Молекулярная диагностика

Молекулярно-генетические методы в медицинской практике

Где применяется

- Диагностика инфекционных заболеваний
- Диагностика моногенных наследственных болезней
- Судебно-медицинская экспертиза
- Анализ генетической предрасположенности

Разрабатываются подходы

- Фармакогенетика
- Онкогенетика
- Генотерапия
- Генетика мультифакториальных заболеваний

ПРЕДМЕТ ИССЛЕДОВАНИЯ -

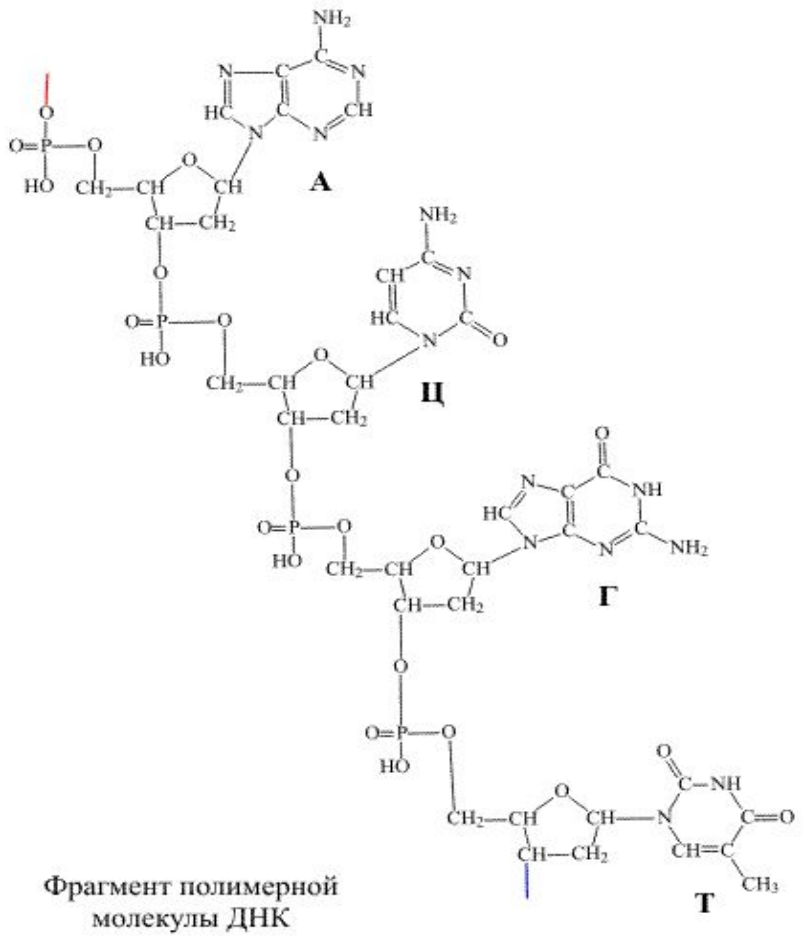
различия в первичной структуре ДНК

cggggcgggg cgcacagagc ca ***g*** aggggct tgcgagcggc ggctgaggga ccgcggggag

cggggcgggg cgcacagagc ca ***c*** aggggct tgcgagcggc ggctgaggga ccgcggggag

Мутация
(полиморфизм)

Молекула ДНК



Фрагмент полимерной молекулы ДНК

Генные мутации и полиморфизм ДНК

Сходства

- по своей природе одинаковы
- могут быть как нейтральными, так и оказывающими влияние на жизнедеятельность

Отличия

- мутации редки (до 3%)
- полиморфизм чаще (свыше 3%)

Генные мутации и полиморфизм - 2

- Точковые (замены, инсерции, делеции)
- Структурные (инверсии, инсерции, делеции)
- Полиморфизм повторяющихся элементов ДНК, динамические мутации

Повторяющиеся последовательности генома

- Рассеянные некодирующие повторы *транспозоны, эндогенные ретровирусы*
- Кодирующие последовательности *мультигенные семейства, рассеянные семейства, псевдогены*
- Тандемные повторы *кодирующие и некодирующие*

Что такое тандемные повторы

Динуклеотидный CG повтор

gaccga<u>CGCGCGCGCGCG</u>ccagtc – $(CG)_6$

gaccga<u>CGCGCGCGCGCGCG</u>ccagtc – $(CG)_7$

gaccga<u>CGCGCGCGCGCGCGCG</u>ccagtc – $(CG)_8$

Тандемные повторы

- Микросателлиты (2-13 п.н.)
- Минисателлиты (до 64 п.н.)
- Сателлиты (до 171 п.н.)
- Мегасателлиты (до неск.тысяч п.н.)

Методы молекулярной диагностики

- Блот-гибридизация
- ПЦР
- ЛЦР
- ASO (метод аллель-специфических олигонуклеотидов
- Real-time ПЦР (ПЦР в реальном времени)

И многое другое

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Предложена в 1983 г. K.Mullis (Нобелевская премия 1989 г.)

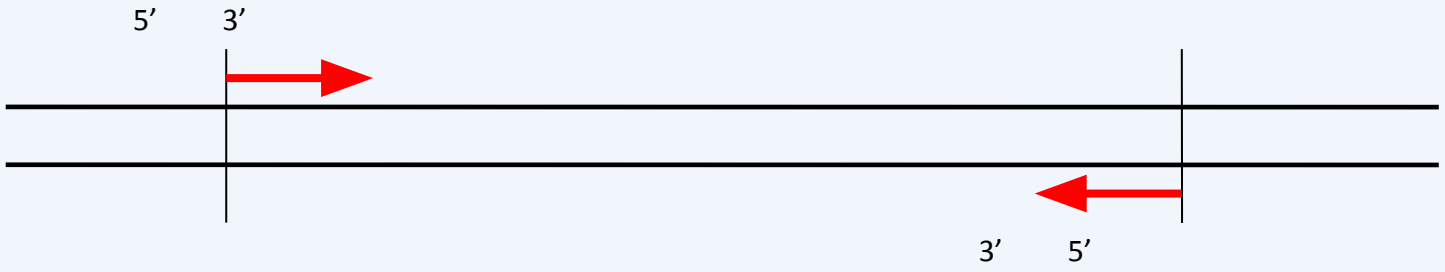
Позволяет получить in vitro большое число идентичных копий специфических нуклеотидных последовательностей

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Необходимы:

- ДНК-мишень (80 – 1000 пн)
- Специфические олигонуклеотидные праймеры
- ДНК-полимераза Taq или Tth (из Thermus aquaticus или T.Thermopilus)
- Дезоксирибонуклеоидтрифосфаты

ПЦР – выбор праймеров

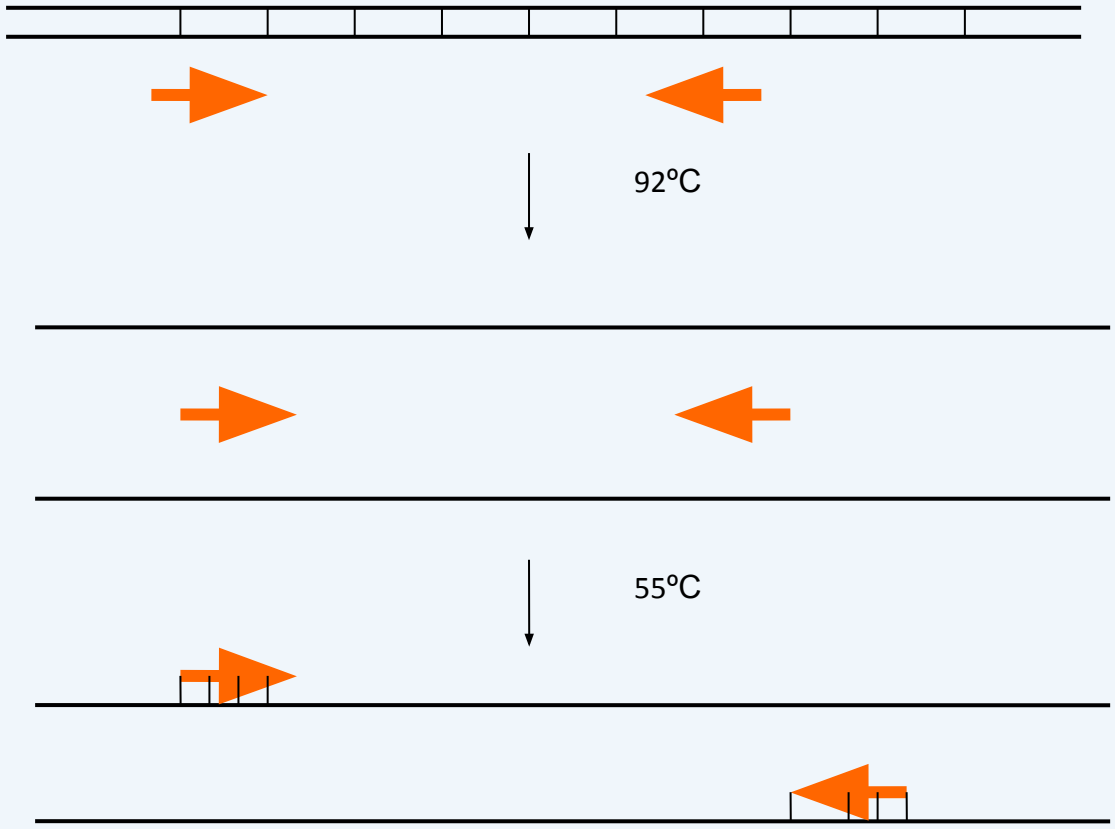


ПЦР – выбор праймеров

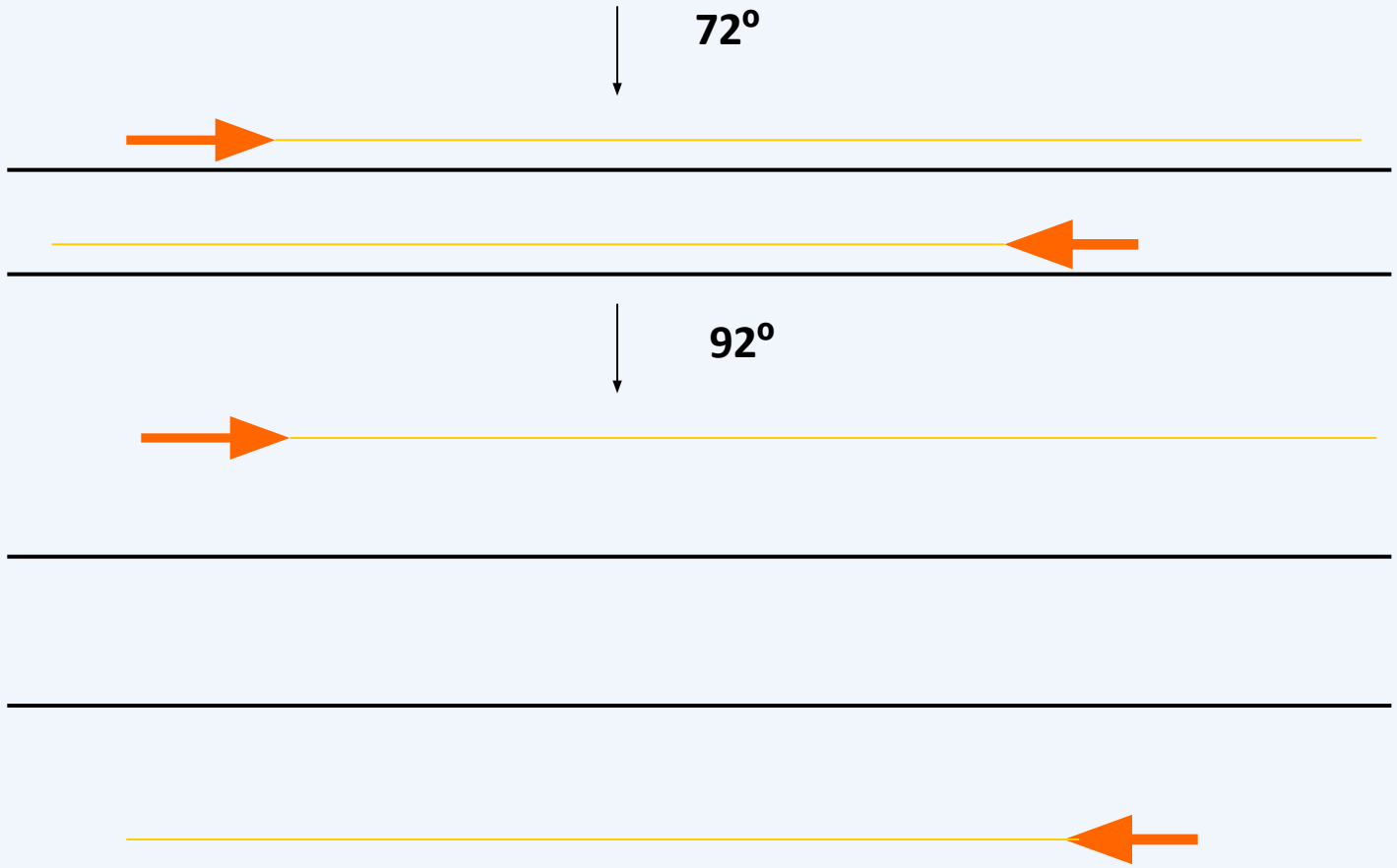
5’*cggggcgggg* **<u>cgcacagagc cagaggggct</u> tgcgagcggc ggctgaggga ccgcggggag ggggcgccga gcggctccag cgcagagact ctcactgcac gccggagggc gcccttcctc gctcgcgccc gcgcgaccgc gcgccccagt cccgccccgc cccgctaacc gcccccagaca cagcgctcgc <u>cgagggtcgc ttggaccctg</u>** *atcttacccg tgggcaccct* 3’

