-21	11613	11719	11746	12144	12503	12516	12958	12812	13595	14290	14621
Печень и внутрипеч. желчные протоки	C22	3436	3531	3658	3712	3647	3582	3519	3731	4070	4592	4781
Желчный пузырь и внепеченочные желчные протоки	C23,24	1035	1010	1149	1057	1135	1150	1153	1122	1233	1269	1303
Поджелудочная железа	C25	6662	7127	7055	7354	7522	7378	7649	7724	8404	8791	9072
Полость носа, среднее ухо, придаточные пазухи	C30,31	550	525	559	527	535	594	560	586	644	619	637
Гортань	C32	6242	6138	6335	6165	6237	6291	6346	6209	6223	6453	6653
Трахея, бронхи, легкое	C33,34	47388	47196	46520	46661	46407	45442	45120	45076	46224	48139	48058
Кости и суставные хрящи	C40,41	1031	1091	1057	961	975	969	895	858	799	792	806
Меланома кожи	C43	2696	2888	2897	3047	3093	3324	3335	3390	3573	3976	4076
Кожа (без меланомы)	C44	21418	22189	21828	23040	24007	24316	24061	24502	26185	26874	27708
Соединительная и др. мягкие ткани	C47,49	1630	1505	1640	1633	1644	1612	1594	1550	1632	1715	1719
Половой член	C60	438	409	418	452	499	503	493	501	554	606	589
Предстательная железа	C61	18092	20223	22129	25215	26268	28552	29082	31569	37186	38812	38371
Яичко	C62	1309	1289	1303	1394	1479	1376	1449	1409	1470	1569	1555
Почка	C64,65	8985	9344	9906	10162	10286	10872	10841	11442	12156	12518	13148
Мочевой пузырь	C67	10042	10336	10231	10432	10731	10752	11037	11113	11505	12368	12635
Головной мозг и др. отделы ЦНС	C70-72	3084	3277	3342	3525	3688	3567	3719	3915	3916	4377	4223
Щитовидная железа	C73	1228	1322	1404	1350	1412	1457	1436	1505	1655	1750	1873
Лимфатическая и кровеносная ткань	C81-96	10807	11186	11640	11898	11904	11875	11738	11858	12441	13011	13740

Первичная заболеваемость злокачественными новообразованиями почек в 2006-2016 гг. среди женщин

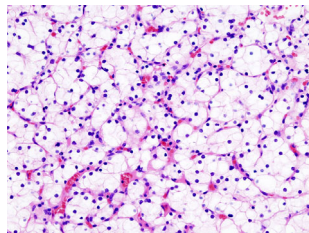
Локализация, нозологическая форма	Код МКБ 10	Годы										
		2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
ЖЕНЩИНЫ												
Все новообразования	C00-96	254615	259183	262536	269882	278892	282303	284993	290707	307545	319335	325763
Губа	C00	1009	917	889	890	887	848	694	683	706	681	642
Полость рта	C01-09	1660	1938	1875	1973	2106	2205	2231	2242	2370	2693	2826
Глотка	C10-13	545	561	588	642	644	608	645	657	712	749	784
Пищевод	C15	1660	1603	1557	1589	1702	1574	1593	1548	1599	1737	1771
Желудок	C16	18191	18131	17739	17387	17311	16472	16176	16114	16441	16435	15760
Ободочная кишка	C18	17798	18105	18807	18992	19333	19720	20092	20242	21561	22690	23125
Прямая кишка, ректосигмоидное соединение, анус	C19-21	12009	12205	12241	12885	13065	13215	13358	13538	14217	14689	14655
Печень и внутрипеч. желчные протоки	C22	2747	2767	2815	2914	2817	2943	2768	3058	3182	3491	3539
Желчный пузырь и внепеченочные желчные протоки	C23,24	2030	2073	2125	2037	2231	2166	2044	2180	2244	2201	2351
Поджелудочная железа	C25	6561	6910	7037	7369	7512	7539	7544	7618	8316	8924	9445
Полость носа, среднее ухо, придаточные пазухи	C30,31	365	399	390	384	363	354	383	378	368	388	386
Гортань	C32	413	357	388	407	452	405	414	419	421	460	495
Трахея, бронхи, легкое	C33,34	9831	9979	10247	10391	10578	10588	10355	10975	11461	12212	12409
Кости и суставные хрящи	C40,41	862	859	861	816	782	730	795	660	737	711	673
Меланома кожи	C43	4668	4844	4847	4966	5323	5394	5388	5584	5920	6260	6378
Кожа (без меланомы)	C44	34920	35314	35710	37079	40161	41359	41282	41636	45006	46491	47013
Соединительная и др. мягкие ткани	C47,49	1738	1740	1740	1780	1769	1879	1806	1857	1851	1896	2012
Молочная железа	C50	50292	51865	52469	54315	57241	57534	59037	60717	65088	66621	68547
Шейка матки	C53	13268	13419	13807	14351	14719	14834	15051	15427	16130	16710	17212
Тело матки	C54	17885	18302	18789	19595	19784	20821	21302	22242	23570	24422	25096
Яичник	C53	12556	12609	12761	12843	13093	12960	12935	13262	13634	14049	14017
Почка	C64,65	7047	7426	7657	8166	8437	8785	8834	9450	10078	10328	10760
Мочевой пузырь	C67	2679	2686	2771	2828	3047	3032	3175	3214	3403	3644	3830
Головной мозг и др. отделы ЦНС	C70-72	3026	2985	3236	3444	3557	3660	3704	3980	4191	4519	4570
Щитовидная железа	C73	7704	7916	7580	7485	7467	8179	8389	8237	8703	9551	10321
Лимфатическая и кровеносная ткань	C81-96	11628	11648	12000	12490	12566	12450	12623	12971	13671	14583	14972

Первичная заболеваемость злокачественными новообразованиями почек среди мужчин с каждым годом увеличивается.

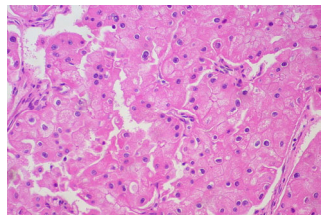
Первичная заболеваемость злокачественными новообразованиями почек среди женщин с каждым годом увеличивается, но в целом значение данного показателя у женщин ниже.

Почечно-клеточный рак составляет примерно 90 % всех злокачественных новообразований почки

Виды ПКР



Светлоклеточный тип ПКР
представлен скоплениями крупных
полигональных клеток со светлой
цитоплазмой

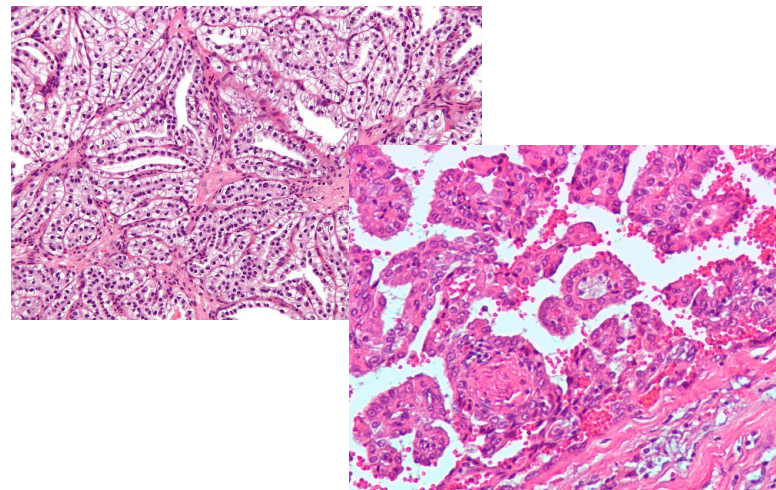


Хромофобный тип ПКР
представлен хромофобными клетками с
зернистой цитоплазмой.

Виды ПКР

Папиллярный тип ПКР

содержит сосочковые структуры из мелких клеток с мелкими ядрами



Основные особенности разных видов ПКР

Светлоклеточный тип (80-90%)

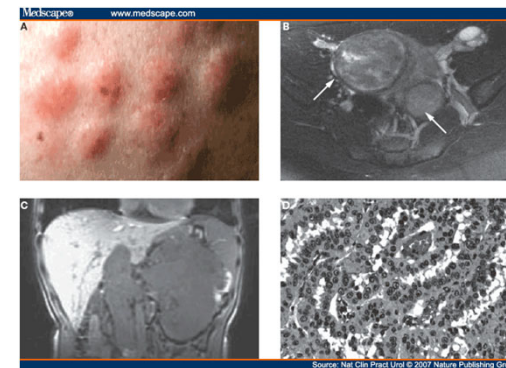


Быстро растущая, хорошо васкуляризированная опухоль

Основные особенности разных видов ПКР

Папиллярный тип (10-15%)

Папиллярный тип ПКР является компонентом наследственного синдрома лейомиоматоза и почечно-клеточного рака. Данный синдром характеризуется также предрасположенностью к доброкачественному лейомиоматозу кожи и матки.

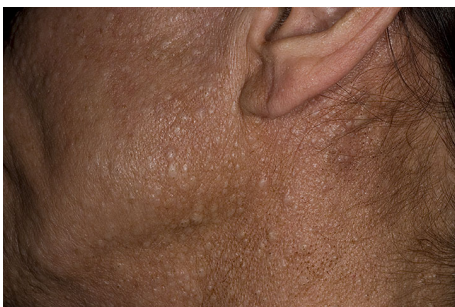


- В опухоли часто встречаются участки некроза
- Ассоциирован с наследственным синдромом лейомиоматоза и почечно-клеточного рака

Основные особенности разных видов ПКР

Хромофобный тип (4-5%)

Хромофобный тип ПКР ассоциирован с синдромом Берта-Хога-Дьюба, проявляющегося развитием фиброфолликулом, кистами в легких и повышенным риском возникновения хромофобного типа ПКР.



- Имеет более благоприятный прогноз, чем первые два типа
- Ассоциирован с синдромом Берта-Хога-Дьюба

Мутации, ассоциированные с ПКР

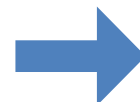
Каждый тип ПКР ассоциирован с мутациями в разных генах.

Мутации в гене-супрессоре
опухолевого роста VHL



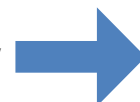
Светлоклеточный тип ПКР

Мутации в протоонкогене MET, в
гене фумарат-гидратазы



Папиллярный тип ПКР

Мутации в генах PTEN, TP-53, FLCCL
(синдром Берта-Хога-Дьюба)



Хромофобный тип ПКР

Методы лечения локализованного ПКР

Хирургический

- Резекция почки
- Нефрэктомия



На сегодняшний день хирургический метод лечения ПКР является самым эффективным.

Однако, операция возможна только при отсутствии метастазов.

Кроме того, сложно судить о том, какой объем вмешательства необходим и гарантирует ли нефрэктомия или резекция почки избавление от болезни.

Лечение метастатического ПКР

- Хирургическое удаление метастазов ПКР
- Лучевая терапия
- Лекарственное лечение

Чаще всего эти методы комбинируют

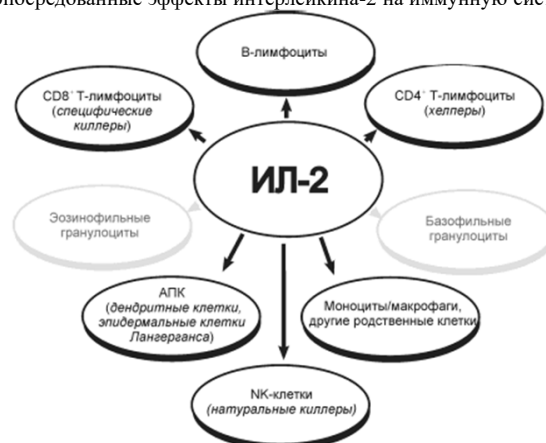
***Лекарственные средства,
используемые для терапии
почечно-клеточного рака сегодня***

Интерлейкин-2

Применение интерлейкина-2, как правило, довольно эффективно.
Интерлейкин-2 вовлекает клеточный и гуморальный иммунитет в борьбу с опухолью

Прямые и опосредованные эффекты интерлейкина-2 на иммунную систему

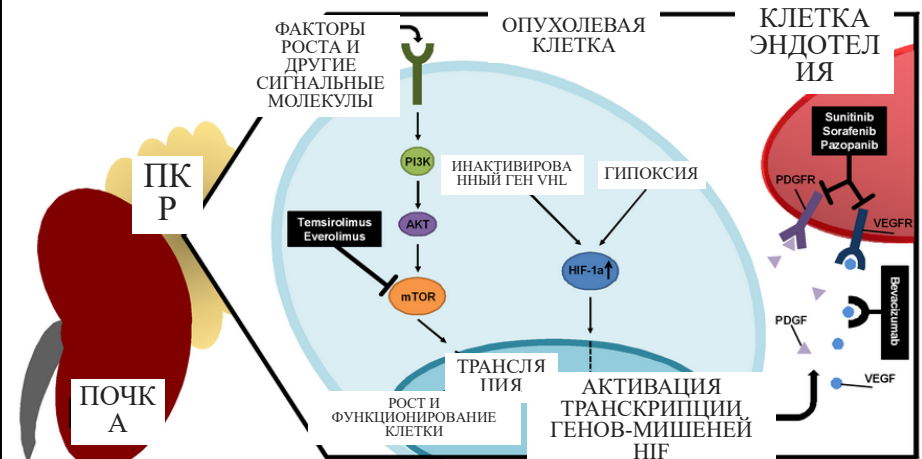
- Применяется в высоких дозах
- Эффективен в 15% случаев
- Эффект длительный
- 1% пациентов погибает от токсических эффектов препарата



■ Прямые и опосредованные эффекты
■ Опосредованные эффекты

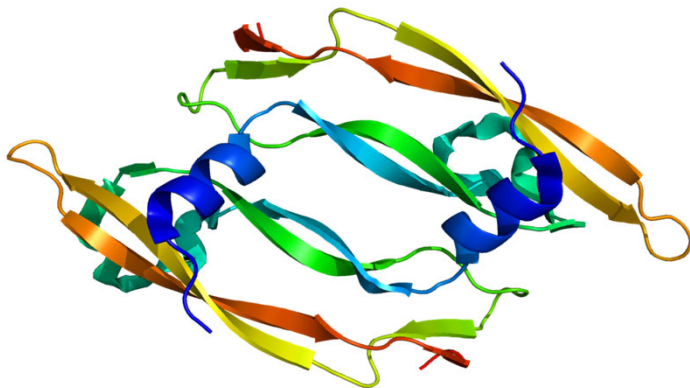
Мишени лекарственных веществ, используемых сегодня в терапии почечно-клеточного рака

Мишенями лекарственных средств используемых в терапии ПКР являются белки mTOR, факторы роста эндотелия сосудов и рецепторы фактора роста эндотелия сосудов.



Блокаторы фактора роста эндотелия сосудов и его рецепторов

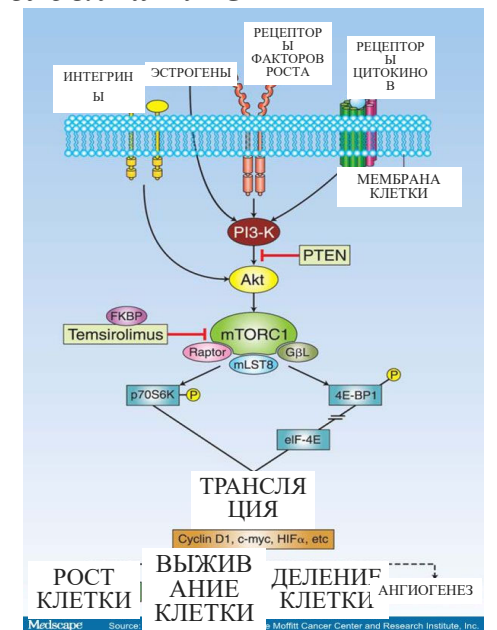
Блокаторы фактора роста эндотелия сосудов и его рецепторов блокируют образование новых сосудов в строме опухоли, таким образом сдерживая ее рост.



Ингибиторы белка mTOR

Схема действия ингибиторов белка mTOR

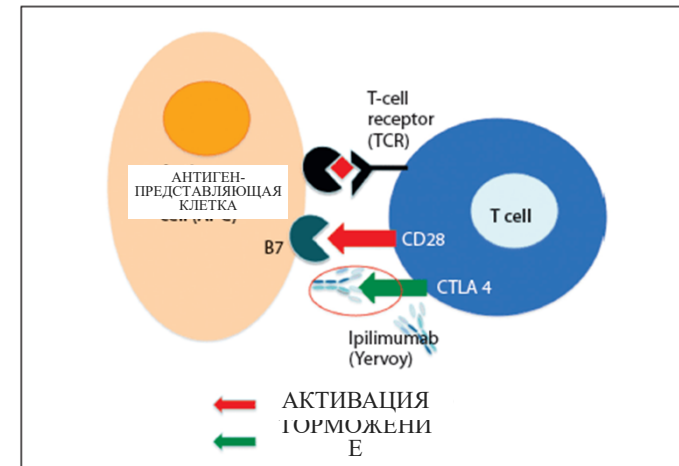
- Блокируют каскад реакций, запускаемый факторами клеточного роста
- Блокада белка mTOR приводит к остановке роста и деления опухолевых клеток и ангиогенеза.



Препараты, находящиеся в разработке

Антитела к CTLA-4

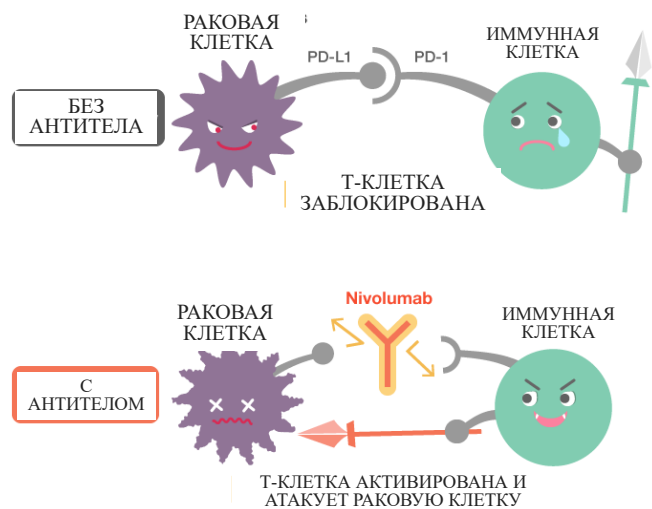
Схема механизма действия антител к CTLA-4.



Взаимодействие ипилимумаба с CTLA-4 приводит к активации клеточного иммунитета.
Устраняют сдерживающее влияние CTLA-4 на Т-клетки.

Антитела к PD-1

Схема механизма действия антител к PD-1.



Когда препарат ниволумаб блокирует рецептор иммунной клетки PD-1, лиганд раковой клетки не может препятствовать активации клеточного иммунитета.

pipron.com

Выводы

- Рак почки представлен в основном почечно-клеточным раком (светлоклеточным, папиллярным или хромофобным); каждый из типов ПКР ассоциирован с определенными генетическими мутациями, кроме того, папиллярный и хромофобный ПКР ассоциированы с наследственными синдромами
- Самый эффективный метод лечения ПКР сегодня - хирургический, но данное утверждение справедливо лишь для начальных стадий заболевания; для лечения метастатического ПКР эффективно применение лучевой терапии, циторедуктивных операций и химиопрепаратов: интерлейкина 2, ингибиторов белка MTOR и блокаторов фактора роста эндотелия сосудов и его рецепторов
- Новые таргетные препараты (моноклональные антитела к CTLA-4 и к PD-1), проходят на данный момент клинические испытания и показывают многообещающие результаты. Данные препараты избирательно воздействуют на клеточное звено иммунитета, устраняя сдерживающие влияния CTLA-4 и PD-L1 на Т-клетки.

Список литературы

1. Алексеева Г.Н., Стегний К.В., Писарева Л.Ф. и др. Совершенствование организации медицинской помощи при раке почки. Урология, 2017.-N 6.-С.87-90.
2. Afriansyah A, Hamid AR, Mochtar CA, Umbas R. Targeted Therapy for Metastatic Renal Cell Carcinoma. Acta Med Indones. 2016;48(4):335-347.
3. van der Veldt AA, Haanen JB, van den Eertwegh AJ, Boven E. Targeted therapy for renal cell cancer: current perspectives. Discov Med. 2010;10(54):394-405.
4. Daigo Y, Nakamura Y. From cancer genomics to thoracic oncology: discovery of new biomarkers and therapeutic targets for lung and esophageal carcinoma. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2008; 56(2):43-53.
5. Kumar A, Kumari N, Gupta V, Prasad R. Renal Cell Carcinoma: Molecular Aspects. Indian J Clin Biochem. 2018;33(3):246-254.
6. Crespigio J, Berbel LCL, Dias MA et al. Von Hippel-Lindau disease: a single gene, several hereditary tumors. J Endocrinol Invest. 2018;41(1):21-31.
7. Bex A, Albiges L, Ljungberg B et al. Updated European Association of Urology Guidelines Regarding Adjuvant Therapy for Renal Cell Carcinoma. Eur Urol. 2017;71(5):719-722.
8. Sharma P, Wagner K, Wolchok JD, Allison JP. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. Nat Rev Cancer 2011;11:805-12.
9. Sudarshan S, Pinto PA, Neckers L, Linehan WM. Mechanisms of disease: hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer--a distinct form of hereditary kidney cancer. Nat Clin Pract Urol. 2007;4(2):104-10.

ФГАОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
Кафедра патологии человека лечебного факультета



Персонализированный подход в лечении болевых синдромов

Выполнила студентка 6 курса, группы 91,
Международной школы «Медицина будущего» (ДОП)
Голубенко Екатерина Олеговна

Москва
2019

Актуальность

- ✓ Существующие на сегодняшний день анальгетики не всегда обладают достаточной специфичностью и эффективностью в отношении пациента.
- ✓ Исследования генетических полиморфизмов, связанных с болевыми синдромами и метаболизмом лекарственных средств предвещают новый терапевтический подход с целевым обезболиванием и меньшим количеством побочных эффектов.



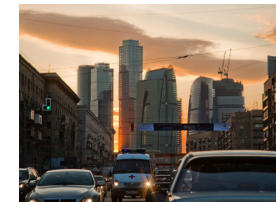
Генетика боли



«Болевой геном»

Формирование боли можно разделить на 4 последовательных этапа:

- 1) Инициация и восприятие боли, болевое раздражение;
 - 2) Передача боли от болевых рецепторов по нервным окончаниям распространяется к спинному и головному мозгу;
 - 3) Преобразование боли;
 - 4) Осознание боли в головном мозге, который воспринимает болевой сигнал и анализирует его.
- Совокупность генов, вовлеченных в эти процессы, принято называть «болевым геномом».



Гены, вовлеченные в «болевой геном»

Цитокины	IL6, IL10, TNF
Ферменты	COMT, GCH1, CYP2D6
Ионные каналы	KCNS1, CACNG2
Рецепторы	OPRM1, ADRA2, DRD2
Белки-транспортёры	DAT1, 5HTT, ABCB1

Гены, уменьшающие интенсивность боли

COMT	Катехол-О-метилтрансфераза
GCH1	Гуанозинтрифосфат циклогидролаза 1
MC1R	Меланокортин-1 рецептор
TRPV1	Рецептор транзитного катионного потенциала
OPRM1	m-опиоидный рецептор

Изучение продуктов экспрессии этих генов может помочь в разработке
таргетной терапии болевых синдромов.

Как изучение пациентов с редкими вариациями в геноме помогает создать «мишень» для действия новых препаратов?

В статье Nature в 2006 году было описано три семейства, в которых близкородственные браки приводили к тому, что дети рожденные в этих семейства были не способны ощущать боль.

У этих детей две копии мутации в гене SCN9A, который кодирует канал натрия, важный для восприятия боли, что в итоге приводит к полной потере функции натриевого канала и, соответственно, к неспособности ощущать боль.

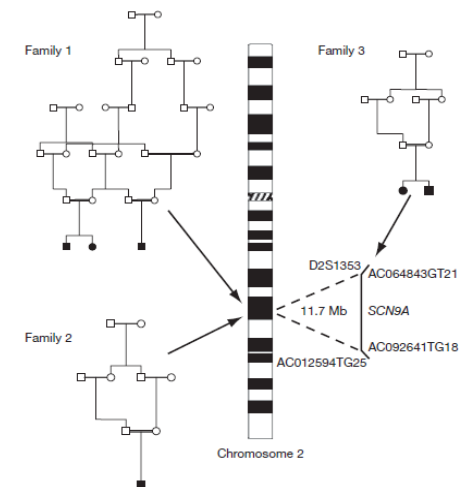
Как изучение пациентов с редкими вариациями в геноме помогает создать «мишень» для действия новых препаратов?

На схеме представлены локусы, в которых были найдены мутации у членов этих семейств. Близкородственные браки способствовали ее фенотипическому проявлению.

Гетерозиготные маркеры мутации - D2S1353 и AC012594TG25;

Гомозиготные маркеры мутации - AC064843GT21 и AC092641TG18.

Затронутые индивиды на схеме обозначаются заполненными символами.



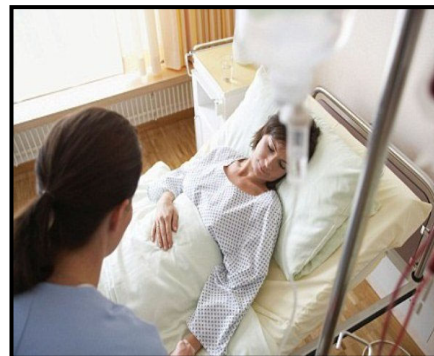
Что уже известно?

Участок хромосомы 5p15.2	Ассоциирован с 30 % возникновения хронических болей
Участок хромосомы 1p31	Ассоциирован с болями в тяжелых стадиях остеоартрита



Что уже известно?

Гены, кодирующие серин / треонин-протеинкиназы	Коррелирует с увеличением частоты возникновения послеоперационных болей
Участки хромосом 2q33-2q34	Стойко связаны с необходимостью назначения послеоперационных опиоидных анальгетиков



Что уже известно?

Метаботропные глутаматные рецепторы mGluR6 и mGluR8, ядерный рецептор NR4A2	Доказано участие в возникновении героинной зависимости
Гены метаболических путей кальция и калия	Множественные ассоциации с опиоидной зависимостью



Боли в пояснице

Механический компонент - дегенерация позвоночника и межпозвоночных дисков



генетические и биохимические механизмы

- полиморфизм аллеля Trp2
- COL9A2, кодирующий α2 цепь коллагена IX, связан с 4-кратным увеличением
- риска развития дегенеративной болезни диска и грыж концевых пластинок

Стадии образования межпозвоночной грыжи



Мигрень

Локусы хромосом, ассоциированные с возникновением мигрени:

- Xq24-28.31,32;
- 8q22.1,
- 2q37.1,
- 12q13.3,
- 1p36.32.34



Фибромиалгия

Гены, затронутые в патогенезе фибромиалгии:

- транспортера серотонина (SLC6A4),
- интерлейкин-1 (IL1RN),
- меланокортин-1 (MC1R),
- гены (IL6 и TNF- α),
- ген катехол-О-метилтрансферазы



Генетика боли

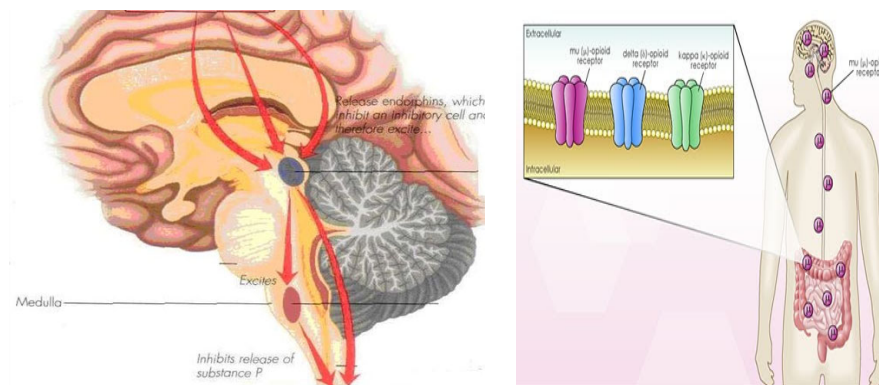
Фармакогенетическая терапия
болевых синдромов

Генетическая основа
чувствительности
к боли

Генетические
особенности
эффективности
анальгезии

Способы воздействия на фармакогенетику боли:

- через ферменты метаболизма лекарственного средства;
- транспортные системы;
- опиоидные или другие рецепторы болеутоляющих средств;
- структуры, участвующих в восприятии и обработке боли.