- Прямой праймер: 5’ **cgcacagagccagaggggct -**3’
- Обратный праймер: 5’ **cagggtccaagcgaccctcg** -3’

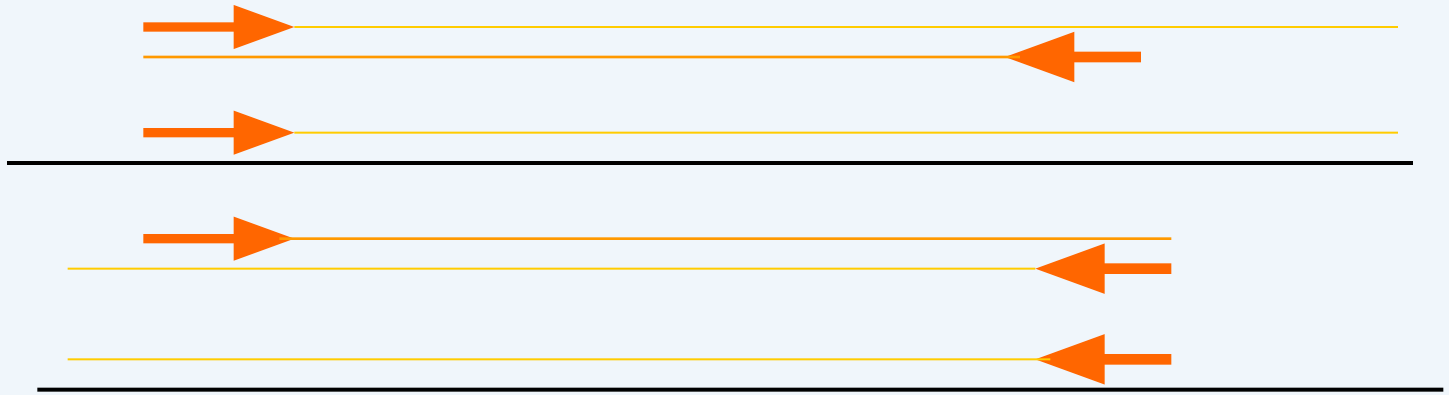
ПЦР – начало



ПЦР - 2



ПЦР - 3

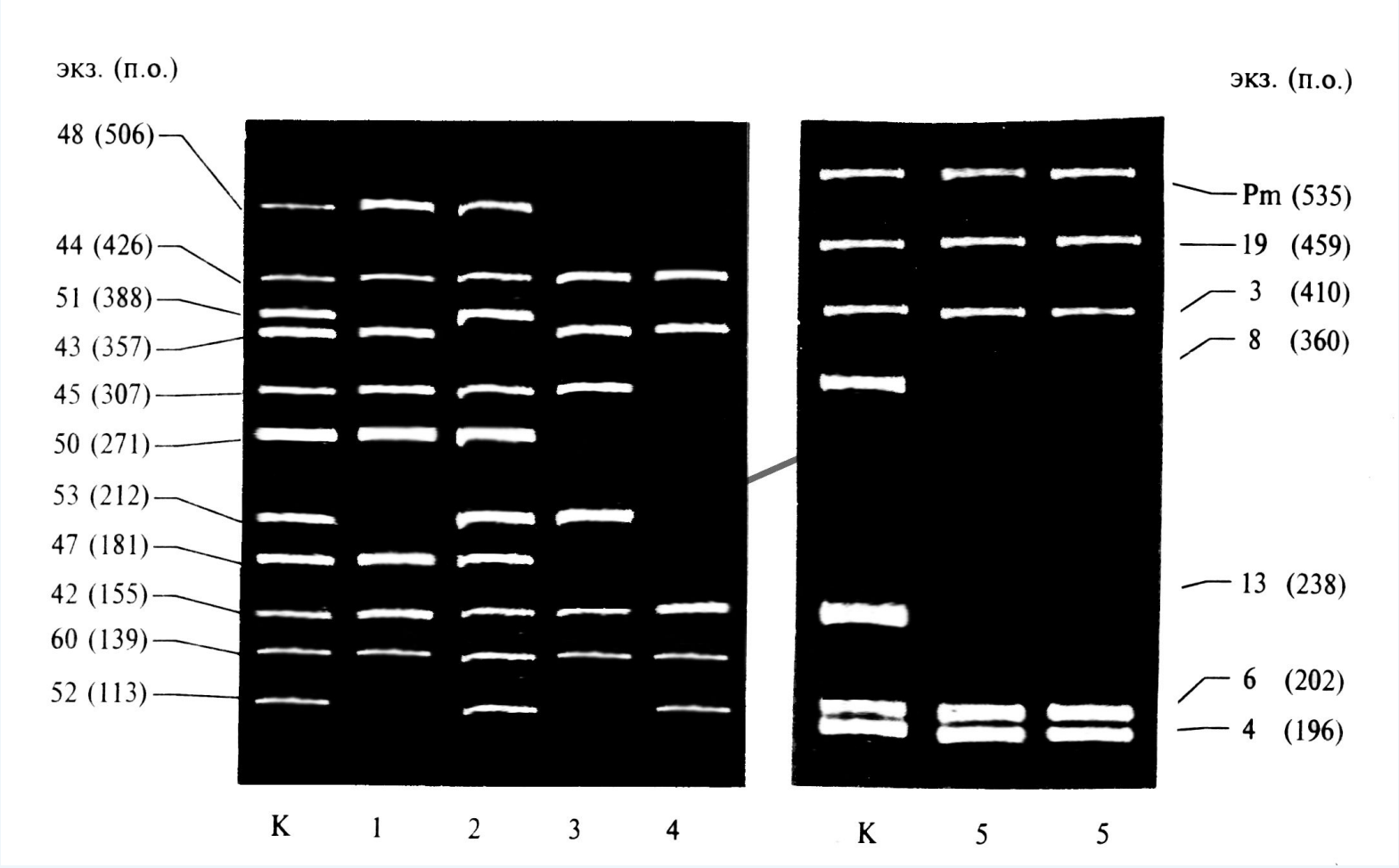


Результат

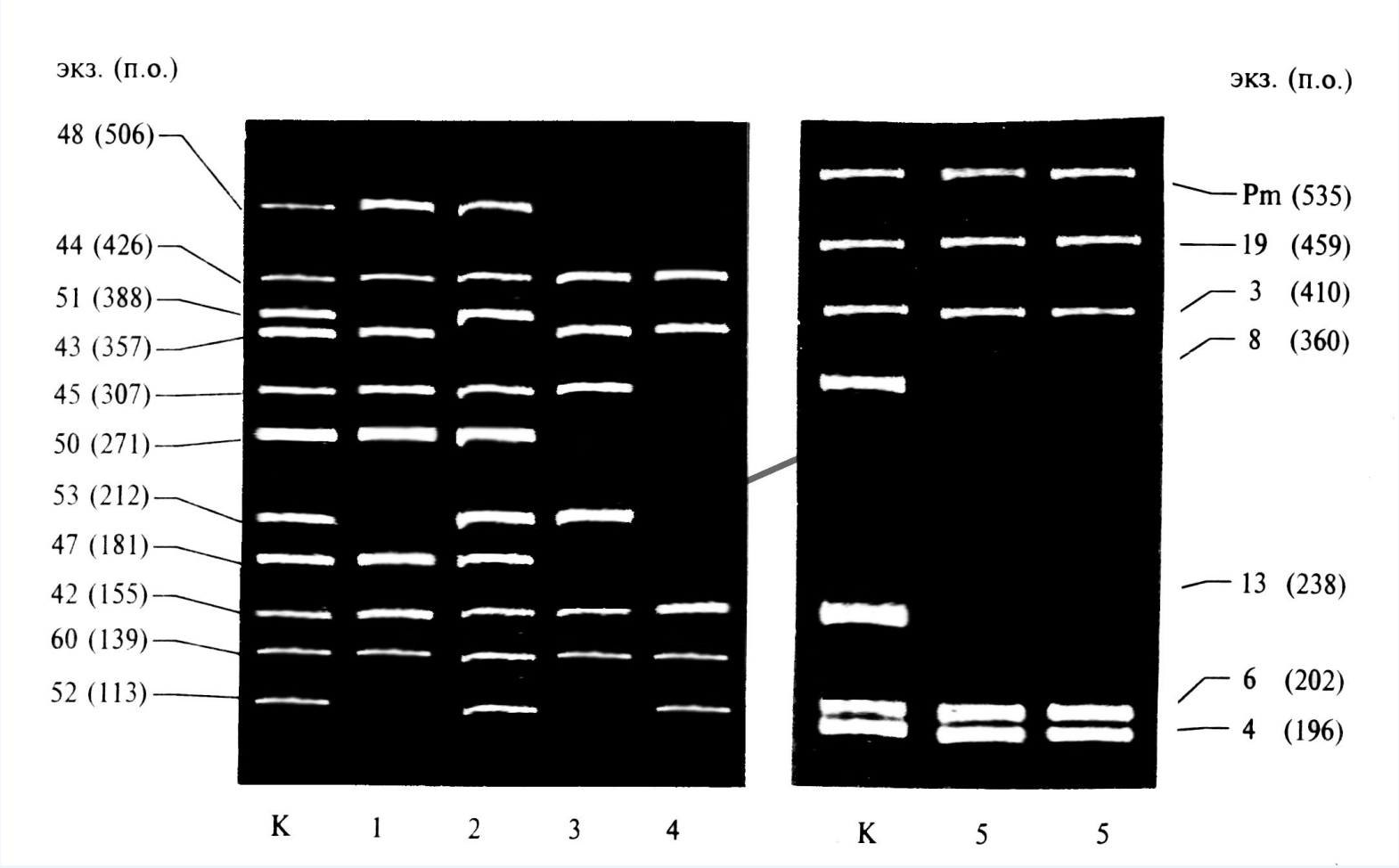
Электрофорез

Камера для агарозного электрофореза

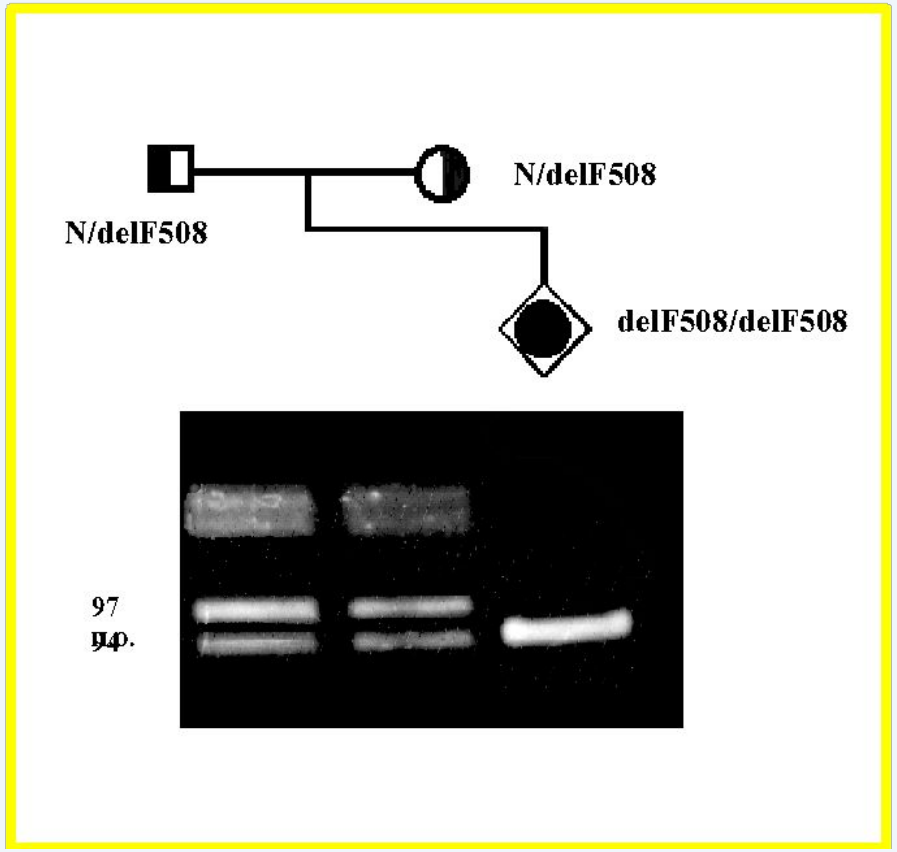
ВИЗУАЛИЗАЦИЯ И РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ПЦР С ПОМОЩЬЮ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА



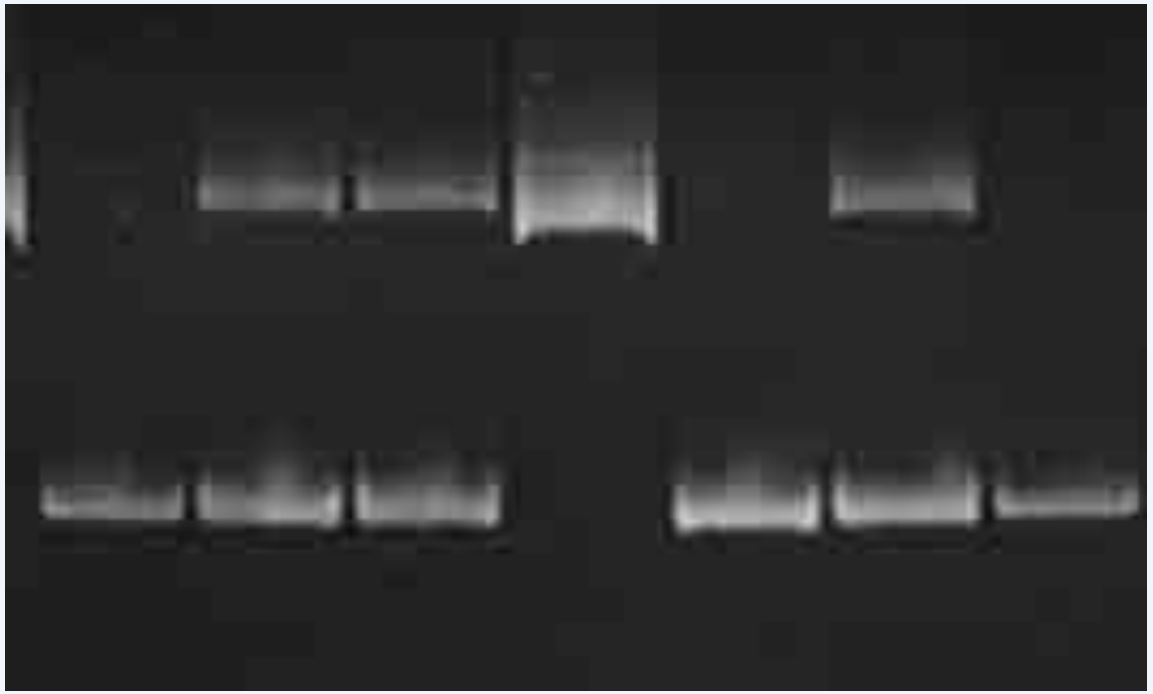
БОЛЬШИЕ ДЕЛЕЦИИ



Маленькие делеции



Инсерция Alu-элемента



Инсерция

Делеция

Принцип ПДРФ-анализа (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов)

Рестриктаза Hinf1 - последовательность

GAGTC

Полиморфизм MTHFR C677T

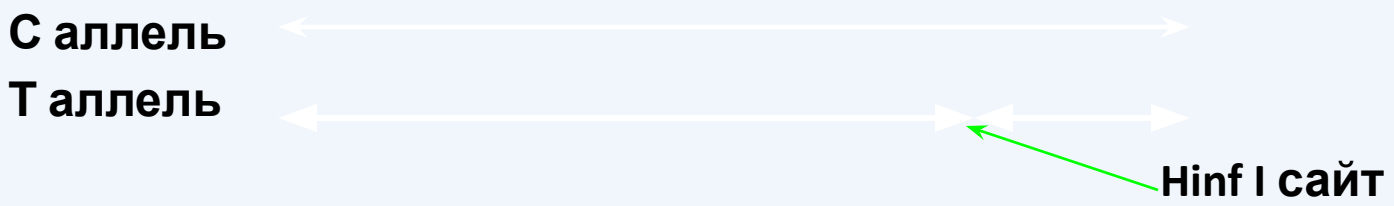
Вариант C – GAGCC (не узнается)

Вариант T – GAGTC (узнается)

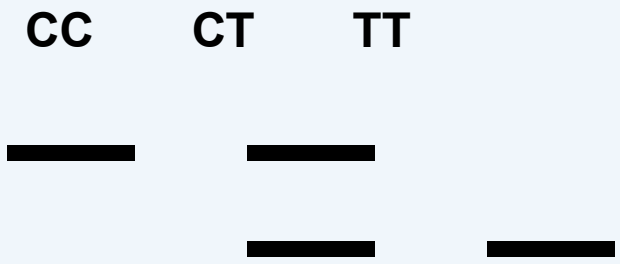
ПДРФ анализ

ПЦР → Электрофорез (проверка ПЦР) → Рестрикция → Электрофорез (анализ)

а) схема рестрикции. Сайт для рестриктазы gagTc



б) анализ результатов



ТАНДЕМНЫЕ ПОВТОРЫ

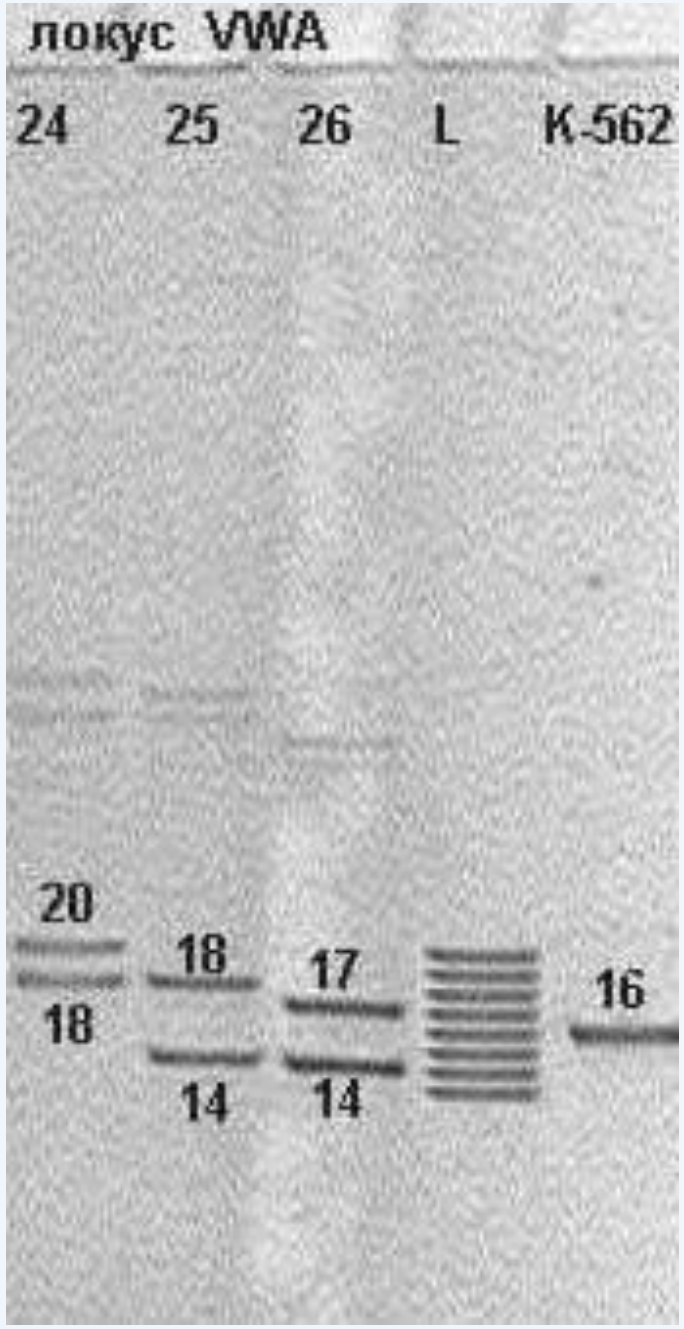
Для 4хнуклеотидных повторов:

Если 13 повторов – 100 п.н,

14 повторов – 104 п.н.,

15 повторов – 108 п.н.

И т.д.



СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА SNP

ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

БИОЧИПЫ

МАССПЕКТРОМЕТРИЯ

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Hydrolysis (TaqMan)

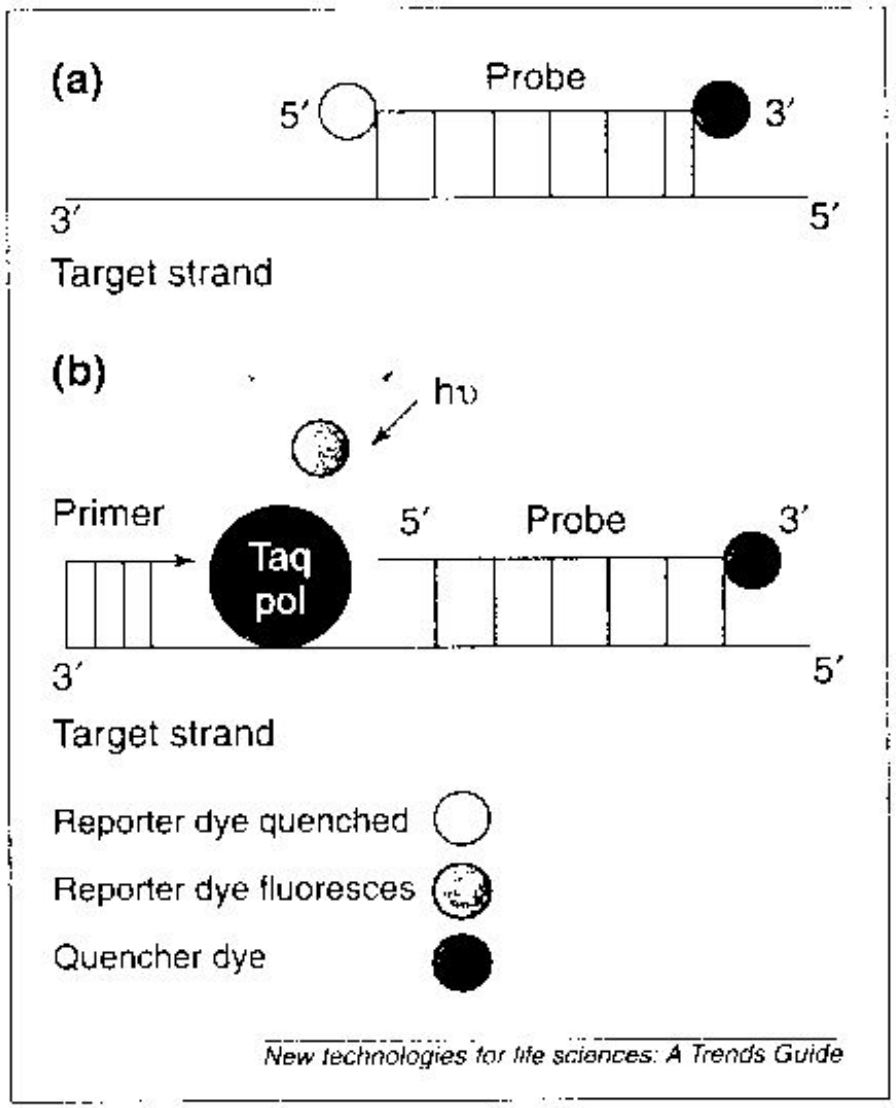


Figure 1. Schematic representation of the hydrolysis probe (TaqMan™) procedure

(a) Shows that when the probe, whether hybridized or not, is intact the reporter dye is quenched. In **(b)**, the probe is hydrolyzed during the PCR reaction and the reporter dye fluoresces.

Масс-спектроскопия

Масс-спектрометрия - это физический метод измерения отношения массы заряженных частиц материи (ионов) к их заряду.

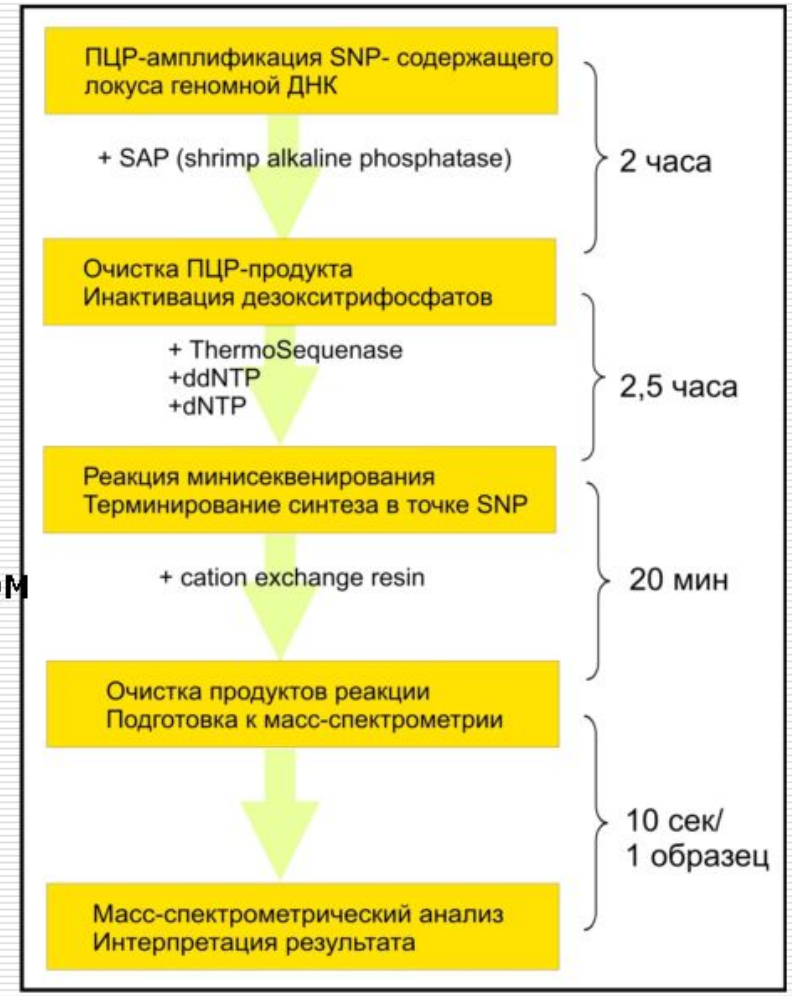
Масс-спектр - это просто рассортировка заряженных частиц по их массам (точнее отношениям массы к заряду).