Концепция «адаптация дозы на основе фармакогенетики»

Фармакогенный тест при назначении ЛС:
Иммуно-опосредованные побочные эффекты
(например, HLA-B * 15: 02);
Лекарственный метаболизм (например, CYP2D6)

«Экстенсивные»
(«нормальные»)
метаболизаторы



Лечение
рекомендуемыми
дозами

«Медленные
метаболизаторы

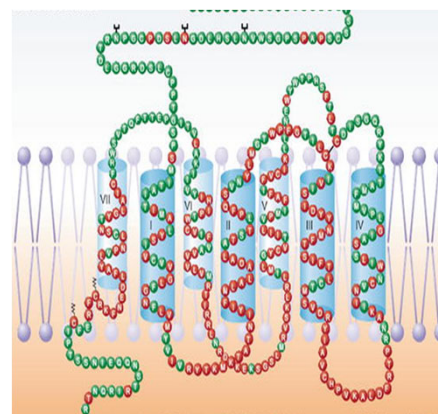


Отрегулируйте дозировку препарата
или используйте альтернативное ЛС

«Быстрые»
метаболизаторы



М-опиоидный рецептор (OPRM1) – основной сайт связывания опиоидных препаратов



- более 100 генетических полиморфизмов были обнаружены в гене OPRM1;
- Наиболее распространенный и изученный - нуклеотидный полиморфизм rs1799971 приводит к замене аденозина (A) на гуанозин (G);
- В результате подавляется увеличение уровня экспрессии OPRM1
- Снижается терапевтическая эффективность М-агонистов

Циклические антидепрессанты в качестве ко-анальгетиков

- «Медленные» метаболизаторы имеют более высокий риск побочных эффектов, поэтому им необходимо снижать дозу на 60%, чтобы избежать аритмии и миелосупрессии.
- «Быстрые» метаболизаторы циклических антидепрессантов имеют более низкие концентрации лекарственного средства, что приводит к недостаточному терапевтическому эффекту.

Циклические антидепрессанты в качестве ко-анальгетиков



**Противоэpileптические препараты.
HLA-ассоциация лекарственно-индуцированной
цитотоксичности**



**Противоэpileптические препараты.
HLA-ассоциация лекарственно-индуцированной
цитотоксичности**

Противоэpileптические препараты часто являются причиной кожных побочных эффектов.

Спектр их варьируется от экзантемы до опасных для жизни тяжелых реакций, таких как токсический эпидермальный некролиз, синдром Стивенса Джонсона (смертность до 35%).

Эти опасные для жизни состояния нельзя было предсказать и предотвратить до недавнего продвижения фармакогеномики и обнаружения сильной ассоциации между аллелем HLA (HLA-B*15:02) и индуцированным карбамазепином токсическим эпидермальным некролизом.

Было показано, что такая молекула HLA приводит к клональному расширению и активации цитотоксических T-клеток CD8.

Большое проспективное исследование показало, что скрининг на эти типы HLA до назначения карбамазепина может эффективно снижать заболеваемость индуцируемым карбамазепином токсическим эпидермальным некролизом.

Эта генетическая ассоциация, хотя и слабее, также была обнаружена с фенитоином и ламотриджином

Список литературы

1. Дедов И.И., Тюльпаков А. Н., Чехонин В. П. Персонализированная медицина: современное состояние и перспективы. Вестник Российской Академии медицинских наук. 2012;12: 4-12.
2. Манак Н.А. Персонализированная и трансляционная медицина: новые подходы к лечению. Актуальные проблемы медицины. 2014;9: 41–45.
3. Министерство Здравоохранения РФ «О направлении методических рекомендаций «Фармакотерапия хронического болевого синдрома у взрослых пациентов при оказании паллиативной медицинской помощи в стационарных и амбулаторно-поликлинических условиях» от 26 февраля 2015 года N17– 7/10/1–797.
4. Силина Е.В., Котов А.С., Елисеев Ю. В. Боль (учебное пособие). М.: МОНИКИ, 2013:42.
5. Сычев Д.А., Клиническая фармакогенетика: Учеб. пособие. Москва. 2007:20.
6. Battie MC, Videman T, Levalahti E, et al. Heritability of low back pain and the role of disc degeneration. Pain 2015;131(3):272–80.
7. French LE. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome our current understanding. Allergol Int. 2006; 55: 9–16.
8. Lariviere WR, Young EE, Belfer I. Genetic basis of pain variability: recent advances. J Med Genet 2012;49(1):1–9.
9. Manworren RC. Multimodal pain management and the future of a personalized medicine approach to pain. AORN J. 2015;101(3):308–14;
10. Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, et al. Genome-wide association study identifies a potent locus associated with human opioid sensitivity. Mol Psychiatry 2014; 19(1):55–62.
11. Peters MJ, Broer L, Willems HL, et al. Genome-wide association study metaanalysis of chronic widespread pain: evidence for involvement of the 5p15.2 region. Ann Rheum Dis 2013;72(3):427–36.
12. Relling MW, Evans WE. Pharmacogenomics in the clinic. Nature 2015; 526: 343–50.
13. Seltzer Z, Wu T, Max MB et al. Mapping a gene for neuropathic pain-related behavior following peripheral neurectomy in the mouse. Pain 2001;93(2): 101.
14. Spina E, Scordo MG. Clinically significant drug interactions with antidepressants in the elderly. Drug Aging 2002; 19: 299–320.
15. Ko TM, Wong CS, Wu JY, Chen YT. Pharmacogenomics for personalized pain medicine. Acta Anaesthesiol Taiwan. 2016;54(1):24-30.
16. Webster LR, Belfer I. Pharmacogenetics and Personalized Medicine in Pain Management. Clin Lab Med. 2016; 36(3):493–506.

ФГАОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
Кафедра патологии человека лечебного факультета



Персонализированная медицина в лечении наследственных миодистрофий Дюшенна и Беккера

Выполнила студентка 5 курса, группы 87,
Международной школы «Медицина Будущего» (ДОП)
Карасёва Анна Дмитриевна

Актуальность исследования

Миодистрофия Дюшенна (МДД, злокачественная форма) / Беккера (МДБ, доброкачественная форма) – наследственное X-сцепленное рецессивное заболевание, характеризующееся прогрессирующей псевдогипертрофической мышечной дистрофией (ПМД) с началом в раннем возрасте, в сочетании с сердечно-сосудистыми, костно-суставными и психическими нарушениями.

Частота заболевания для МДД и МДБ соответственно составляет приблизительно 1 случай на 3500 новорожденных мальчиков и 1 случай на 30000 новорожденных мальчиков.

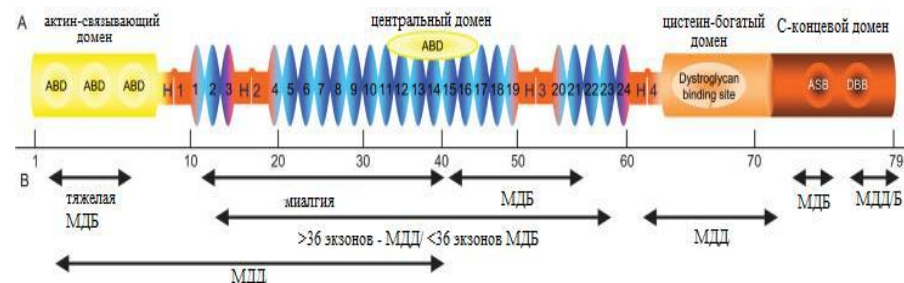


Этиология

Приблизительно 55-65% всех случаев миодистрофий Дюшенна и Беккера обусловлены делециями гена дистрофина (DMD), который кодирует мышечный белок дистрофин и находится на X-хромосоме в сегменте Xp2. 5-10%- дупликации части гена, а у остальных - точковые мутации.

Делеции в гене дистрофина преимущественно группируются вокруг двух областей гена, образуя «горячие точки» делеций – в 5'-области гена (экзоны 2-20) и в его дистальной части в области экзонов 44-53.

Этиология

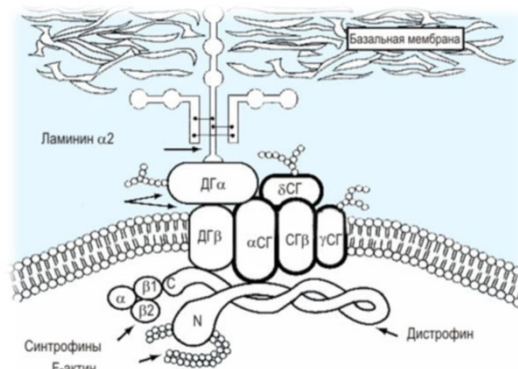
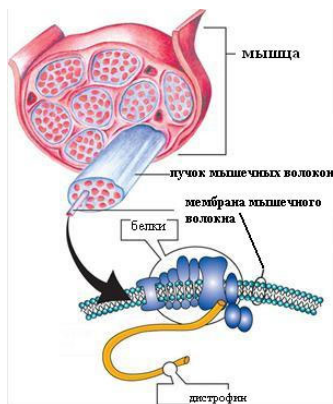


Дистрофин состоит из четырех областей (79 экзонов):

N-концевой актин-связывающий домен (ABD);
 центральный домен, содержащий 24 спектрин-подобных повтора (1-24,синий), прерывающийся 4 шарнирными областями (H1-4, оранжевый);
 цистеин-богатый домен (светло-оранжевый);
 и С-концевой домен (темно-оранжевый) (рисунок 1 –А).

Графически показаны соотношения между участком делеции и тяжестью фенотипа (рисунок 1 –В)

Патогенез



Патогенез

Дистрофин - составная часть большого дистрофин-гликопротеидного комплекса, связывающего внутриклеточный актин с ламинином внеклеточного матрикса и способствующего, таким образом, укреплению сарколеммы.

Недостаточность дистрофина (при миодистрофии Дюшенна/Беккера) ослабляет сарколемму. Структурные изменения в сарколемме приводят к дегенерации цитоплазматических компонентов и усиленному входу ионов калия внутрь волокон, что вызывает гибель миофибрилл.

В небольших количествах дистрофин представлен в сердечной мышце, гладкой мускулатуре и ЦНС. Это объясняет вовлечение миокарда и ЦНС в клиническую картину болезни.

Клиническая картина

МДД:

- ✓ Симптомы появляются в возрасте 1-5 лет;
- ✓ Ранние признаки: псевдогипертрофия дельтовидных мышц, низкая выносливость при стоянии без посторонней помощи и трудности при самостоятельном поднятии с пола;
- ✓ Мышечная слабость: в первую очередь атрофируются мышцы бедер, таза, плеч и икроножные мышцы, потом слабость распространяется на шею, руки и др. части тела;
- ✓ Неуклюжая, тяжёлая походка: пациенты ходят на пальцах (носочках), т.к. повышен тонус икроножных мышц;
- ✓ Вторичные деформации позвоночника (усиление лордоза и кифоза, сколиоз), грудной клетки (по типу седловины и килевидной) и стоп
- ✓ Ретракции сухожилий с развитием контрактур в суставах;
- ✓ Больные часто падают;
- ✓ Постоянная усталость;
- ✓ У 30% больных олигофрения в степени дебильности;
- ✓ Неспособность к ходьбе после 12 лет;
- ✓ Кардиомиопатия: симптомы гипертрофии левого желудочка и аритмия;
- ✓ Сердечная и дыхательная недостаточность (смерть до 25 лет).

МДБ:

МДБ манифестирует в возрасте от 10 до 20 лет.

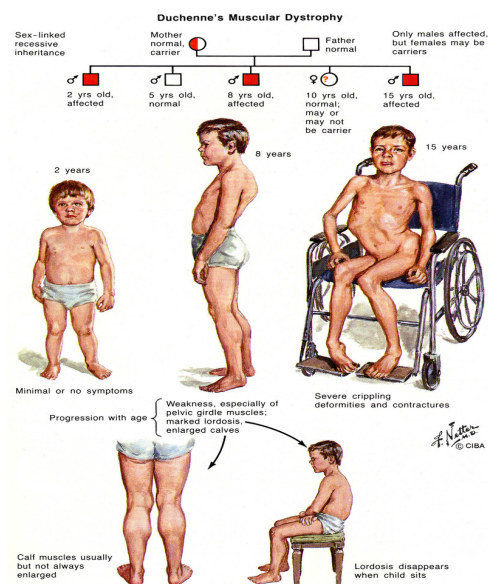
Клинические симптомы выражены намного слабее, психические функции, как правило, не страдают.

Инвалидизация в большинстве случаев наступает не раньше 40 лет.

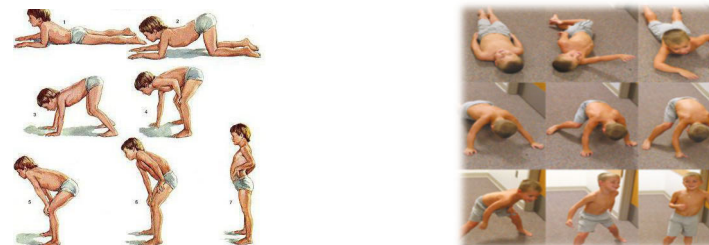
Клиническая картина



Симптомы МДД



Симптомы МДД



Симптом «лесенки» (симптом Говерса) - поднимаясь из положения сидя на корточках, ребенок активно опирается руками о собственное тело, как бы взбираясь по нему как по лесенке.

Вследствие мышечных атрофий формируется «осиная» талия и отстоящие от спины «крыловидные» лопатки. Типичным симптомом выступает псевдогипертрофия икроножных мышц. Наблюдается выпадение сухожильных рефлексов: вначале — коленных, затем — рефлексов с трицепса и бицепса плеча. Ахилловы и карпорадиальные рефлексы могут длительное время быть сохранены.

Варианты течения МДД

Вариант	Возраст дебюта, годы	Способность к ходьбе и состояние опорно-двигательной системы
I (классическое течение)	2-5	Теряет способность ходить в 10-12 лет. Генерализованная мышечная слабость, затем сколиоз, контрактуры голеностопных, коленных и других суставов
II (с кушингоидным синдромом)	2-5	Теряет способность ходить в 10 лет или ранее. Генерализованная мышечная слабость, затем сколиоз, контрактуры голеностопных и других суставов
III (врожденная форма)	1-2-й год жизни	Теряет способность ходить до 10 лет, иногда в 6,5-7 лет. Ранние множественные контрактуры. Быстрое прогрессирование
IV (кардиомиопатический)	2-6	В 6,5-7 лет обнаруживается кардиомиопатия при небольших проявлениях мышечной слабости (затруднения при подъеме по лестнице). Относительно медленное прогрессирование
V (смешанный)	1-6	Теряет способность ходить в 10-12 лет или ранее. Генерализованная мышечная слабость

Варианты течения МДД

Вариант	Масса тела, интеллект, осложнения	Приблизительная доля от общего числа пациентов
I (классическое течение)	Масса тела снижена. Психическое развитие в норме; кардиомиопатия обнаруживается после 8-10 лет	30%
II (с кушингоидным синдромом)	Ожирение (лунообразное лицо, отложение жира по женскому типу). Кардиомиопатия обнаруживается после 10 лет	22%
III (врожденная форма)	Масса тела снижена или в норме. Задержка психического развития. Кардиомиопатия обнаруживается в 7-10 лет	13%
IV (кардиомиопатический)	Масса тела снижена или в норме. Психическое развитие в норме	7%
V (смешанный)	Различные сочетания	28%

Прогноз при МДД

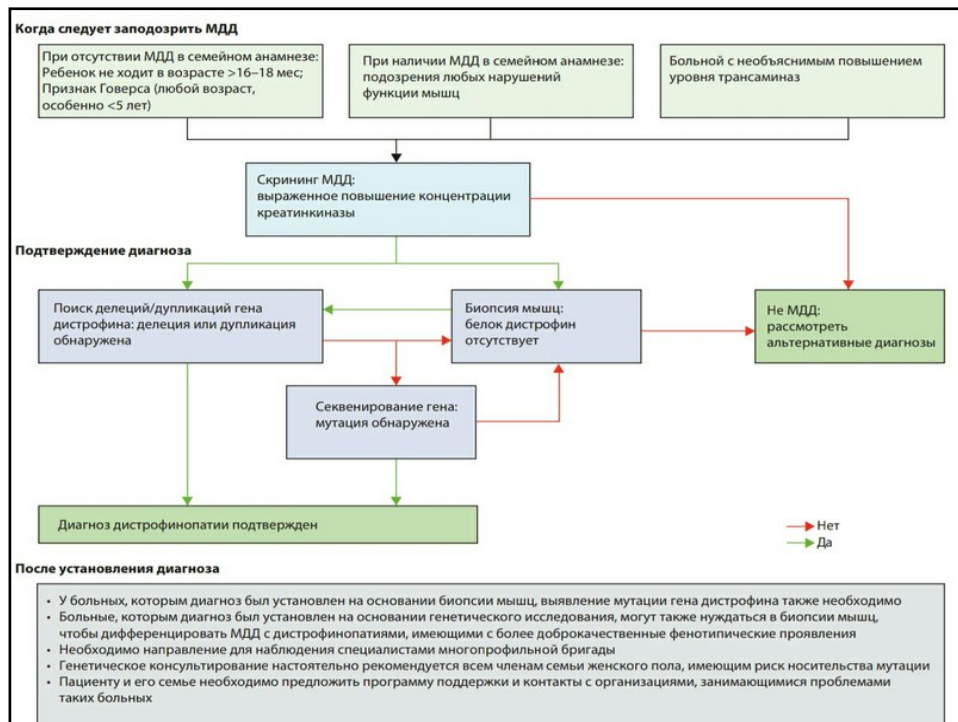


Распространение дистрофического процесса на дыхательную мускулатуру приводит к прогрессирующему падению жизненной емкости легких (ЖЕЛ) и, в конечном итоге, больным требуется ИВЛ. Имеющиеся кардиомиопатия, а также дыхательные нарушения приводят к смерти больных в возрасте до 25 лет от инфекций, дыхательной и сердечной недостаточности.

Диагностика

- ✓ КФК-ММ
- ✓ Биопсия мышц
- ✓ ДНК-диагностика
- ✓ ЭМГ
- ✓ ФВД, ЖЕЛ
- ✓ ЭКГ, ЭХО-КГ





* невыявление мутации при ДНК-анализе не говорит о ее отсутствии, поскольку поиск точковых мутаций обычно не входит в задачи анализа из-за его большой длительности и трудоемкости.

Дифференциальную диагностику проводят с миодистрофией Беккера, мышечной дистрофией Дрейфуса, дистрофией Эрба-Рота, а также с полиневропатиями, полимиозитом, боковым амиотрофическим склерозом (БАС).

Лечение

Традиционное Клеточная терапия Генная терапия

преднизон/преднизолон – таблетка 5 мг;
дефлазакорт – таблетка 30 мг;

Перечень дополнительных лекарственных средств:

пиридоксина гидрохлорид – 5% раствор для инъекций 50мг/1,0мл;

тиамина гидрохлорид – 5% раствор для инъекций 50мг/1,0мл;

цианокобаламин – раствор для инъекций 200мкг/1,0мл, 500мкг/1,0мл;

витамин D3 – водный, масляный раствор для приема внутрь; капсулы и таблетки 0,25, 0,5, 1,0 мкг; раствор для в/в введения 2мкг/1,0мл и 5мкг/1,0мл.

левокарнитин - раствор для приема внутрь 1г/10,0мл, раствор для приема внутрь 300мг/1мл; раствор для инъекций 1г/5,0мл.

реабилитационные мероприятия, консультации смежных специалистов

трансплантация **аллогенных** миобластов

трансплантация **аутогенных** миобластов

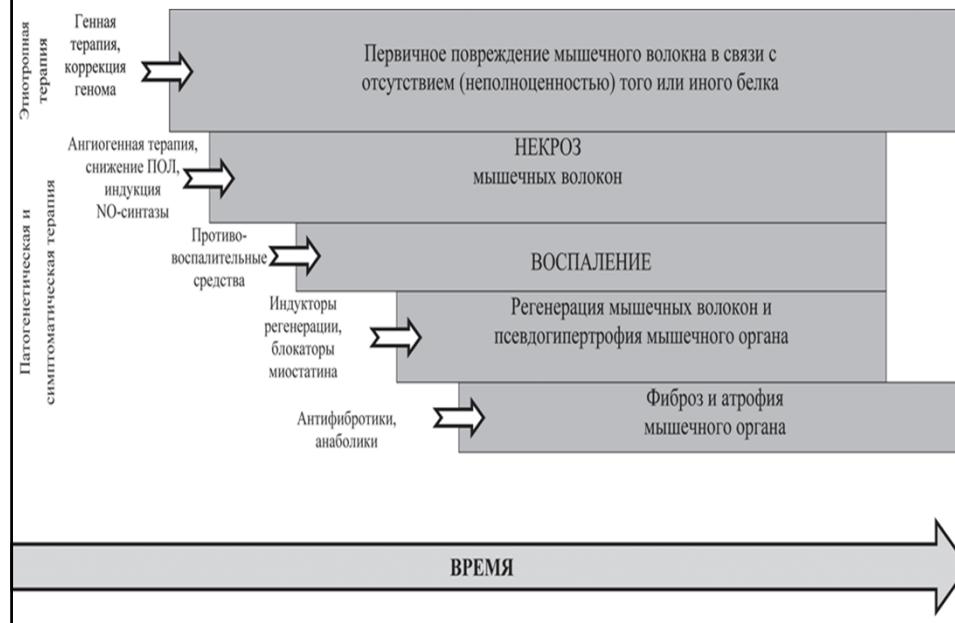
коррекция дефекта путем введения нормальных копий кДНК гена дистрофина

в составе **рекомбинантных вирусных частиц** или посредством невирусных способов доставки;

коррекция мутаций на уровне **геномной копии** гена или на его первичном РНК-транскрипте;

активация в мышечных волокнах и клетках репрессированного в ходе онтогенеза аутосомного гомолога гена дистрофина — гена **утрофина**

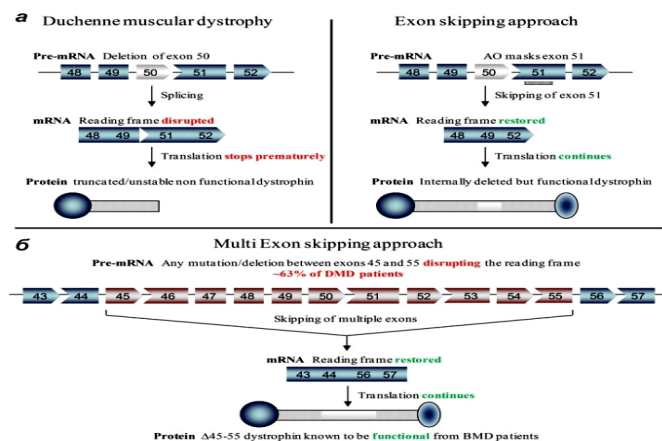
Патоморфология миодистрофий



Методика «пропуска экзонов»

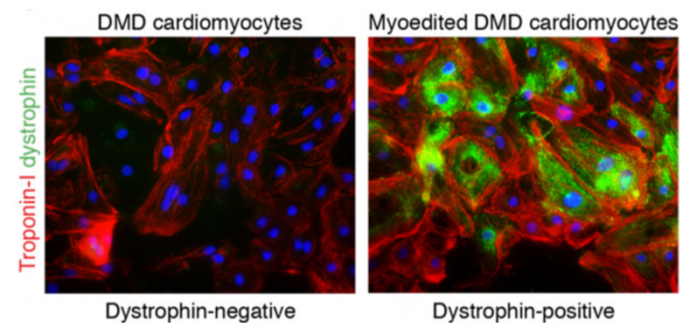
Основывается на пропуске экзонов путём введения АОНов* с помощью технологии редактирования генома CRISPR**, которые, присоединяясь к нужным экзонам в гене, “маскируют” их.

В результате ген считывается без “замаскированных” экзонов и синтезируется менее дефектная форма дистрофина, которая может выполнять функции не мутировавшего дистрофина.



Методика «пропуска экзонов»

В 2017 году ученые трех лабораторий успешно применили технологию пропуска экзонов in vivo на стандартном объекте — мышах — и показали, что их метод помогает восстановить рамку считывания и частично восстановить синтез дистрофина. Поскольку даже невысокий его уровень (3–15% от нормального) приносит терапевтическую пользу, результаты работ можно назвать успешными.



Лечение стволовыми клетками

клетки-сателлиты

- выделяются из мышц
- унипотентны
- вводятся только путём инъекции в каждую мышцу через каждые 2 мм

клетки-перициты

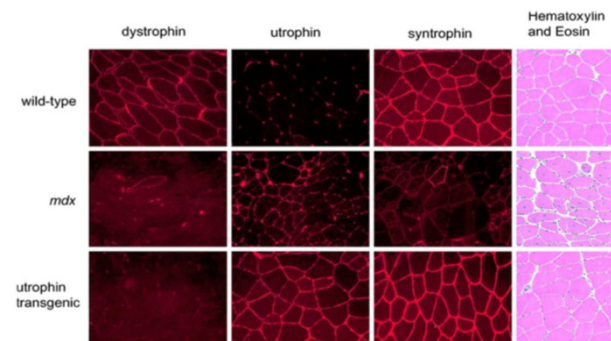
- выделяются из кровеносных сосудов скелетных мышц
- мультипотентны
- можно вводить системно в кровоток (считается, что способны найти «свой путь» к пораженным мышцам)

Исследования последних лет показали, что метод является перспективным: при введении аутогенных стволовых клеток до 26% миоцитов начинают вырабатывать собственный дистрофин.

Однако данный эффект является нестойким.

Активация утрофина

Этот ген является ближайшим эндогенным аналогом дистрофина в геноме человека, он короче и расположен у человека на 6 хр.. Еще ранее стало известно, что активация утрофина может частично компенсировать недостаток дистрофина в мышечных клетках. Последние лабораторные исследования утрофина показали существенное улучшение роста мышц у мышей с ДМД.