Основные этапы:

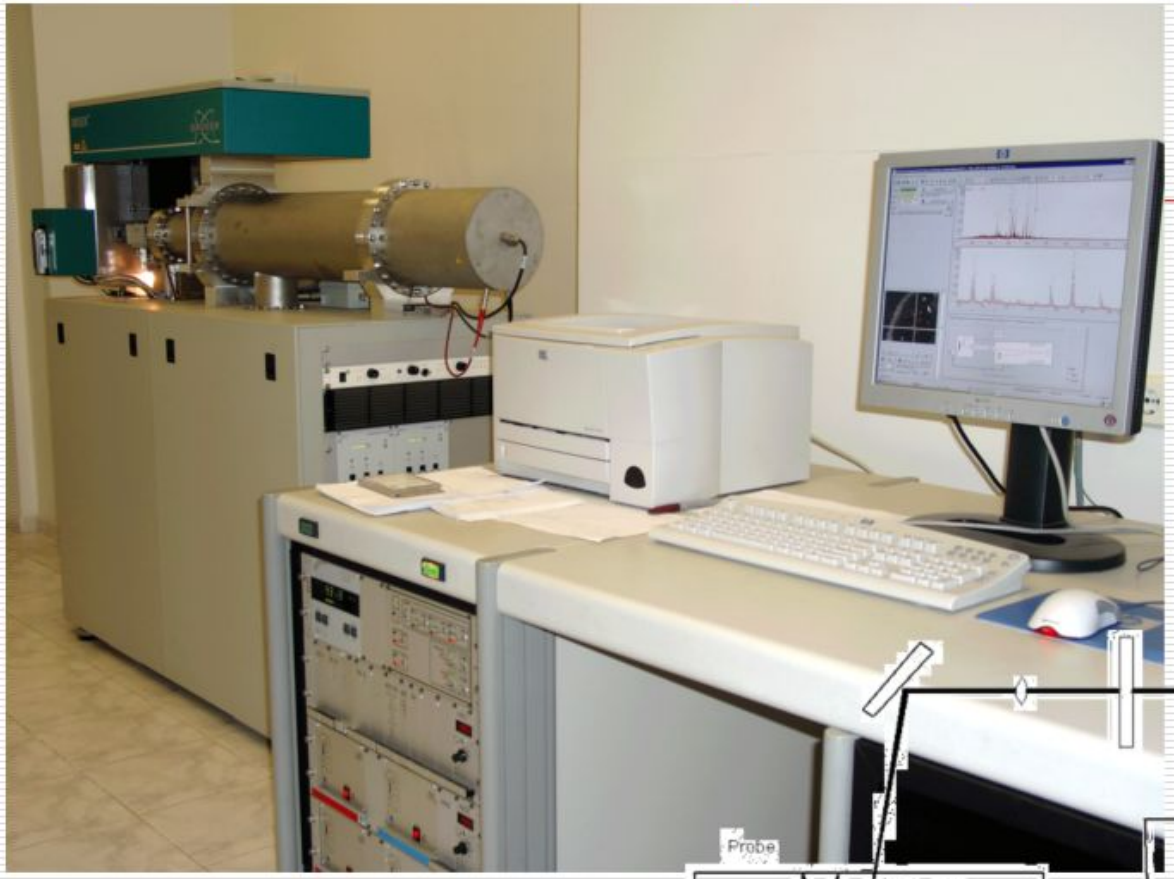
- Ионизация
- Рассортировка по массе
- Детекция

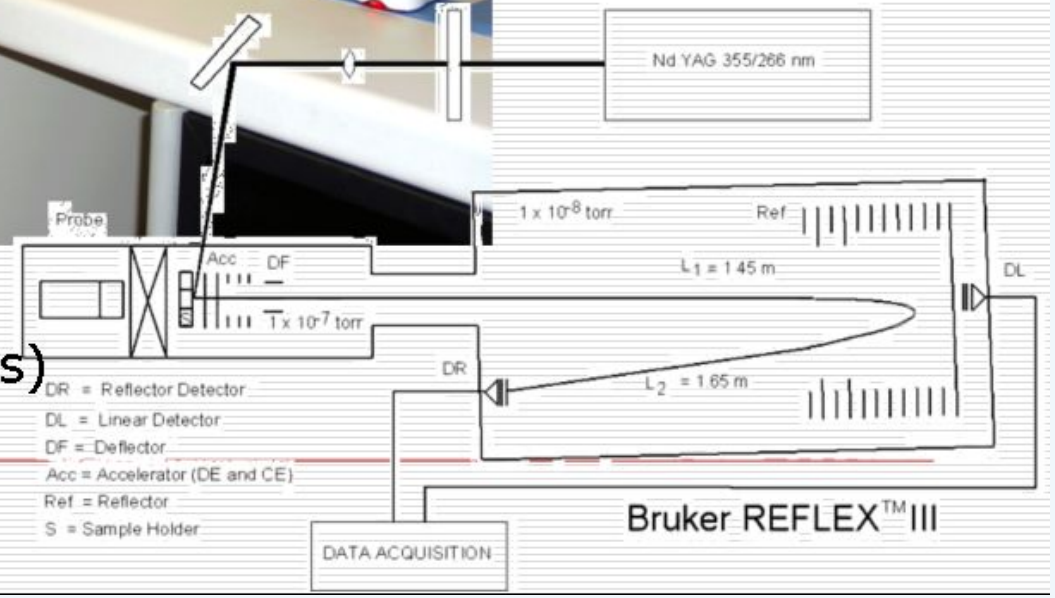
Разработка высокопроизводительной схемы анализа

Амплификация, дефосфорилирование, минисеквенирование в микропланшетном формате (96 или 384 образцов)



Масс-спектрометрический этап



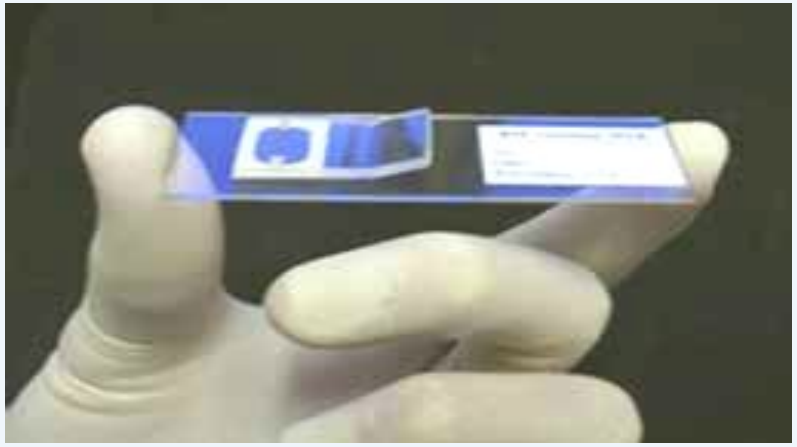


Reflex IV (Bruker Daltonics)

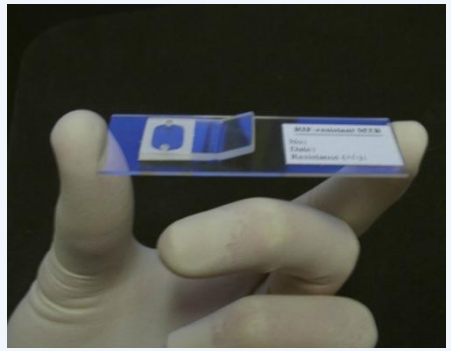
- Биочип - упорядоченная матрица ячеек, каждая из которых содержит молекулярный зонд (ДНК, РНК, белки, клетки)

- Биочип способен осуществлять одновременный множественный анализ биологических объектов в исследуемом образце (каждая ячейка – индивидуальная реакционная пробирка)

- ДНК-биочипы представляют собой зонды, способные не только выявлять наличие определенной ДНК в образце, то и находить в ней фенотипически значимые мутации – полиморфизмы, что позволяет диагностировать наследственные заболевания, определять генетическую предрасположенность к мультифакторным болезням, чувствительность к фармпрепаратам, лекарственную устойчивость у бактерий и т.д.)

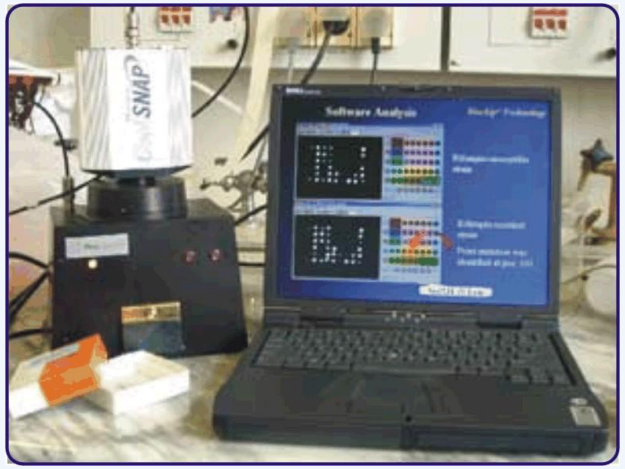


ТЕХНОЛОГИЯ БИОЧИПОВ

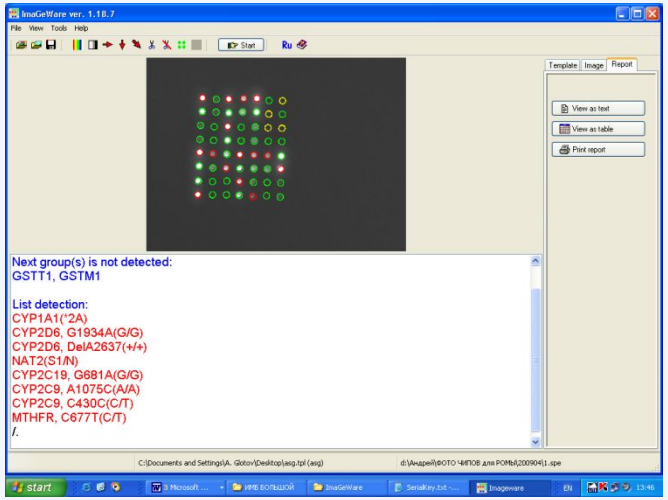


биочип

робот

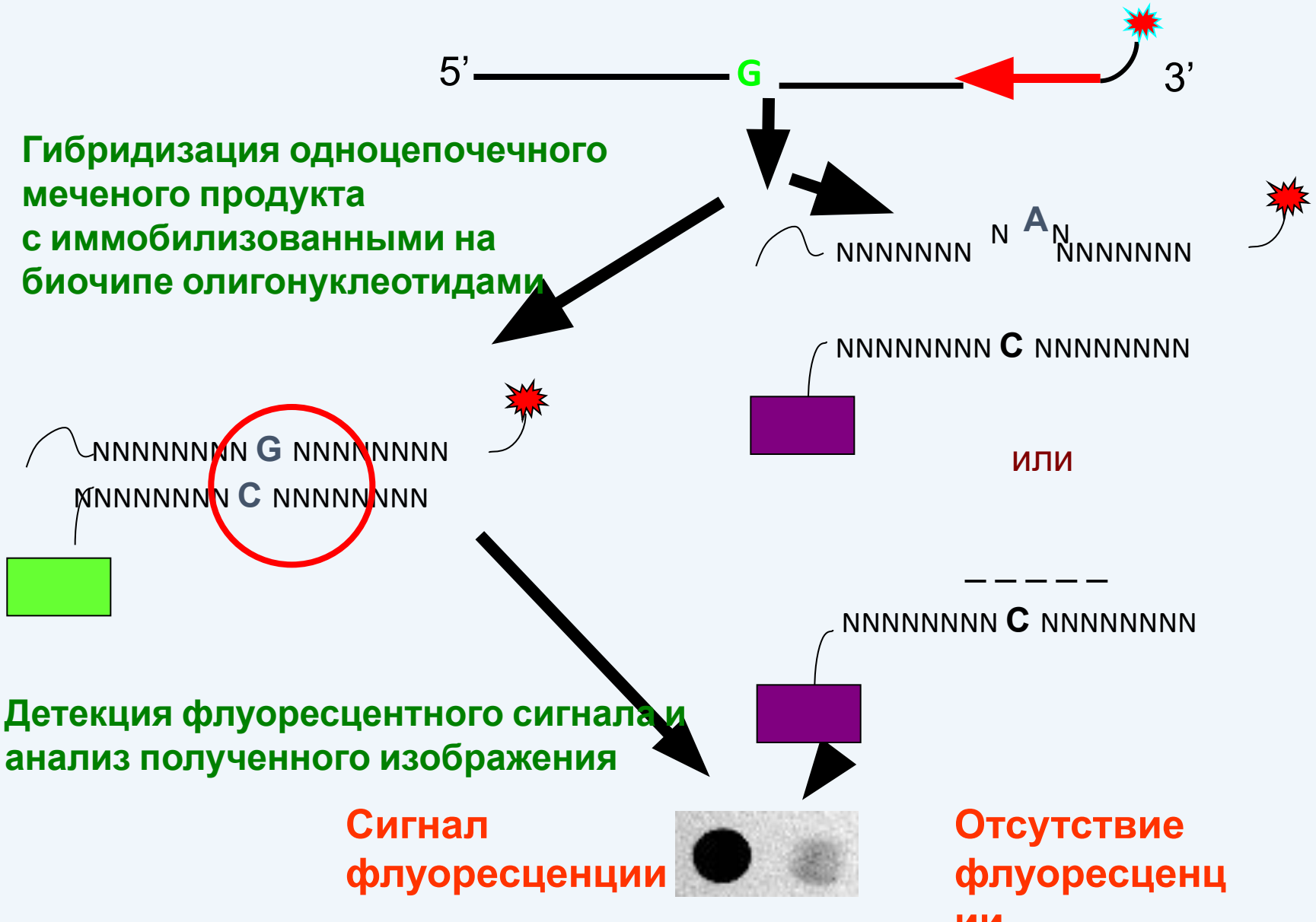


Портативный анализатор



Автоматический анализ генетических изменений (до 100 образцов в день)

ПРИНЦИП ДЕТЕКЦИИ МУТАЦИЙ С ПОМОЩЬЮ БИОЧИПА



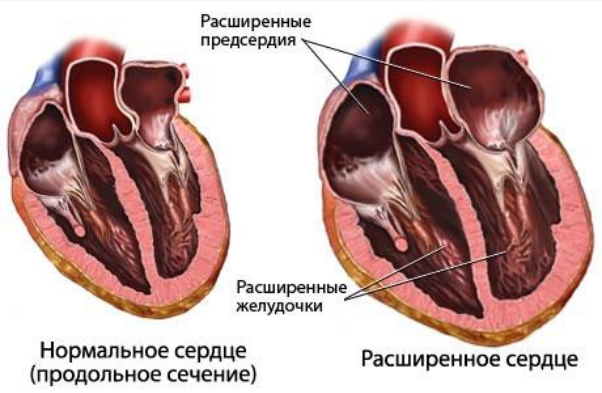
Развитие технологий геномного секвенирования

Широкая линейка приборов для NGS:

Система высокопроизводительного полногеномного секвенирования Иллюмина HiSeq 4000, 2500, Miseq, Ion Torrent, GS Junior, секвенатор ABI 3500

Гены кардиомиопатий

Гены	Символ	Хромосома	Частота
Основные гены			
β-Myosin heavy chain	*MYH7*	*14q1*	*~25–30%*
Myosin binding protein-C	*MYBPC3*	*11q1*	*~ 25–30%*
Cardiac troponin T	*TNNT2*	*1q3*	*~3–5%*
Cardiac troponin I	*TNNI3*	*19p13.2*	*~3–5%*
α-Tropomyosin	*TPM1*	*15q1*	*~1%*
Myozenin 2	*MYOZ2*	*4q25–26*	*1 : 250*
Myosin light chain 1	*MYL3*	*3p*	*Rare*
Myosin light chain 2	*MYL2*	*12q*	*Rare*
α-Cardiac actin	*ACTC1*	*15q11*	*Rare*
Titin	*TTN*	*2q13–33*	*Rare*
Telethonin	*TCAP*	*17q12*	*Rare*
Вероятные гены-кандидаты			
Myosin light chain kinase 2	*MYLK2*	*20q13.3*	*Rare*
α-Myosin heavy chain	*MYH6*	*14q12*	*Rare*
Cardiac troponin C	*TNNC1*	*3p21*	*Rare*
Caveolin 3	*CAV3*	*3p25*	*Rare*
Phospholamban	*PLN*	*6p22.1*	*Rare*
Calreticulin	*CALR3*	*19p13.11*	*Rare*
Junctophilin-2	*JPH2*	*20q13.12*	*Rare*
Mitochondrial tRNAs	*MTTG, MTTI*	*Mitochondrial DNA*	*Rare*

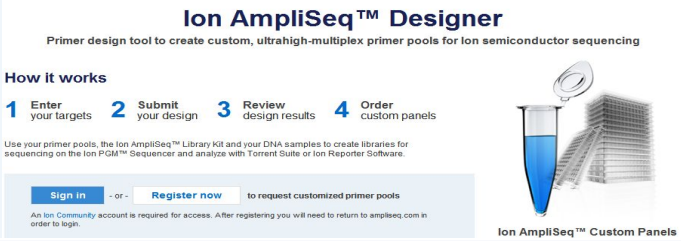


http://www.zoonoz.ru/348.php

Marian, 2008

Необходимость секвенирования локусов

Исследование генов кардиомиопатий методом NGS секвенирования

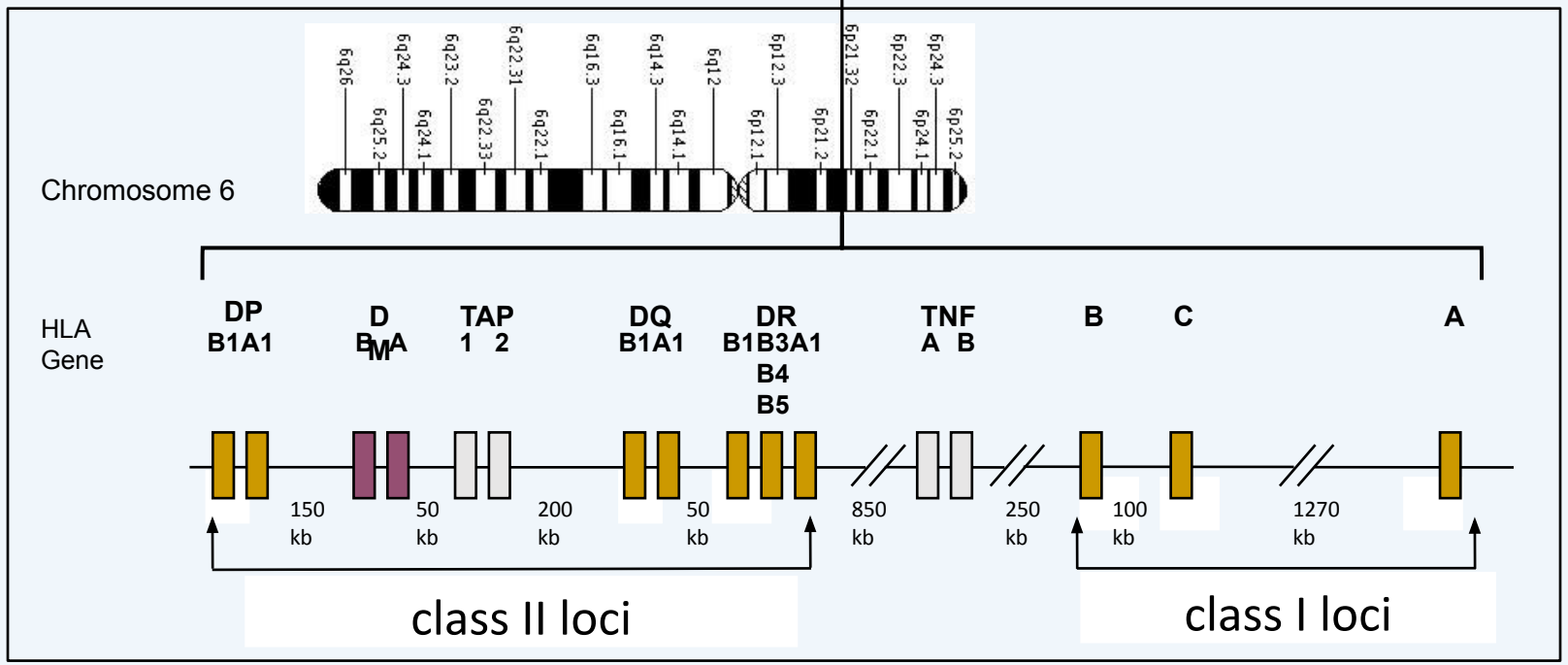


Гены кардиомиопатий:
ACTC1
MYBPC3
MYH7
MYL2
MYL3
TNNI3
TNNT2
TPM1
CASQ2

Одновременные анализ 9 генов (более 2000 мутаций)
Стоимость исследования всего 1500$ (старыми методами – более 10000$ за секвенирование 1 гена)

HLA-типирование
Строение области HLA (Human Leukocyte Antigen)

- HLA – поверхностный антиген B- и T-лимфоцитов (главный комплекс гистосовместимости)
- HLA наиболее полиморфная область человеческого генома
  - В октябре 2010 году было обнаружено порядка 5674 аллелей этой области
  - Постоянно обнаруживаются новые варианты



*source: E. Thorsby, Human Immunol., 53, 1-11, 1997

МОНОГЕННЫЕ НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ

Моногенные наследственные заболевания

- Всего известно до 4000 болезней
- Частота до 0,5% среди новорожденных
- Различные сроки манифестации *у новороженных 25% до 3 лет 70% до пубертата 90%*
- Часто встречаются изолированные случаи *аутосомно-рецессивные заболевания, мутации de novo*

Патогенез некоторых наследственных заболеваний

- Гемофилия А – дефицит FVIII
- Миопатия Дюшенна – отсутствие белка, стабилизирующего клеточную мембрану миоцитов
- ФКУ – отсутствие фенилаланингидроксилазы
- СМА – отсутствие белка, тормозящего апоптоз в моторных нейронах передних рогов спинного мозга

Частоты заболеваний

- Частые (более чем 1:10 000 населения)
- Средняя частота (от 1:10 000 до 1:40 000)
- Редкие (менее чем 1:40 000)

Распространенные наследственные болезни

По всему миру

Адрено-генитальный синдром
Спинальная амиотрофия Верднига-Гофмана

Миодистрофия Дюшенна
Гемофилия А

Нейрофиброматоз

В России

Муковисцидоз
Фенилкетонурия

Адрено-генитальный синдром
Спинальная амиотрофия Верднига-Гофмана

Частота адрено-генитального синдрома в разных популяциях

- Швейцария, кантон Цюрих 1:5 000
- Кувейт 1:9 000
- Швеция 1:11 500
- Япония 1:18 000

Частота встречаемости фенилкетонурии в различных популяциях

- Турция, Ирландия 1: 2 600 новорожденных
- Япония 1: 120 000 новорожденных
- Европа 1: 10 000 новорожденных

Финляндия 5: 4 500 000 населения

Частоты носительства

Каждый человек имеет около 10 мутаций, летальных в гомозиготном состоянии

Частота гетерозиготного носительства МВ

Уравнение Харди-Вайнберга

$p^2+2pq+q^2$

Пусть $q^2=1/3600$. Тогда $q=1/60$.