Список литературы

1. Falzarano MS, Scotton C, Passarelli C, Ferlini A. Duchenne muscular dystrophy: from diagnosis to therapy. *Molecules*. 2015; 20: 18168–18184.
2. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management., DMD Care Considerations Working. *Lancet Neurol*. 2010;9(1):77-93.
3. Long C, Li H, Tiburcy M et al. Correction of diverse muscular dystrophy mutations in human engineered heart muscle by single-site genome editing. *Sci Adv*. 2018;4(1):eaap9004.
4. Long C, Amoasii L, Mireault AA et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*. 2016; 351:400–403.
5. Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. 2016; 351: 403–407;
6. Gogleva AA, Gelfand MS, Artamonova II. Comparative analysis of CRISPR cassettes from the human gut metagenomic contigs. *BMC Genomics*. 2014; 15:202.
7. Деев Р.В., Мавликеев М.О., Бозо И.Я. и др. Генно-клеточная терапия наследственных заболеваний мышечной системы: современное состояние вопроса. *Гены & Клетки*. 2014; 9(4): 6–33.
8. Яковлев И.А., Деев Р.В., Соловьева В.В. и др. Пред- и посттранскрипционная модификация генетической информации в программе лечения мышечных дистрофий. *Гены & Клетки*. 2016; 11(2): 42-52.
9. Муравлева Э.А. Детекция мутации *de novo* в гене дистрофина и её значение для медико-генетического консультирования при мышечной дистрофии Дюшенна. *Бюллетень медицинских Интернет-конференций*. 2014; (4):399-400.
10. Носко А.С., Куренков А.Л., Никитин С.С., Зыков В.П. Адекватный менеджмент пациентов с дистрофинопатиями: применение объективизирующих шкал и дополнительных методов исследования. *Нервно-мышечные болезни*. 2014; 3: 13-19.

ФГАОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
Кафедра патологии человека лечебного факультета



Персонализированная медицина в оториноларингологии

Выполнила студент 5 курса, группы 89,
Международной школы «Медицина Будущего» (ДОП)
Сивохин Дмитрий Алексеевич

Москва
2019

Актуальность



Потеря слуха является наиболее распространенным сенсорным расстройством, затрагивающим 360 миллионов человек во всем мире.



В России число лиц с пониженным слухом составляет около 13-20 млн (2007 год). Более 1 млн. детей и подростков страдает нарушением слуха (2008 год).

30%

По данным ВОЗ к 2020 году число людей, страдающих нарушением слуха, увеличится на 30%

Актуальность

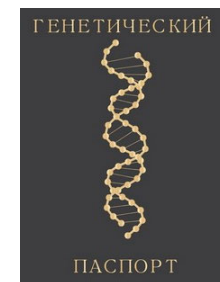
Применение персонализированной медицины в оториноларингологии необходимо для выявления раннего начала заболевания, прогнозирования и оптимального лечения, а также проведения профилактических мер для предупреждения снижения и потери слуха.

Развитие персонализированной медицины напрямую зависит от увеличения наборов различных инструментов для генетического секвенирования генома и экзома, а также от разработки таргетной терапии. Положительное отношение к генетическим тестированиям и создание генетического паспорта позволяет создать персонифицированный подход к каждому пациенту и во много раз повысить точность диагностики и лечения различных заболеваний.

Актуальность



С каждым годом растет набор инструментов для генетического секвенирования генома и экзома



Персонализированная медицина



Положительные отношения к генетическим тестированиям среди населения



Исследования в области таргетного лечения

Тугоухость и глухота

В настоящее время в отоларингологии наиболее остро возникают вопросы о диагностике, профилактике и лечении тугоухости и глухоты.

Наследственная и приобретенная тугоухость встречается в равной степени.

Наследственная тугоухость или глухота

Приобретенная тугоухость или глухота

**50% являются генетическими
или
наследственными по происхождению**

50% являются приобретенными



30% - синдромальная
тугоухость (SHL)



70% - несиндромальная
тугоухость (NSHL)

Сопряжена с другими
аномалиями

Не сопряжена с другими
аномалиями

Наиболее частые причины:

- Преждевременные роды,
- Перинатальную инфекцию,
- Последствия наркотических препаратов,
- Травмы,
- Воздействие шума и т.д.

Технологии в Персонализированной медицине

- В 2004 году после внедрения NGS технологии было открыто 20 генов, отвечающих за возникновение наследственной глухоты, среди них: *TPRN, PAX3, P2RX2, SMPX, HARS2, GJB2, STRC, CDH23, MYH14, MYO15A, MYO7A, SLC26A4* и другие.
- В 2010 году Университет Айовы разработал панель оториногенного захвата патогенных экзонов (OtoSCOPE) для более чем 100 генов, в числе которых, вызывающие синдромы Usher и Pendred.
- Разработанный в 2012 году OtoGenome, анализирует более 70 генов, связанных с наследственной тугоухостью.
- В последующие годы были созданы технологии, используемые для диагностики тугоухости: OtoChip, OtoSeq и тест APEX.
- Текущее количество генов, скринированных на диагностических платформах, варьируется от 23 до 129 генов, в зависимости от поставщика, что составляет от 15 до 55%.

Синдром Ваарденбурга

Пример синдромальной тугоухости:

Клинические признаки:

- Телекант (латеральное смещение внутреннего угла глаза),
- Гетерохромия радужки,
- Седая прядь над лбом,
- Врожденная тугоухость различной степени.

Тип	OMIM	Ген	Локус
Тип I, WS1	193500	PAX3	2q35
Тип IIa, WS2A (originally WS2)	193510	MITF	3p14.1-p12.3
Тип IIb, WS2B	600193	WS2B	1p21-p13.3
Тип IIc, WS2C	606662	WS2C	8p23
Тип IIд, WS2D (редко)	608890	SNAI2	8q11
Тип III, WS3	148820	PAX3	2q35
Тип IVa, WS4A	277580	EDNRB	13q22
Тип IVb, WS4B	613265	EDN3	20q13
Тип IVc, WS4C	613266	SOX10	22q13



Ген малого мышечного белка (SMPX)

Пример несиндромальной потери слуха:

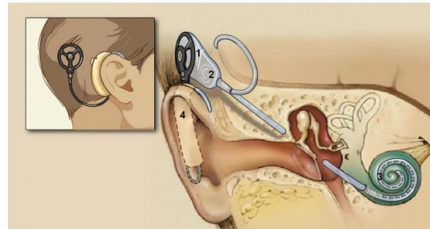
- X-сцепленное наследование. ген GPRASP2.
- Составляет 1-5% всех случаев несиндромальной потери слуха
- В виду мутации белок в среднем ухе не функционирует или не синтезируется вовсе
- Другие мышцы (скелетные/ гладкие) не имели каких-то заметных дефектов у тех, чей ген **SMPX** был нефункционален.
- женщины с мутацией в этом гене тоже были подвержены наследственной глухоте также, как и мужчин.
- **SMPX** важен для развития защитных механизмов ресничных клеток (стереоцилий) в улитке внутреннего уха?

Кохлеарная имплантация (КИ)

Кохлеарная имплантация - самая современная технология реабилитации людей, дающая возможность слышать ребенку, который родился глухим или взрослому человеку, потерявшему слух.

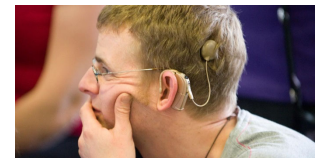
- Программа мероприятий, направленных на полноценную социальную адаптацию ребенка с сенсо-невральной тугоухостью 4 степени и глухотой.
- В мире более 70000 человек, пользуются системой кохлеарной имплантации.
- Система кохлеарной имплантации – устройство, выполняющее функции поврежденных или отсутствующих волосковых клеток, обеспечивая электрическую стимуляцию сохранных нервных волокон.

1. Имплант; 2. Приёмник/Стимулятор;
3. Электродная решётка импланта;
4. Речевой процессор.



Кохлеарная имплантация (КИ)

- Кохлеарный имплант имеет свои особенности.
- Мозг получает информацию в течение нескольких микросекунд после приема звука микрофоном.
- Каждый речевой процессор программируется индивидуально в соответствии с состоянием слуха.
- Необходимо обучение человека слушать и говорить.



Персонализированная медицина и Кохлеарная имплантация

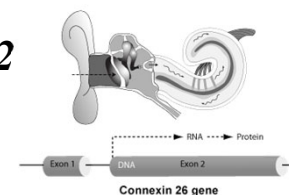
Кохлеарная имплантация уже сама по себе имеет персонализированную составляющую в виде персонифицированного подхода к пациенту, однако участвует лишь в финальном лечении патологии человека.

Персонализированная медицина способна на ранней стадии выявлять детей с наследственной глухотой и предоставляет возможность для ранней постановки КИ, что приведет к меньшей травматизации и быстрой адаптации пациента.

- Выявление детей, требующих проведение кохлеарной имплантации, проводится методом наблюдения за развитием речи. Поэтому постановка диагноза «глухота» оттягивается и может быть упущено время для развития речи ребенка.
- Современные подходы персонализированной медицины могут помочь диагностировать детей с наследственной глухотой и предоставить возможность для ранней постановки КИ.



Мутация гена GJB2



Одним из главных примеров для реализации данного персонифицированного подхода являются мутации гена GJB2.

Сайты экспрессии соответствующего гена относятся к эпителиальным частям внутреннего уха. При данной врожденной тугоухости возможна ранняя КИ.

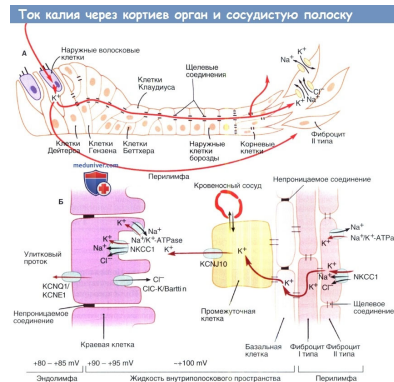
- Ген *GJB2* кодирует трансмембранный белок коннексин 26 (Cx26), участвующий в образовании межклеточных контактов в тканях внутреннего уха.
- Патология коннексинов нарушает рециркуляцию ионов K^+ в органе Корти — главное условие механо-электрической трансдукции.
- наследуется по аутосомно-рецессивному типу.
- Известно более 220 мутаций гена GJB2.
- Ген исследуется для выявления наследственных несиндромальных форм тугоухости разной степени тяжести.
- Наибольшая частота встречаемости у пациентов с врожденной тугоухостью.

Ассоциация маркера с заболеваниями:

1. Несиндромальная нейросенсорная тугоухость
2. Синдром Фовинкеля (наследственная мутилирующая кератома)
3. Кератодермия ладоней и стоп, сочетающаяся с глухотой
4. Синдром KID (кератит, ихтиоз, глухота)
5. Синдром Барта – Памфри (кератодермия, лейкокония, глухота)

Мутация Гена *KCNQ4*

- Ген *KCNQ4* кодирует одноименный белок, который играет незаменимую роль в базолатеральной секреции K^+ , что важно для регуляции нейрональной возбудимости в сенсорных клетках улитки.
- Отсутствие данного гена может привести к глухоте.
- Возможна кохлеарная имплантация.



Мутация гена *OTOF*



Ген *OTOF* кодирует белок Отоферлин, который контролирует высвобождение глутамата из внутренних волосковых клеток и таким образом контролирует передачу сигнала в слуховой нерв.

Однако различают 2 вида повреждения:

- Пресинаптическое повреждение – нарушение функции афферентного нервного волокна. Возможна КИ!
- Постсинаптическое повреждение – нарушение проксимальной части слухового нерва. КИ не эффективна.

Синдром Usher

Первыми признаками потери зрения при синдроме Ушера является слепота в ночное время, за которой следует повышенное туннельное зрение и постепенно полная слепота.

Затем следует снижение слуха. КИ дает возможность сохранить слух данному пациенту. Однако, к сожалению, восстановить зрение на данный момент невозможно.

- Вызывается мутацией одного из 10 генов (CDH23, MYO7A, PCDH15, USH1C, USH1G и др.)
- Приводит к врождённой нейросенсорной тугоухости и прогрессирующей потере зрения (пигментная дегенерация).
- Наследуется по аутосомно-рецессивному принципу.
- Одна из основных причин слепоглухоты.
- Синдром Usher ответственен за 3-6% всех случаев глухоты среди несовершеннолетних и 50% всей слепоты, связанной с глухотой у взрослых.
- В настоящее время неизлечимо.



Таргетный подход в лечении наследственной тугоухости

Кохлеарная имплантация – не единственный метод лечения тугоухости. В настоящее время разрабатывается таргетное лечение данной патологии.

Кохлеовестибулярный аппарат:

- Хирургически доступен и анатомически изолирован.
- Две точки доступа для инъекции вектора: круглое окно и непосредственно через кость лабиринта, причем первое менее инвазивно, но лабиринтотомия более эффективна при переносе гена.
- Использование кохлеарных имплантатов также было расширено, чтобы служить в качестве потенциального носителя для доставки внутрикохлеарных лекарств, генов и стволовых клеток.

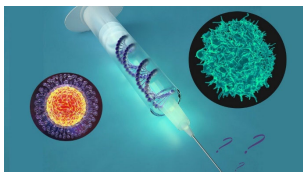


Векторы

Невирусные векторы

Липосомы:

1. Легко подготавливаются и могут содержать ДНК любого размера.
2. Имеют очень низкий риск введения мутагенеза



Вирусные векторы

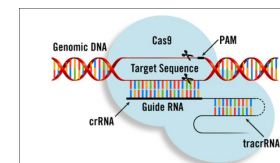
- Большинство исследований генной терапии внутреннего уха, проводят с вирусными векторами, в частности адено-ассоциированные вирусными векторы (AAV).
- Последние испытания Anc80L65 доказали безопасность и эффективность переноса гена во внутреннее ухо млекопитающего через инъекцию круглого окна, таргетно воздействуя на внешние волосковые клетки, что привело к восстановлению слуха и вестибулярной функции.

Однако данная терапия на данный момент эффективна лишь на постнатальных стадиях!

CRISPR / Cas9 в лечении тугоухости

- Технология CRISPR / Cas9 может быть направлена на любую геномную последовательность, с заранее запрограммированной последовательностью направляющей РНК (gRNA).
- Комплекс, образованный между белком Cas9 и геномной ДНК нуклеиновой кислоты, был непосредственно доведен до внутреннего уха *in vivo*.
- Редактирование генома происходит быстро, так как Cas9 и гРНК быстро разрушаются, однако редактирование является постоянным.
- Было показано, что эти комплексы индуцируют эффективное редактирование генома с минимальной токсичностью.