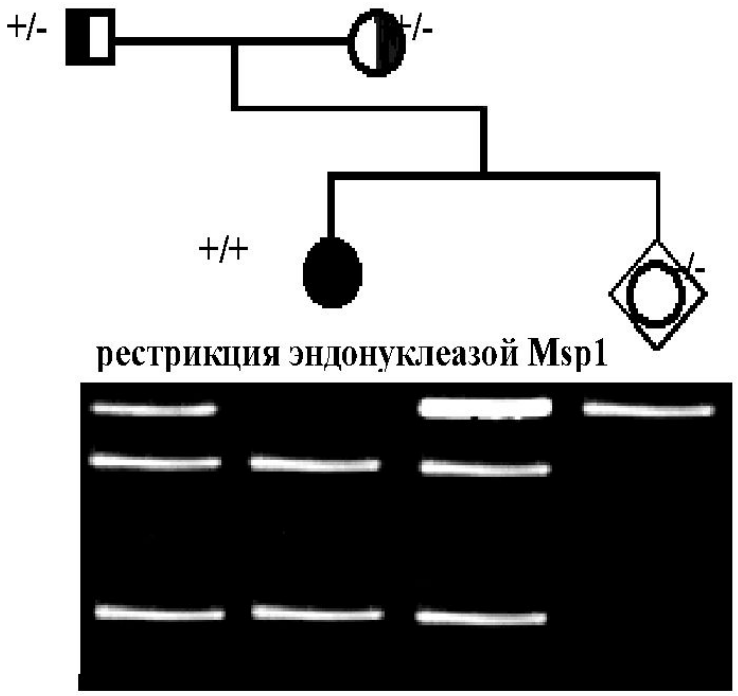
$2pq=2*59/60*1/60=1/30$

Два подхода к молекулярной диагностике НБ

- **Прямая диагностика** – *поиск мутаций, приводящих к развитию болезни*
- **Косвенная диагностика** – *выявление мутантных аллелей без установления природы конкретных мутаций, путем анализа внутригенных полиморфных локусов в данной семье*

Косвенная диагностика

Появилась значительно раньше



Недостатки косвенной диагностики

- Возможна только при проведении семейного анализа и наличии материала пробанда
- Необходимо наличие информативности семьи
- Меньшая точность всвязи с вероятностью кроссинговера между маркером и мутацией

Косвенная диагностика - возможности

- Возможны пренатальная диагностика, определение носительства, пресимптоматическая и преимплантационная диагностика
- Невозможна верификация диагноза

Прямая диагностика – выявление мутаций в конкретной семье

Позволяет решать **ВСЕ** задачи молекулярной диагностики

Мажорные мутации – более 1% всех мутаций при данном заболевании

Существуют для большинства распространенных НБ

МВ – 70%

ФКУ – 60%

МДД – 70%

СМА – 98%

ХГ – 99%

Мажорные мутации при МВ (5 наиболее частых)

В Европе (всего 55 мажорных мутаций)

delF508 - 66,8% (26,3-87,2%)

G542X – 2,6%

N1303K – 1,6%

G551D – 1,5%

W1282X – 1,0%

В России (всего 19 мажорных мутаций)

delF508 – 50,2%

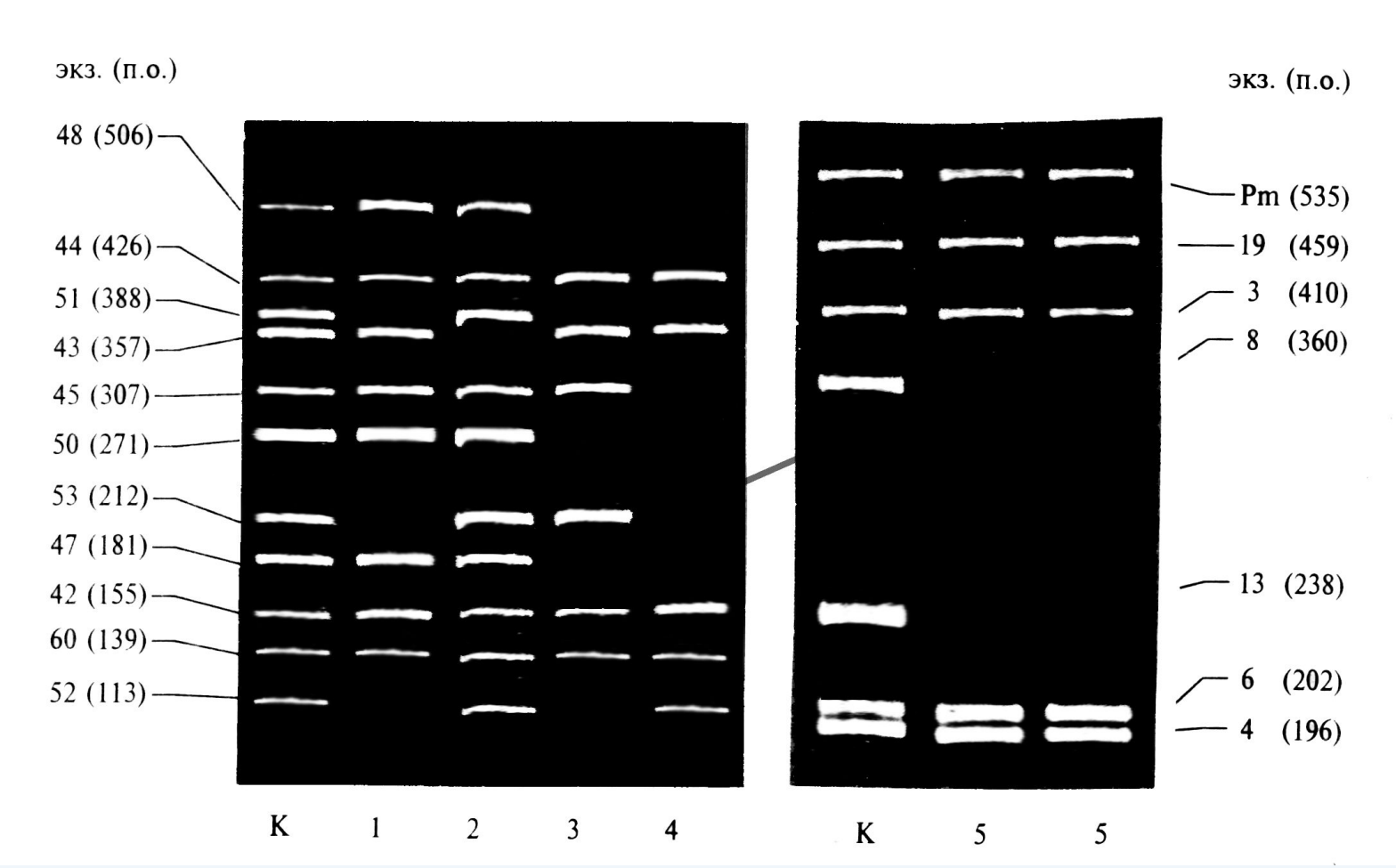
3737delA – 4,3%

Del21kb – 4,1%

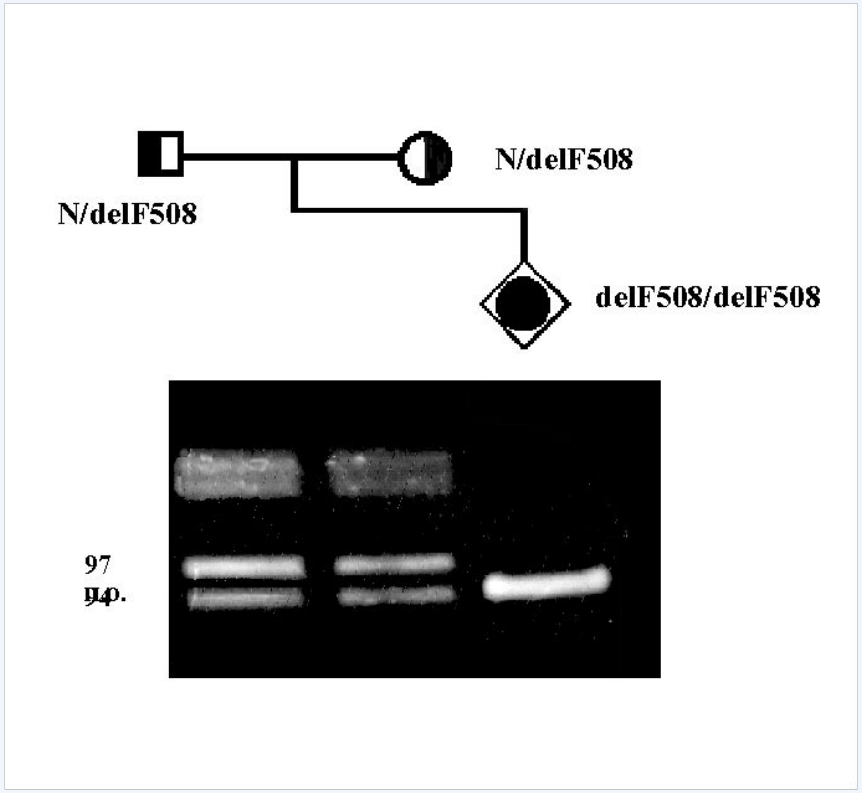
2143delT – 3,2%

2184insA – 2,7%

Большие делеции – мажорные мутации при миопатии Дюшенна



Пренатальная диагностика муковисцидоза (прямой метод, delF508)



Прямая диагностика 3

- При отсутствии мажорных мутаций возможен поиск мутаций в конкретной семье (секвенирование гена)
- Применяется редко – высокая трудоемкость и стоимость

ЭКЗОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Учитывая большие размеры кодирующих последовательностей генов, ассоциированных с врожденным гиперинсулинизмом и MODY-диабетом, проводилось экзомное секвенирование.

В анализ включены только гены, ассоциированные с заболеванием.

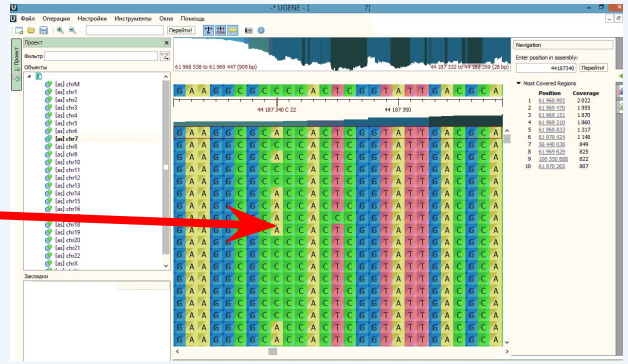
HNF1A, GCK, HNF4A, HNF1B, PDX1(IPF1), NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, EIF2AK3, RFX6, WFS1 , ZFP57, FOXP3, KCNJ11, ABCC8, KCNJ11, ABCC8, GLUD1, HADH (SCHAD), GCK, SLC16A1, HNF4A, HNF1A, UCP2, INSR, AKT2, GCG, GCGR, PPARG, PTF1A.

Всего: 33 гена

Что нами сделано:

1. Провели отбор целевых генов;
2. Создали коллекцию биообразцов;
3. Разработали алгоритм анализа данных;
4. Выявили определенные ошибки в референсных геномах (в разработке программа по устранению ошибок);
5. Разработали собственный «Score» оценки патогенности выявленных вариантов

Идентификации мутации ***c.772C>A*** в гене ***GCK*** у больного моногенным сахарным диабетом (NGS секвенирование)



Ранжирование вариантов

Пример ранжирования вариантов в таблице для одного пациента. На первое место выводится подтвержденная по Сэнгеру патогенная замена.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1	Gene	Chro	Position	rsID	REF	ALT	EffType	IVS	OMIM	ClinVar	PROVEAN	SIFT	Polyphen2	fathmm-MK	1000G-AF	ExAc-AF	ESP6500	OUR_AF	S27	S59
2	GCK	7	44187340	-	C	A	PROTEIN_INTERACTION	12	-	-	Deleterious	Damaging	Damaging	Pathogenic	0	0	0	0.006757	0/0:29/0	0/1:11/27
3	GCK	7	44198764	rs150560724	C	T	UTR_5_PRIME	3.83335	-	-	-	-	-	Benign	0.00599042	0.008475	0.007535	0.016	0/0:13/0	0/1:9/10
4	ABCC8	11	17426996	rs200276273	G	T	INTRON	3.78456	-	-	-	-	-	Benign	0.00259585	0.011	0.011012	0.048	0/0:7/0	0/1:2/4
5	GCGR	17	79769834	rs140065949	C	T	INTRON	3.54084	-	-	-	-	-	Benign	0.0183706	0.023	0.024091	0.007042	0/0:40/0	0/1:25/24
6	MOG	6	29643875	-	A	ATG	DOWNSTREAM	1.868	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0.066	0/0:22/0	0/1:15/5/0
7	SLC16A1	1	113460676	-	CA	CA	INTRON	1.606	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0.197	./0:9/0/2	./1:0/2/21/0/
8	SGCG	13	23808732	-	CT	C	INTRON	1.088	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0.456	0/1:42/1	0/1:47/10
9	HNF1A	12	121439598	rs11065390	G	A	UTR_3_PRIME	0.95304	-	-	-	-	-	Benign	0.120008	0.042	0	0.097	0/0:36/0	0/1:8/16
10	SCEL	13	78178550	rs2274016	G	A	NON_SYNONYMOUS_CO	0.87695	-	-	Neutral	Damaging	Benign	Pathogenic	0.235224	0.145	0.098431	0.162	0/1:26/1	0/1:7/13
11	LINS1	15	101109683	rs1047320	T	C	SYNONYMOUS_CODING	0.85718	-	-	-	-	-	-	0.00898562	0.016	0.018069	0.061	0/0:35/0	0/1:42/71
12	HADH	4	108911051	rs17550794	T	C	UTR_5_PRIME	0.81232	-	-	-	-	-	Benign	0.13099	0.08	0.144243	0.115	0/0:36/0	0/1:6/16
13	LOC10192	2	88861757	rs1800980	T	G	INTRON	0.76042	-	-	-	-	-	Benign	0.132388	0.08	0.15774	0.103	0/0:56/0	0/1:26/16
14	PAX4	7	127253898	rs77039439	G	A	SYNONYMOUS_CODING	0.71847	-	Benign	-	-	-	-	0.0177716	0.045	0.05213	0.061	0/0:59/0	0/1:38/26
15	LINS1	15	101114482	rs34231390:r	AAC	A	INTRON	0.61863	-	-	-	-	-	-	0.127596	0.171	0.154137	0.21	0/1:37/4	0/1:26/18
16	PTF1A	10	23482850	rs10828415	G	A	UTR_3_PRIME	0.57172	-	-	-	-	-	Benign	0.212859	0.127	0.058588	0.054	0/0:57/0	0/1:50/41
17	INSR	19	7184651	-	GGA	GGA	INTRON	0.45191	-	-	-	-	-	-	0	0.215	0	0.242	0/1:4/7/	0/1:26/4/0/0
18	EIF2AK3	2	88926729	-	CCA	CCA	CODON_DELETION	0.45	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0.527	1/1:0/21	0/1:5/4/0