Дальнейшая разработка необходима для адаптации этой новой стратегии лечения.



Фармакогенетика и фармакогеномика лекарственных препаратов

Аминогликозиды являются высокоэффективными в отношении широкого спектра бактерий, особенно аэробных, грамотрицательных бактерий, таких как энтеробактерии и псевдомонады. Данный антибиотик часто используется для лечения опасных для жизни инфекций.

Из-за их низких затрат он относится к наиболее часто используемым препаратам во всем мире. Цисплатин - является одним из наиболее эффективных противоопухолевых препаратов.

Как и аминогликозиды, его использование часто не имеет альтернативы.

Один из побочных эффектов - необратимая потеря слуха

Аминогликозидные антибиотики



Цисплатин



Данные препараты могут вызвать:

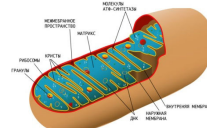
Коклеотоксичность - является следствием повреждения слуховой системы и проявляется как шум в ушах и / или снижение слуха по нейросенсорному типу.

Вестибулотоксичность - возникновение головокружения из-за повреждения вестибулярной системы.



Симптомы токсичности могут возникать во время, но также после окончания терапии и могут быть обратимыми или постоянными.

Механизм ототоксичности аминогликозидов



Образования активных форм кислорода (РОС) в митохондриях волосковых клеток с последующим развитием окислительного метаболизма

повреждение волосковых клеток улитки

Снижение слуха / глухота

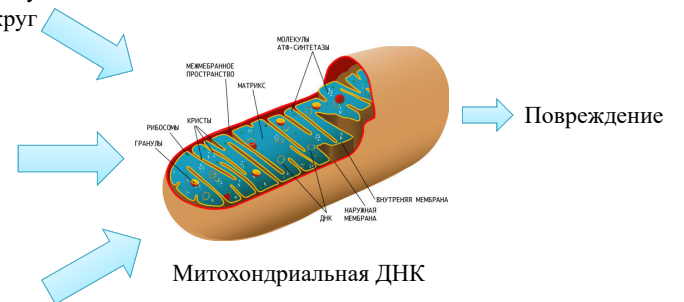
Аминогликозиды связываются с аминосацил-тРНК-связывающей стороной 16S рРНК в 30S-субъединице бактериальных рибосом, что приводит к ошибкам при трансляции мРНК. Происходит компрометация синтеза белка, что приводит к накоплению усеченных и неисправных белков, которые в конечном итоге убивают чувствительные бактерии. Считается, что волосковые клетки улитки, богатые митохондриями, повреждаются также, как и бактерии.

Механизм ототоксичности Цисплатина

мтДНК уязвима к повреждению ДНК, потому что она не намотана вокруг гистонов

Образования активных форм кислорода

Аддукты платины долго сохраняются в мтДНК

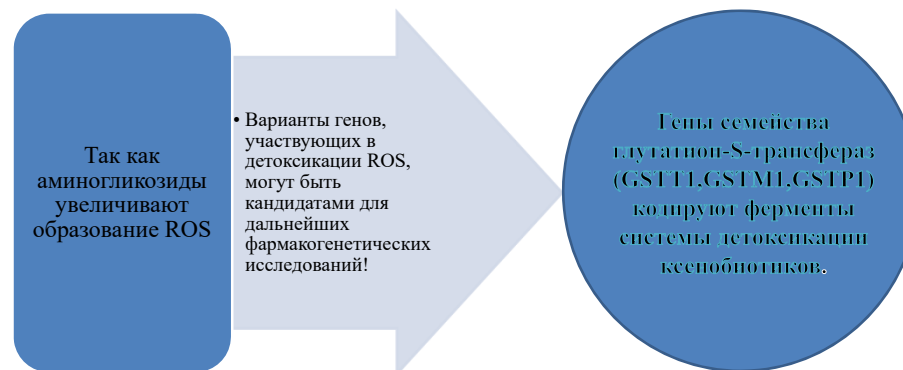


Генетические маркеры для прогнозирования риска возникновения индуцированной аминогликозидом ототоксичности:

Семейная аминогликозид-индуцированная глухота

- Мутация в митохондриальной 12S рРНК (замена аденина на гуанин в положении 1555) [MtDNA A1555G].
- Мутация C1494T в гене 12S рРНК (дополнительная пара оснований между тимином в положении 1494 и аденином в положении 1555 12S рРНК), оказывает такое же влияние на потерю слуха, вызванную аминогликозидом, как мутация A1555GmtDNA.
- Если провести тест на данные мутации, то можно спасти человеку слух.
- Все варианты митохондрий, которые были связаны с индуцированной аминогликозидом ототоксичностью, также были связаны с повышенным риском возрастной потери слуха.

Как защититься от аминогликозид и цисплатин - индуцированной глухоты?





Выводы



- Следует ожидать, что в будущем все известные гены, связанные с врожденной потерей слуха и тугоухостью, будут исследованы, чтобы иметь возможность идентифицировать на ранней стадии, особенно в детском возрасте.
- Возможность проведения кохлеарной имплантации и других инновационных методов лечения позволит сохранить слух и речь пациенту, что сохранит его коммуникационную способность и значительно улучшит качество жизни пациента.
- Выявление дополнительных фармакогенетических маркеров, которые наряду с негенетическими, будут способны также идентифицировать пациентов с повышенным риском, и для которых могут быть рассмотрены защитные стратегии, для предотвращения осложнения, в виде потери слуха, вызванного цисплатином или аминогликозидом.

Список литературы

1. Chaker AM, Klimek L. Individualisierte, personalisierte, stratifizierte Medizin: eine Herausforderung für die Allergologie in der HNO? Hno. 2015; 63(5), 334–342.
2. Deng Y, Niu Z, Fan L et al. A novel mutation in the SMPX gene associated with X-linked nonsyndromic sensorineural hearing loss in a Chinese family. Journal of Human Genetics. 2018; 11–14.
3. Eppsteiner RW, Shearer AE, Hildebrand MS et al. Using the Phenome and Genome to Improve Genetic diagnosis for Deafness. Otolaryngol Head Neck Surg. 2012;147(5):975-7.
4. Friese N, Braun K, Müller M, Tropitzsch A. Personalized medicine in otology. The role of genetic diagnostics in patients with hearing impairment. HNO. 2015;63(6):428-33.
5. de Heer AM, Schraders M, Oostrik J et al. Audioprofile-Directed Successful Mutation Analysis in a DFNA2 / KCNQ4 (p . Leu274His) Family. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2011;120(4):243-8.
6. Lanvers-Kaminsky C, Ciarimboli G. Pharmacogenetics of drug-induced ototoxicity caused by aminoglycosides and cisplatin. Pharmacogenomics. 2017; 18(18), 1683–1695.
7. Lin X, Tang W, Ahmad S et al. Applications of targeted gene capture and next-generation sequencing technologies in studies of human deafness and other genetic disabilities. Hearing Research. 2012; 288(1–2), 67–76.
8. Ruben RJ. Otitis Media. Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 2011; 145(5), 707–712.
9. Rudman JR, Mei C, Bressler SE et al. Precision medicine in hearing loss. Journal of Genetics and Genomics. J Genet Genomics. 2018; 45(2):99-109.
10. Schimmenti LA. Keep Swimming Toward Precision Medicine Discoveries. Zebrafish. 2016;13(6):545-547.
11. Taylor KR, Deluca AP, Shearer AE et al. AudioGene: Predicting Hearing Loss Genotypes from Phenotypes to Guide Genetic Screening. Hum Mutat. 2013;34(4):539-45.
12. Zenner HP, Pfister M, Friese N et al. Molekulare personalisierte Medizin. HNO. 2014;62(7):520-4.

ФГАОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
Кафедра патологии человека лечебного факультета



Молекулярно-генетические исследования при подозрении Синдрома Линча

Выполнил студент II курса, группы 500-03,
Международной школы «Медицина будущего» (ДОП)
Филиппов Константин Георгиевич

Москва
2019

Актуальность

- ✓ Рак толстой кишки - одно из самых распространенных онкологических заболеваний.
- ✓ Синдром Линча (наследственный неполипозный рак толстой кишки) составляет 3-5% случаев колоректального рака.
- ✓ Суммарный риск развития колоректального рака у носителей мутации - 30-80%, рака эндометрия матки - 30-60%, других ассоциированных опухолей - <10-15%.
- ✓ Встречаемость в популяции составляет 1:500 - 1:1000

История

Наследственный колоректальный рак связан с именем американского ученого Генри Линча.

В 1966 г он описал 2 семьи на западе Соединенных Штатов, где в нескольких поколениях встречались больные раком толстой кишки, в сочетании со злокачественными опухолями желудка и эндометрия.

Данное наблюдение было названо «**семейным раковым синдромом**».

В 2004 году на международной конференции в городе Bethesda данное заболевание было окончательно переименовано в «**синдром Линча**».



<https://medschool.creighton.edu/faculty-directory-profile/100214/henry-lynch>

Генетика синдрома Линча

Причина возникновения — наследственная мутация в одном из генов системы репарации неправильно спаренных нуклеотидов (mismatch repair -MMR)

В настоящее время описаны мутации в 5 генах системы репарации.

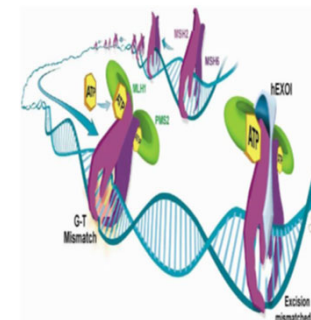
В 35 % опухолей выявляется мутация гена KRAS, но никогда — гена BRAF.

В 80-90 % случаев поражаются гены MMR: **MLH1** и **MSH2**

реже MSH6 и очень редко — PMS2.

крайне редко — PMS1, вообще не описаны — MSH3 и MLH3.

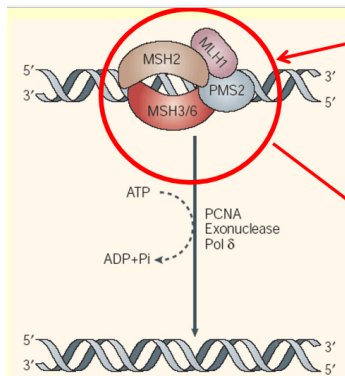
В 35 % случаев выявляется мутация гена **KRAS**, но **никогда** — гена **BRAF**



Gruber S. B. Gastroenterology, 2006

Система mismatch-репарации

Система репарации (mismatch-repair) представляет собой комплекс, устраняющий ошибки между некомплементарными основаниями, удаляющий петли инсерции и делеции, возникающие при репликации молекулы ДНК. При этом поддерживается целостность генома и супрессия опухоли.



Наследственная или соматическая инактивация генов системы MMR приводит к возникновению в опухоли **микросателлитной нестабильности (МСН)**.

<http://docplayer.ru/-Molekulyarno-geneticheskie-aspekty-nasledstvennoy-i-sporadicheskoy-form-raka-tolstoy-kishki.html>

Микросателлитная нестабильность

Микросателлиты, или короткие tandemные повторы, — варьирующие участки (локусы) в ДНК, состоящие из tandemно повторяющихся мономеров длиной меньше 9 пар оснований и образующие поля менее 1 тысячи пар оснований.

Они локализованы в эухроматиновой части генома.

Микросателлиты характеризуются высокой скоростью изменения последовательностей при репликации молекулы ДНК.

Под микросателлитной нестабильностью подразумевают потерю или появление короткой последовательности нуклеотидов в аллелях микросателлита.

Наличие нестабильности говорит о том, что система белков MMR неспособна устранять несоответствия и ошибки репликации ДНК.

Феномен микросателлитной нестабильности является уникальным, поскольку ошибки репликации изменяются по длине, а не по последовательности нуклеотидов.

Микросателлитная нестабильность

Микросателлиты, или короткие tandemные повторы, — варьирующие участки (локусы) в ДНК, состоящие из tandemно повторяющихся мономеров длиной меньше 9 пар оснований и образующие поля менее 1 тысячи пар оснований. Они локализованы в эухроматиновой части генома.

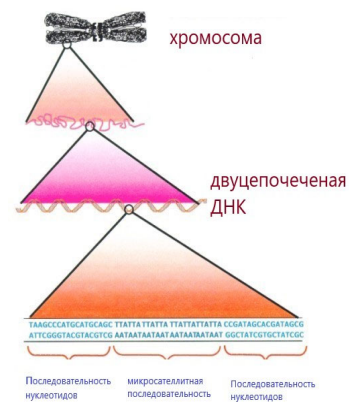
Микросателлиты характеризуются высокой скоростью изменения последовательностей при репликации молекулы ДНК.

Под микросателлитной нестабильностью подразумевают потерю или появление короткой последовательности нуклеотидов в аллелях микросателлита.

Наличие нестабильности говорит о том, что система белков MMR неспособна устранять несоответствия и ошибки репликации ДНК.

Феномен микросателлитной нестабильности является уникальным, поскольку ошибки репликации изменяются по длине, а не по последовательности нуклеотидов.

Микросателлитная нестабильность



Норма -----
TGAGCTCTCTCTCTCTCTCTC
TCTCTCTCTAGCT --- (13 CT)

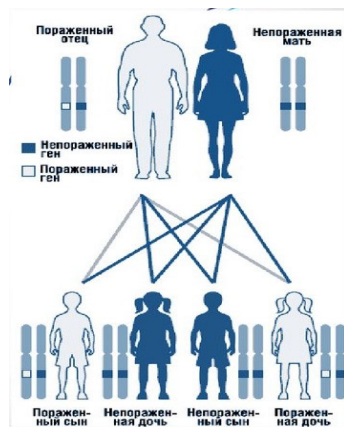
Опухоль ---
TGAGCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTCTCTCTCTAGCT ---
(11 CT)

Наличие микросателлитной нестабильности говорит о том, что система белков MMR неспособна устранять несоответствия и ошибки репликации ДНК, которые происходят в S-фазе клеточного цикла.