Выявляемость эндокринной патологии у детей методом NGS

Нозология	ДНК общ/пробанд	Процент выявляемости
Вр. гипотиреоз	38/19	14,3%
Гипопитуитаризм	222/94	4,8%
Гип.Гипогонадизм	20/12	33,3%
СД и гиперинсулинизм	118/72	**41,6%**
Нарушения формирования пола	27/15	50%
Андрогенитальный синдром	112/51	61%
Редкие нозологии	19/12	-
Всего	548/273	

Этапы генетического анализа

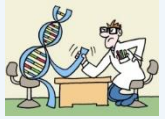
1. Получение ИС и согласия на обработку ПД

2. Забор и хранение материала

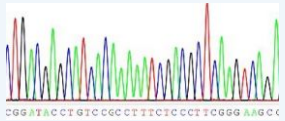
3. Выделение ДНК

4. Секвенирование ДНК

5. Биоинформационный анализ данных

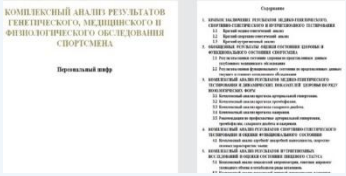


6. Верификация данных



7. Обработка результатов. Анализ баз данных

Ответ

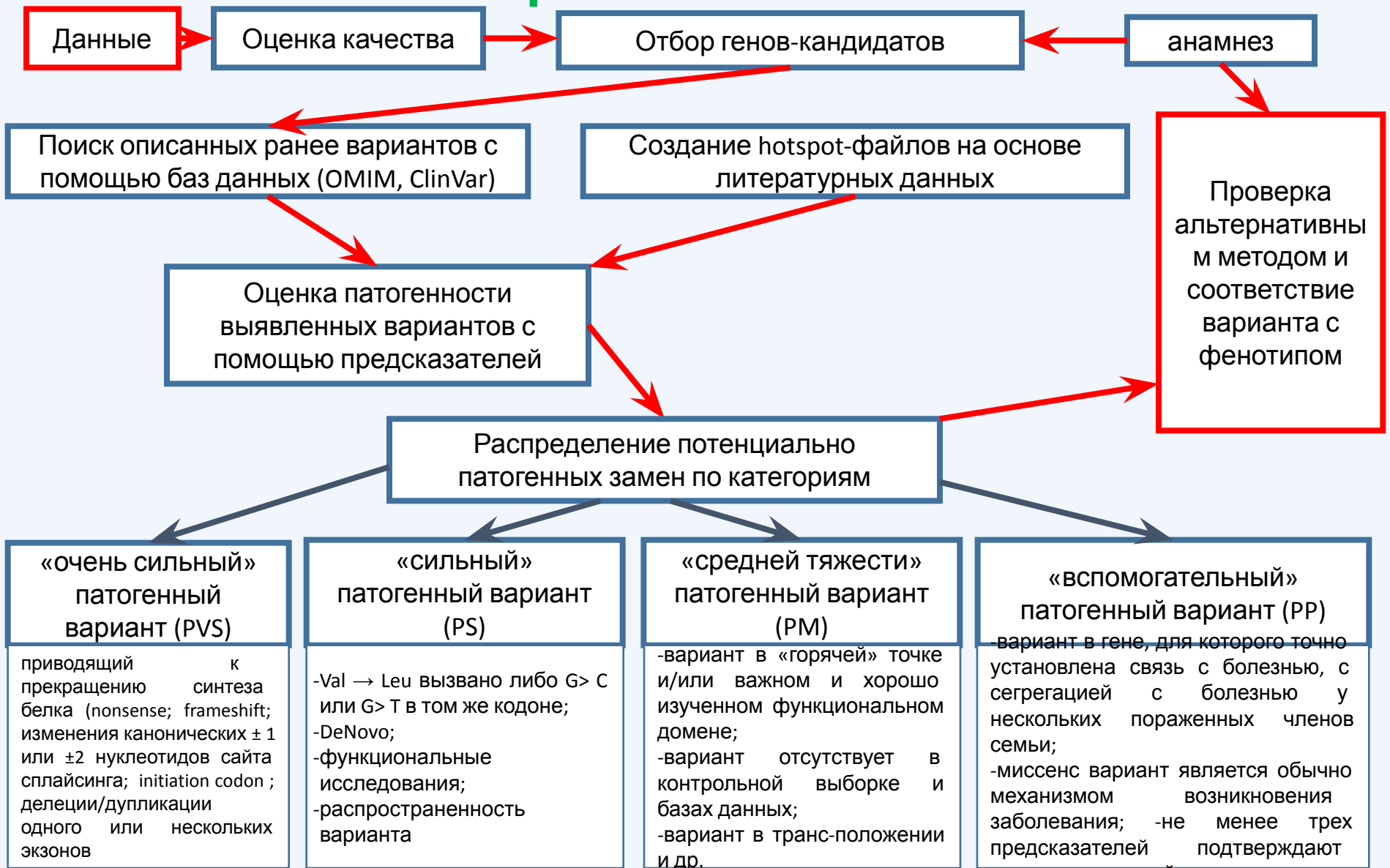


КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ГЕНЕТИЧЕСКОГО, МЕДИЦИНСКОГО И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ СПОРТСМЕНА

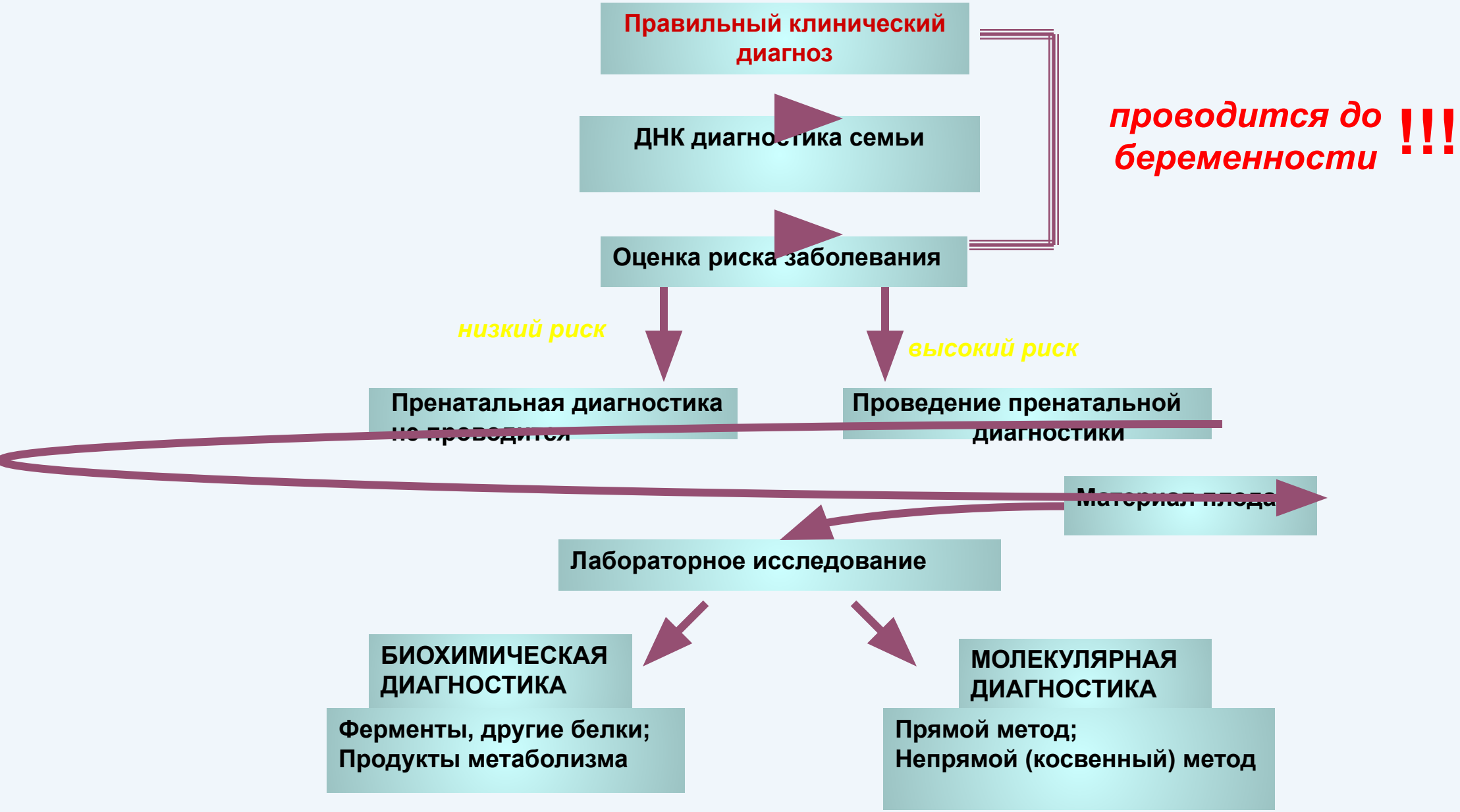
Персональный профиль

Содержание

Алгоритм NGS анализа



Алгоритм пренатальной диагностики моногенных болезней



Задачи ДНК-диагностики

1. Подтверждение клинического диагноза, дифференциальная диагностика

Клиническая картина заболевания может весьма отличаться по симптомам, тяжести течения. Возможны разные типы наследования

2. ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Доступна с 9-10 недель беременности

Материал: хорион, плацента, амниоциты, пуповинная кровь

3. Пресимптоматическая диагностика

- Хорея Гентингтона
- Миотоническая дистрофия
- Болезнь Альцгеймера (семейные формы)

- Начало в среднем в 3м 10летии жизни
- Инвалидизация, гибель через 10-15 лет
- Лечения на настоящий момент не существует

Пресимптоматическая диагностика проводится

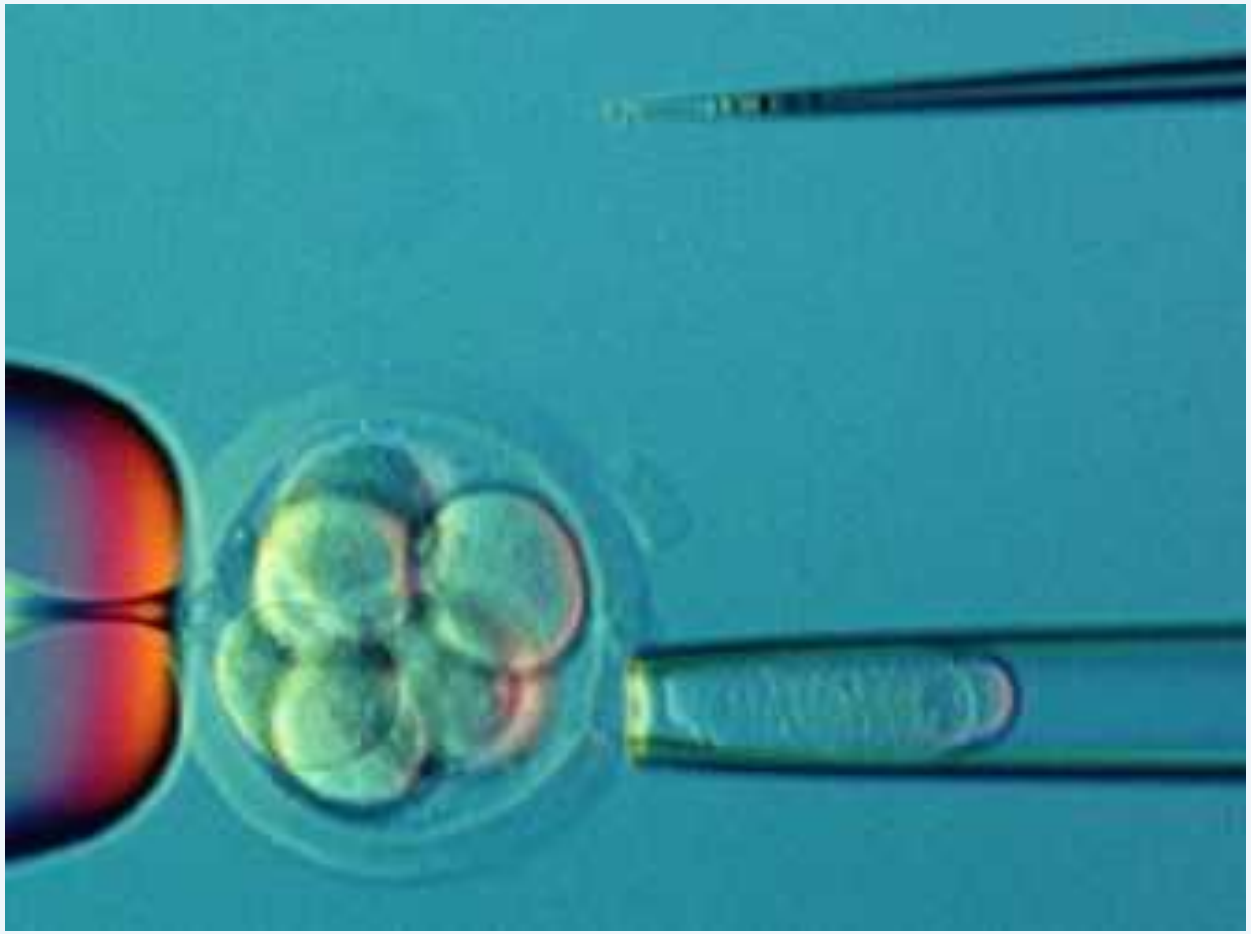
- На основе принципа информированного согласия
- Добровольно
- Только совершеннолетним при личном обращении
- Результаты конфиденциальны