NASA/David Herring
earthobservatory.nasa.gov

Наследование мутаций

Эпимутации в системе MMR показывают классический аутосомно-доминантный тип наследования с 50 % риском передачи последующему поколению (независимо от пола).



Имянитов, Е.М. Клинико-молекулярные аспекты колоректального рака: этиопатогенез, профилактика, индивидуализация лечения / Практическая онкология, - 2005, - Т.6, №2. - С.65-70

Критерии для отбора пациентов с подозрением на синдром Линча

Амстердамские критерии (1991 г., 1999 г.)

должны быть выявлены все критерии

- ✓ Молодой возраст возникновения заболевания (до 50 лет)
- ✓ Три и более пораженных родственников
- ✓ Заболевание в нескольких поколениях
- ✓ Семейный аденоматоз толстой кишки должен быть исключен
- ✓ Наличие новообразований внекишечной локализации (рак эндометрия, желудка, яичников, уретры, почечной лоханки)

Рекомендации Бетезда (1996 г., 2004 г.)

достаточно выявление одного из критериев

- ✓ Возраст возникновения заболевания до 50 лет
- ✓ Первично-множественные Линч-ассоциированные опухоли
- ✓ Колоректальная опухоль с микросателлитной нестабильностью у пациента моложе 60 лет
- ✓ КРР пациента и Линч-ассоциированная опухоль, у его родственника до 50 лет
- ✓ КРР у пациента и его родственника из 2 и более поколений, независимо от возраста

Эффективность критериев

У пациентов соответствующих Амстердамским критериям частота обнаружения наследственных мутаций около 50%.

У пациентов соответствующих критериям Bethesda эта частота колеблется от 10 до 20%.



Выявление микросателлитной нестабильности в опухоли

Первый этап молекулярно-генетической диагностики: исследование образца опухолевой ткани, полученной в ходе биопсии или операции, на микросателлитную нестабильность (МСН).

Обнаруживается МСН более чем в 90% случаев синдрома Линча.

Выделенная ДНК опухолевой клетки амплифицируется, далее для определения микросателлитной нестабильности в опухоли пациентов с подозрением на синдром Линча применяют различные панели, которые включают от одного до десяти микросателлитных маркеров.

В настоящее время наиболее часто используют данные маркеры: 5 мононуклеотидных маркеров (BAT25, BAT26, NR-21, NR-22 и NR-24).

Если нестабильными являются более 30% маркеров, принято говорить о микросателлитной нестабильности высокого уровня, если нестабильны менее 30% - низкого уровня, если все маркеры не изменены – говорят, что опухоль микросателлитно-стабильна.

Выявление микросателлитной нестабильности в опухоли



Биопсия,
образец ткани



Выделение ДНК
из опухоли

ПЦР маркеры: NR21, NR24,
NR27, BAT25 и BAT26



Амплификация
(Амплификатор Veriti
Производитель: Life
Technologies)

Фрагментный анализ
маркеров



Генетический
анализатор ABI
PRISM 3500
Производитель: Life
Technologies

<http://www.gnck.ru/pdf/linch>

Выявление микросателлитной нестабильности в опухоли

Последовательность
стабильная



Микросателлитная
нестабильность



Результаты:

MSI-H – нестабильно более 1 маркера
MSI-L – нестабилен 1 маркер
MSS – все маркеры стабильны

Чувствительность (мутация в *MLH1/MSH2*) –
80%-91%
Специфичность – 90% (BAT26) – 100%

У пациентов с синдромом Линча, который обусловлен мутациями в генах *MLH1* и *MSH2*, опухоли, как правило, имеют высокий **уровень микросателлитной нестабильности**, а опухоли пациентов, имеющих мутации в гене *MSH6*, могут иметь низкий уровень МСН.

Чувствительность (мутация в *MLH1/MSH2*) – 80%-91%

Специфичность – 90% (BAT26) – 100%

<http://www.gnck.ru/pdf/linch>

Исследование гена *BRAF*

В опухолях пациентов с синдромом Линча практически **не встречается** соматической мутации в гене *BRAF*. Этот аспект используется для дифференциальной диагностики спорадических и наследственных опухолей с микросателлитной нестабильностью.

<http://www.gnck.ru/pdf/linch>

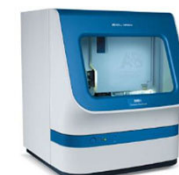
Исследование гена *BRAF*



ДНК из
опухоли

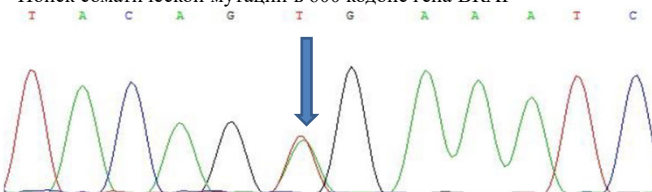


ПЦР: 15 экзон гена
BRAF



Секвенирование
полученного
фрагмента

Поиск соматической мутации в 600 кодоне гена *BRAF*



<http://www.gnck.ru/pdf/linch>

Иммуногистохимический метод

Следующий этап выявления синдрома Линча.

Метод основан на определении экспрессии белков системы MMR в опухоли и нормальной ткани, и в случае отсутствия какого-либо белка в опухолевой ткани (и наличия его в нормальной) позволяет установить ген, в котором произошли молекулярные изменения.

В большинстве случаев для иммуногистохимического анализа используются панели, включающие антитела к 4 белкам системы MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2).

Отсутствие белков MLH1 и PMS2 предполагает молекулярные изменения в гене *MLH1*, отсутствие белков MSH2 и MSH6 – в гене *MSH2*, отсутствие одного белка MSH6 – в гене *MSH6*, отсутствие одного белка PMS2 – в гене *PMS2*.

Чувствительность иммуногистохимического метода составляет 83%, а его специфичность – 89%.

Иммуногистохимический метод

Определение экспрессии белков системы MMR в опухоли и нормальной ткани



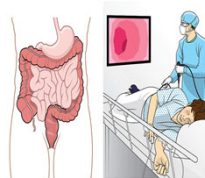
Для иммуногистохимического анализа используются панели, включающие **антитела** к 4 белкам системы MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2)

<https://docslide.net/education/lynch-syndrome.html>

В случае обнаружения у пациента синдрома Линча, необходимо:

1. Провести молекулярно-генетическое исследование у всех его кровных родственников
2. У всех носителей мутации необходимо выполнение эндоскопического обследования толстой кишки с периодичностью 1 раз в 1-2 года начиная с возраста 20-25 лет (профилактическое обследование толстой кишки позволило снизить на 65-72% смертность пациентов с синдромом Линча от РТК по сравнению с носителями мутации, которые отказались от регулярного проведения колоноскопии)
3. В качестве скрининговых мероприятий, направленных на поиск раннего рака эндометрия у носительниц мутаций в генах MMR, им предлагается проведение ультразвукового обследования, осмотр гинеколога и исследование маркера СА-125 ежегодно начиная с 30-35 лет

<http://onkoklinik.ru/napravleniya-deyatelnosti/kolonoskopiya>



Список литературы

1. Цуканов А.С., Шубин В.П., Поспехова Н.И. и др. Вопросы онкологии. 2017; 1: 110-114.
2. Цуканов А.С., Поспехова Н.И., Шубин В.П. и др. Дифференциальный диагноз синдрома Линча от других форм неполипозного колоректального рака среди российских пациентов. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2014; 2: 78-84.
3. Bui QM, Lin D, Ho W. Approach to Lynch Syndrome for the Gastroenterologist. Dig Dis Sci. 2017;62(2):299-304.
4. Vindigni SM, Kaz AM. Universal Screening of Colorectal Cancers for Lynch Syndrome: Challenges and Opportunities. Dig Dis Sci. 2016;61(4):969-76.
5. Tiwari AK, Roy HK, Lynch HT. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. QJM. 2016;109(3):151-8.
6. Pellat A, Netter J, Perkins G et al. Lynch syndrome: What is new? Bull Cancer. 2018 Dec 4. pii: S0007-4551(18)30359-X. doi: 10.1016/j.bulcan.2018.10.009. [Epub ahead of print]
7. Seth S, Ager A, Arends MJ, Frayling IM. Lynch syndrome - cancer pathways, heterogeneity and immune escape. J Pathol. 2018;246(2):129-133.

ФГАОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им.
И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
Кафедра патологии человека лечебного факультета



Молекулярные маркёры, основанные на ПЦР

Выполнила студентка V курса, группы 01-94,
Международной школы «Медицина будущего»,
Титова Надежда Александровна.

Москва
2019

Актуальность

Роль молекулярных маркеров в современной генетике трудно переоценить. Они обеспечивают доступ к огромному количеству информации, содержащейся в генетическом материале.

С их помощью составлены подробные молекулярные карты генома человека и десятков видов растений и животных, на которые нанесены важнейшие гены, определяющие рост и развитие организмов, морфологические признаки, устойчивость к заболеваниям и другие свойства.

Молекулярные маркеры широко используются в популяционной генетике, сравнительной генетике и геномике, в филогенетических исследованиях.

Благодаря молекулярным маркерам расширяются возможности медицинской диагностики, появляются новые более точные методы паспортизации пород животных и сортов растений.

Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 17. – №. 4/2. – С. 1044-1054.

Актуальность



Дэвид Ботштейн,
Стэнфордский университет, США.

В 1980 г. вместе с Р. Уайтом, М. Школьников и Р. Дэвисом показал возможность использования ДНК-маркеров для построения генетических карт и сконструировал первую RFLP-карту генома человека.

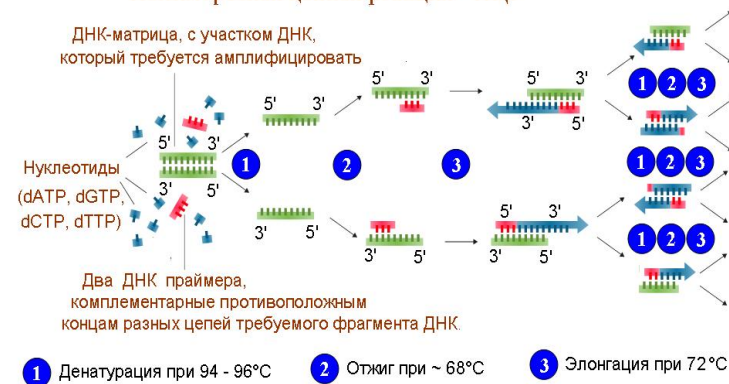
Их исследование стало одной из отправных точек для подготовки реализации процесса секвенирования генома человека

Кратко о ПЦР

Простой и широко используемый метод, при котором небольшое количество ДНК может быть амплифицировано в большое количество копий.

В дополнение к скорости, с которой работает этот анализ, он способен количественно продемонстрировать, какая часть конкретной последовательности присутствует.

Полимеразная цепная реакция - ПЦР



Используется в различных областях медицины (онкология, урология, гематология, гастроэнтерология, пульмонология; фтизиатрия и т.д.)

Виды маркёров

Маркёры



Классический генетический маркер соответствует гену, аллели которого имеют четко выраженные отличия на уровне фенотипа.

Белковый маркер соответствует гену, аллели которого имеют отличия (разную молекулярную массу) на уровне белкового продукта.

Молекулярный маркер соответствует гену или некодирующему участку генома, разные варианты (аллели) которого отличаются на уровне ДНК

Отличия на уровне ДНК могут быть выявлены:

- с помощью гибридизации с известными нуклеотидными последовательностями;
- при секвенировании нуклеотидной последовательности;
- при сравнении длины фрагментов, полученных с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР);

Молекулярные маркёры: определение

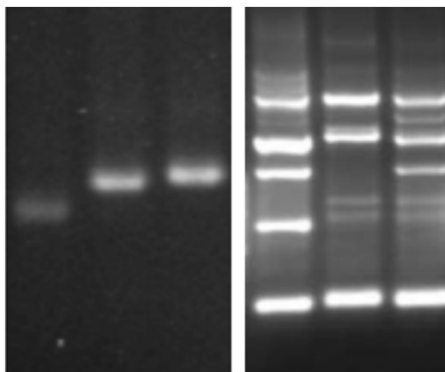
Молекулярные маркеры— это генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК. ДНК-маркеры являются третьим поколением генетических маркеров. Им предшествовали **белковые маркеры**, а еще ранее – **классические генетические маркеры**.



Молекулярные маркёры: классификация

Молекулярные маркеры подразделяют на **монолокусные** и **мультилокусные**. Монолокусные маркеры наследуются чаще всего по кодоминантному типу, мультилокусные – по доминантному.

Монолокусные



Мультилокусные

Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 17. – №. 4/2. – С. 1044-1054.

Группы молекулярных маркёров

Молекулярные маркёры разделяют на три группы, согласно основному методу анализа:

- Блот-гибридизации;
- ПЦР;
- ДНК-чипов.

	монолокусные	мультилокусные
блот-гибридизация	RFLP ₁₉₈₀	минисателлиты ₁₉₈₅
полимеразная цепная реакция (ПЦР)	SSR ₁₉₈₉	RAPD ₁₉₉₀
	STS ₁₉₈₉	ISSR ₁₉₉₄
	SSCP ₁₉₈₉	AFLP ₁₉₉₅
	CAPS ₁₉₉₃	SSAP ₁₉₉₇
	SCAR ₁₉₉₃	IRAP ₂₀₀₆
ДНК-чипы	SNP ₁₉₉₈	DArT ₂₀₀₁

Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 17. – №. 4/2. – С. 1044-1054.

Основные направления использования монолокусных маркеров

Составление молекулярных карт хромосом и геномов	Картирование генов	Маркирование генов, хромосом и геномов	Сравнительная генетика и геномика
Отбор с помощью ДНК маркеров в селекции	Геномная селекция	Молекулярная паспортизация сортов/ пород	Диагностика заболеваний
Экологический мониторинг	Исследование генетического разнообразия	Филогенетические исследования	Популяционная генетика

Основные направления использования мультилокусных маркеров

Составление молекулярных карт хромосом и геномов

Картирование генов

Геномная селекция

Молекулярная паспортизация сортов/ пород

Экологический мониторинг

Исследование генетического разнообразия

Филогенетические исследования

Популяционная генетика

Основные классы молекулярных маркеров ПЦР

ПЦР-МАРКЁРЫ: особый класс ДНК-маркеров основан на использовании праймеров, имеющих множественную локализацию в геноме. Амплифицированные фрагменты разделяются электрофоретически и полосы (пики) выявляются окрашиванием или радиоавтографией. Предпочтение методов генотипирования с использованием ПЦР обусловлено, прежде всего, потребностью в реакции небольших количеств ДНК (5-100 нг образца на реакцию).

Моноклусные

1. **SSCP** (полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК);
2. **SSR** (простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты));
3. **STS** (сайт/локус, маркированный нуклеотидной последовательностью).

Мультилокусные

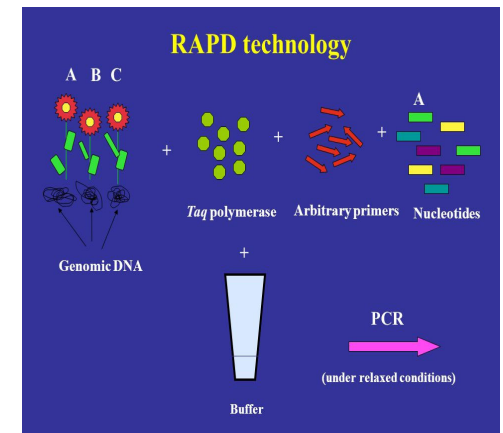
1. **AFLP** (полиморфизм длины амплифицированных фрагментов);
2. **ISSR** (межмикросателлитные последовательности);
3. **RAPD** (случайно амплифицированная полиморфная ДНК);
4. **SSAP** (полиморфизм сиквенс-специфичной амплификации).

RAPD-маркеры

К этой группе относятся маркеры, основанные на ПЦР с применением праймеров с произвольной, случайной последовательностью.

Технология получения RAPD - маркёров

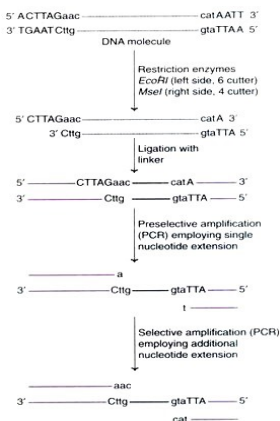
- ✓ Высокая чувствительность к изменениям условий реакций;
- ✓ Достаточно низкая температура отжига (37C);
- ✓ RAPD маркеры ведут себя как доминантные и их гетерозиготное состояние на отличается от гомозиготного, поэтому снижается точность оценки при популяционном анализе и при идентификации генетических ресурсов в сравнении с кодоминантными маркерами;
- ✓ Низкая воспроизводимость результатов ПЦР;
- ✓ Для повышения достоверности необходима большая выборка.



AFLP-маркеры

Метод анализа AFLP для исследования variability генома в целом. Этот метод также не требует ни предварительного клонирования, ни секвенирования ДНК. Особенности этого подхода - использование в качестве матрицы рестрицированных фрагментов ДНК, лигированных со специфическими олигонуклеотидными адаптерами, и проведении избирательной амплификации со специально сконструированными праймерами.

Технология получения AFLP - маркёров



✓ Метод позволяет определять генетические изменения, вызванные точечными мутациями в сайтах рестрикции или в участках отжига праймеров (присутствие или отсутствие продукта амплификации в спектре) и небольшими вставками и (или) делециями внутри рестриционного фрагмента (изменение размера полосы в спектре);

✓ Молекулярно генетические маркеры легко картируются на хромосомах.

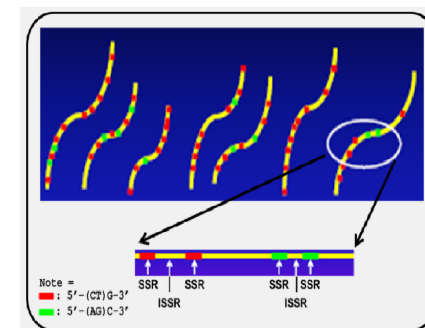
ISSR-маркеры

Для создания ISSR-маркеров используют праймеры, комплементарные микросателлитным повторам.

Такие праймеры позволяют амплифицировать фрагменты ДНК, которые находятся между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными последовательностями (как правило, это уникальная ДНК).

В результате амплифицируется большое число фрагментов, представленных на электрофореграмме дискретными полосами (ISSR-фингерпринтинг).

- ✓ Доминантный тип наследования;
- ✓ Относительно высокая точность и улучшенная воспроизводимость по сравнению с RAPD в связи с большей длиной праймера и более высокой температурой отжига;
- ✓ Однако локализация в геноме продуктов амплификации, так же как и функция, остаются неизвестными.



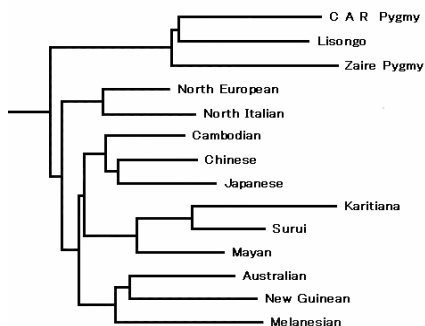
Микросателлиты

Микросателлиты - первые, полученные с использованием ПЦР, высокополиморфные маркеры для индивидуальных локусов.

Микросателлиты относятся к диспергированным tandemно повторяющимся последовательностям, единицы повторов (ди-, три- и тетра-нуклеотиды) и общий размер повторяющейся области которых, как правило, не более 100 п.н.

Эти маркеры известны под несколькими названиями: микросателлиты, STMS, STR, SSR.

Филогенетическое дерево, построенное по результатам обследования различных популяций человека с применением микросателлитных локусов.

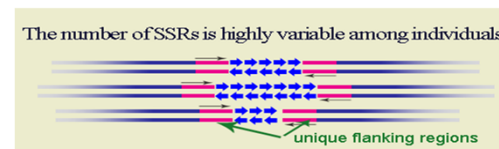


Микросателлиты

Высокий уровень полиморфизма микросателлитов и широкая представленность сделали их чрезвычайно популярными.

Применение их при картировании генома человека позволило совместить физические и генетические карты хромосом.

Гипервариабельные микросателлиты представляют собой универсальную систему генетических маркеров для анализа наследуемых изменений на уровне ядерной ДНК и широко используются в исследованиях генетического полиморфизма популяций человека, растений и животных.



Микросателлитные (SSR) маркеры

Микросателлиты имеют недостатки: неравномерность скорости мутирования разных микросателлитов создает определенные сложности для популяционно-генетического анализа. Имеются и технические проблемы, такие как артефакты при проведении ПЦР (за счет эффекта "проскальзывания"), сложности в разработке технологий для автоматического скрининга микросателлитных аллелей.

Кроме того, несмотря на высокую плотность микросателлитных локусов в геноме, их бывает недостаточно для тонкого картирования отдельных областей геномов, создания маркеров для локусов количественных признаков и решения многих других задач.

Микросателлиты в медицине

Увеличение числа повторяющихся элементов микросателлитов, локализованных в экзонах, в нетранслируемых или регуляторных участках генов, может быть причиной развития некоторых заболеваний у человека.

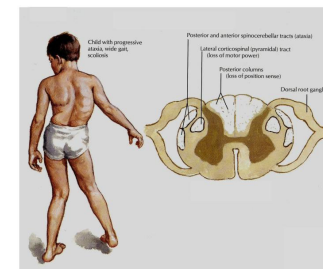
К числу таких заболеваний относятся: болезнь Хантингтона, спинально-бульбарная амиотрофия Кеннеди, спиноцеребеллярная атаксия, синдром ломкой X-хромосомы, атаксия Фридрейха, миотоническая дистрофия 1-го и 2-го типов.

Микросателлиты в медицине

Болезнь Хантингтона



Атаксия Фридрейха



ДНК - маркёры в медицине

Тестирование молекулярно-генетических онкомаркеров предполагает определение дефектов структуры ДНК протоонкогенов и антионкогенов и их функциональной активности с использованием возможностей лабораторных технологий, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализ).

ДНК-диагностика позволяет говорить о биологической роли тех или иных онкогенов и антионкогенов в предрасположенности к возникновению трансформированных клеток, формированию раковой клетки, ее прогрессии, реакции на терапию и, соответственно, прогноза терапевтического воздействия.

ДНК - маркёры в медицине

ДНК – онкомаркеры для оценки метастатической активности опухолей

Тип опухоли	ДНК -онкомаркер	Источник биоматериала
Меланома	Ген В-1-4-N- ацетилгалактозамилтрансферазы	Кровь, лимфоузлы, костный мозг
Нейробластома	Ген тирозингидроксилазы	Кровь, костный мозг
Рак молочной железы	1. Ген цитокератина 19 2. Ген эпидермального фактора роста (экспрессирован в 50% случаев РМЖ) 3. Ген раковоэмбрионального антигена (экспрессирован в 60% случаев РМЖ) 4. Ген маммаглобина (тканеспецифичен)	1. Кровь, костный мозг 2. Кровь, лимфоузлы, костный мозг 3. Лимфоузлы, костный мозг 4. Лимфоузлы, костный мозг
Опухоли желудка, кишечника	Ген цитокератина 20	Кровь, лимфоузлы, костный мозг
Рак простаты	Ген простат-специфического антигена	Кровь, лимфоузлы, костный мозг
Саркома Юинга	Выявляются химерные гены: FLI/EWS - t(11;22)(q24;q12) ERG/EWS% - t(21;22)(q24;q12)	Кровь, лимфоузлы, костный мозг
Рабдомиосаркома	PAX3/FKHR – t(2;13)(q35;q14) PAX7/FKHR – t(1;13)(q36;q14)	Кровь, лимфоузлы, костный мозг
Липосаркома	FUS/CHOP – t(12;16)(q13;q11)	Кровь

ДНК - маркёры в медицине

Комбинация из ДНК-маркеров представляет генетический профиль человека.

Чем больше разных маркеров рассматриваются при анализе, тем точнее полученный генетический профиль, но вместе с этим вырастает и стоимость исследования.

В большинстве лабораторий используют минимум 16 коротких отрезков цепочки для создания генетического профиля при каждом определении отцовства, а также при тестировании семейного родства, установлении личности и др.

При определении отцовства генетические профили сравниваются для того, чтобы увидеть, имеются ли в профиле ребенка участки, соответствующие участкам отца.

Также вычисляется индекс отцовства (ИО) для каждого генетического маркера - статистическая величина, которая показывает степень совпадения отдельных участков сравниваемых образцов.

ДНК - маркёры в медицине

Использование генетических маркёров для определения отцовства

Локус	Индекс отцовства	Мать	Ребёнок	Предполагаемый отец
D8S11179	10.30	13, 14	14 ,16	13, 16
TH01	2.32	7, 9,3	8, 9,3	7, 8
CSF1P0	11.75	10 ,11	7, 10	7

Заключение: сложившаяся ситуация и перспективы

Первыми молекулярными маркерами были маркеры на основе белкового полиморфизма (биохимический полиморфизм, аллозимы). Они оставались единственными молекулярными маркерами вплоть до 1980 г., когда были предложены маркеры, основанные на полиморфизме генетического материала, полиморфизме ДНК.

До 1988 г. разнообразие ДНК-маркеров было невелико (ПДРФ и минисателлиты). Но с изобретением ПЦР ситуация изменилась и на сегодняшний день научное сообщество располагает большим количеством самых разнообразных ДНК-маркеров, различающихся по своим свойствам и информативности

В результате к 2003 году сложилась такая ситуация, когда в научных и прикладных исследованиях используются в основном четыре типа маркеров, полученных на основе микросателлитного анализа, AFLP, секвенирования и SNP-анализа.

Каковы же перспективы на будущее? Развитие науки идет по пути применения высоких технологий, позволяющих одновременно анализировать большой массив образцов путем автоматизации скрининга. Для анализа малоизученных геномов, по-видимому, будут использоваться два подхода: AFLP и ISSR. Сохранят свое значение при решении конкретных задач методы анализа белкового полиморфизма и рестрикционного полиморфизма ДНК с помощью ПЦР-ПДРФ.

Микросателлиты – одни из наиболее применяемых маркёров в медицине настоящее время.

Заключение

- ✓ Молекулярные (или ДНК-) маркеры – это генетические маркёры, отличающихся от прежних большим количеством и частой встречаемостью в геномах эукариот, основанные на универсальных, востребованных и постоянно развивающихся методах анализа.
- ✓ ДНК-маркеры используются в прикладных областях, а их применение в фундаментальных исследованиях позволило выйти на новый уровень понимания организации и эволюции геномов изучаемых объектов.
- ✓ ДНК- маркёры применяются для определения видовой принадлежности, выяснения степени родства различных групп организмов, их генетического полиморфизма, для составления молекулярных карт хромосом и геномов, а также в практических целях для обнаружения того или иного полезного признака.

Список литературы

1. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015; 17 (4/2): 1044-1054.
2. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение. Физиология и биохимия культурных растений. 2002; 34(4): 279-296.
3. Лопатина А. Б. Химические основы проведения полимеразной цепной реакции. Успехи современного естествознания. 2016; 4-0: 38-42.
4. Шагинян И.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000; 2(3): 82-95.
5. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения. Успехи современной биологии. 2004; 124(3): 260-271.
6. Paran I, Michelmore RW. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theoretical and Applied Genetics. 1993; 85(8): 985-993.
7. Schlötterer C. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? Nature reviews genetics. 2004; 5(1): 63.
8. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. Nature Reviews Cancer. 2002; 2(3):210.