4. Выявление гетерозиготного носительства, прогноз риска

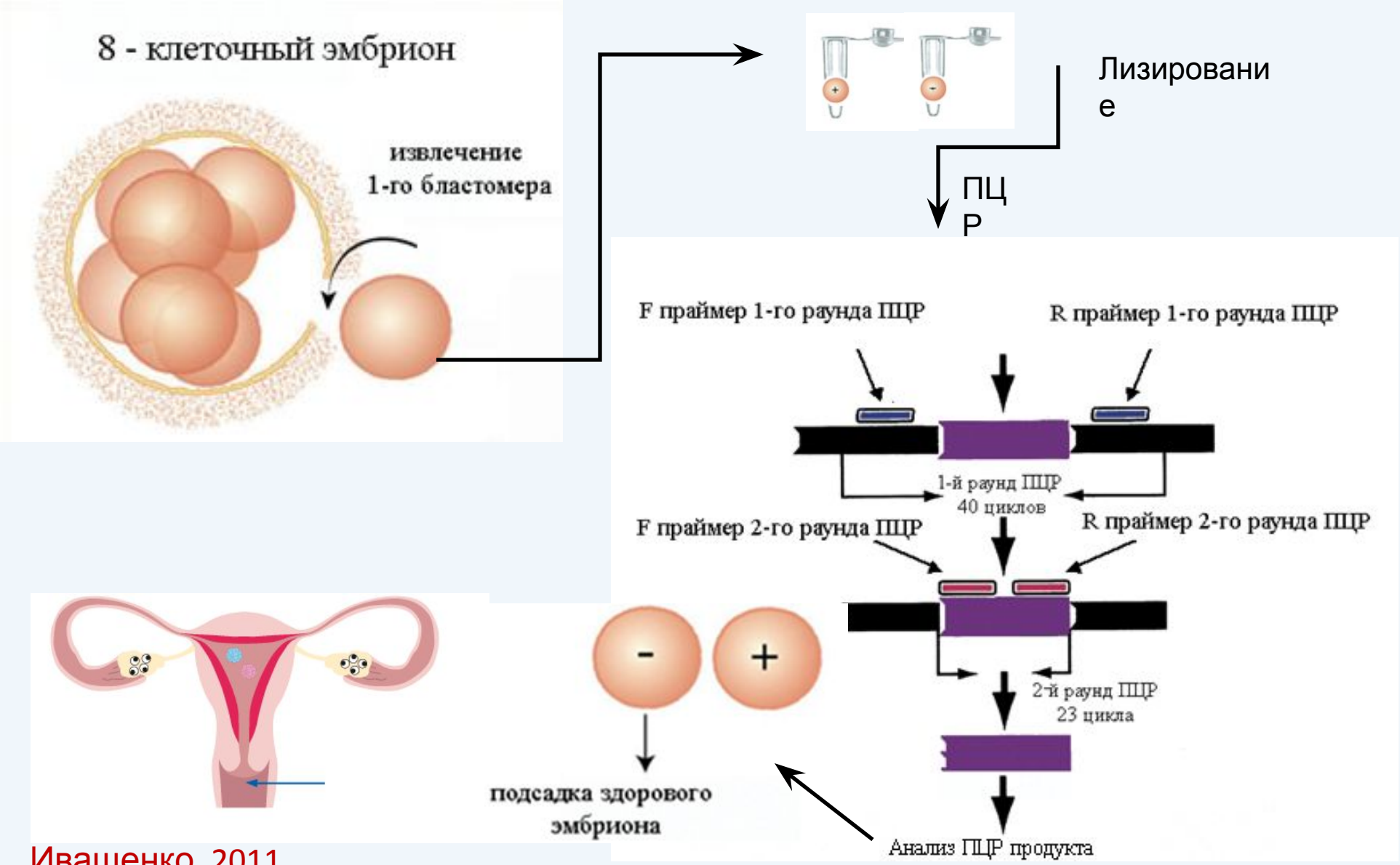
Кому нужно

- Семьям, имеющим больных детей
- Семьям, имеющим больных родственников
- Родителям больных детей в повторном браке
- Кровным родственникам, вступающим в брак
- Всем желающим

5. Преимплантационная диагностика



Принципиальная схема предимплантационной диагностики генных болезней



Иващенко, 2011

6. Неинвазивная диагностика

- Использует клетки плода или ДНК плода, циркулирующие в крови матери
- Доступно с 7й недели беременности
- Можно определить:

  - пол

  - резус-фактор

  - мутации, отсутствующие у матери

Где проводится молекулярная диагностика

Западная Европа

Около 300 лабораторий

Более 400 заболеваний

Каталог лабораторий

www.eddnal.com

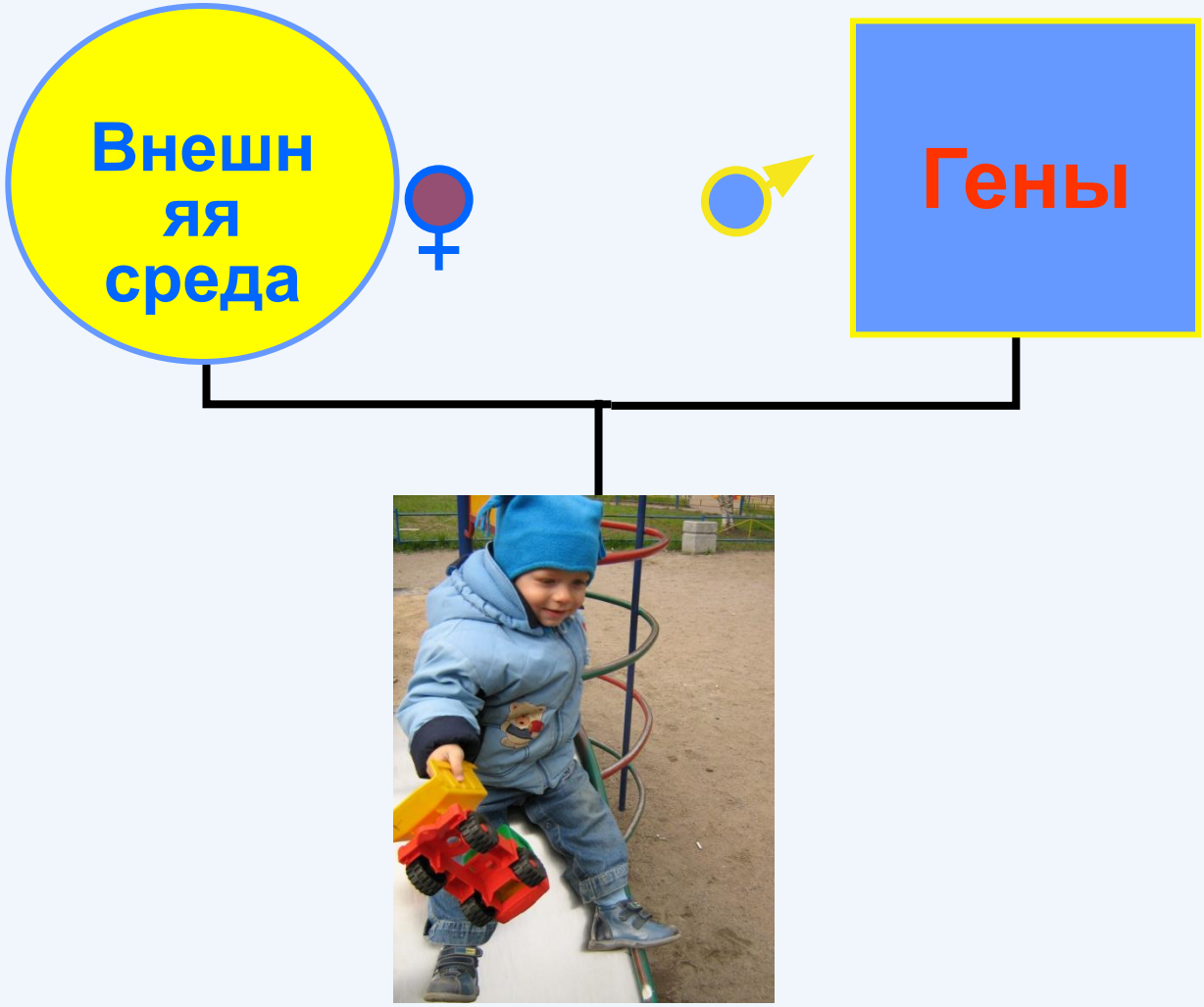
Россия

Федеральные центры

- Лаборатория ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра, Москва
- Лаборатория пренатальной диагностики ИАГ РАМН, СПб
- Лаборатория молекулярной генетики ИМГ, Томск

- Уфимский научный центр РАН, г.Уфа
- Лаборатория ДНК-диагностики, г. Новосибирск

Фенотип - продукт взаимодействия продуктов генов и окружающей среды



Мультифакториальные заболевания

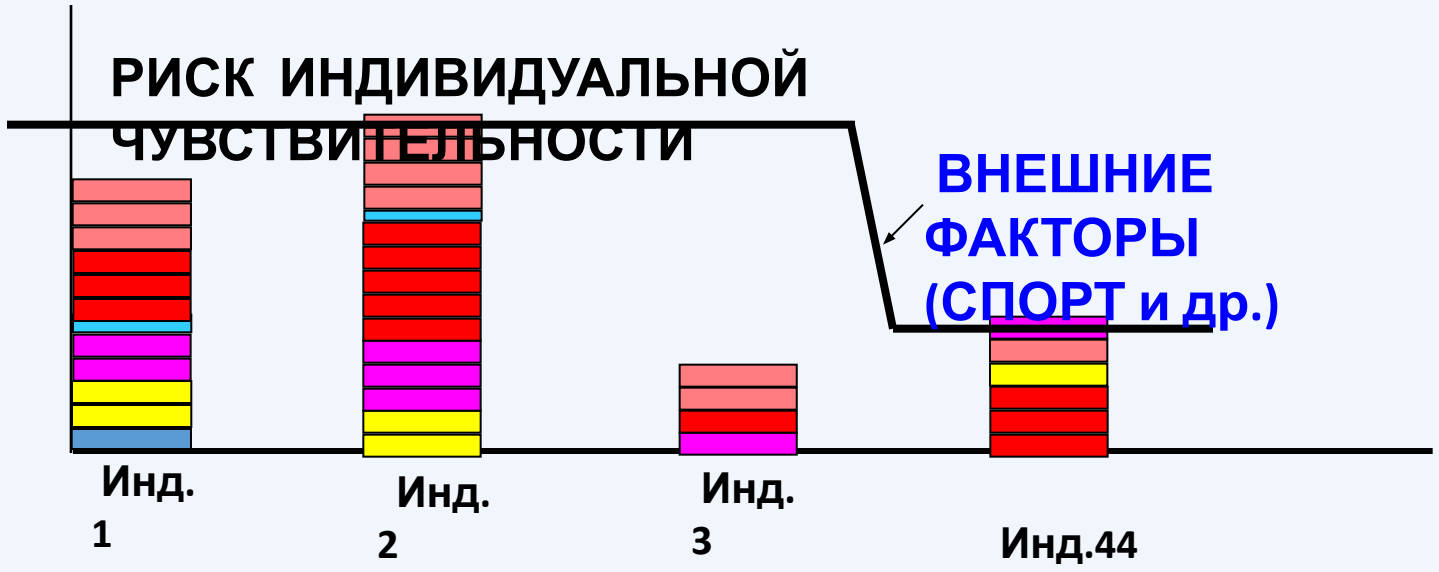
Заболевания органов дыхания ***(бронхиальная астма, хронический бронхит)***

Заболевания костной и соединительной тканей ***(остеопороз, артроз)***

Акушерско-гинекологические патологии ***(эндометриоз, гестоз, привычное невынашивание, плацентарная недостаточность)***

Сердечно-сосудистые патологии (***первичная гипертоническая болезнь у детей***)

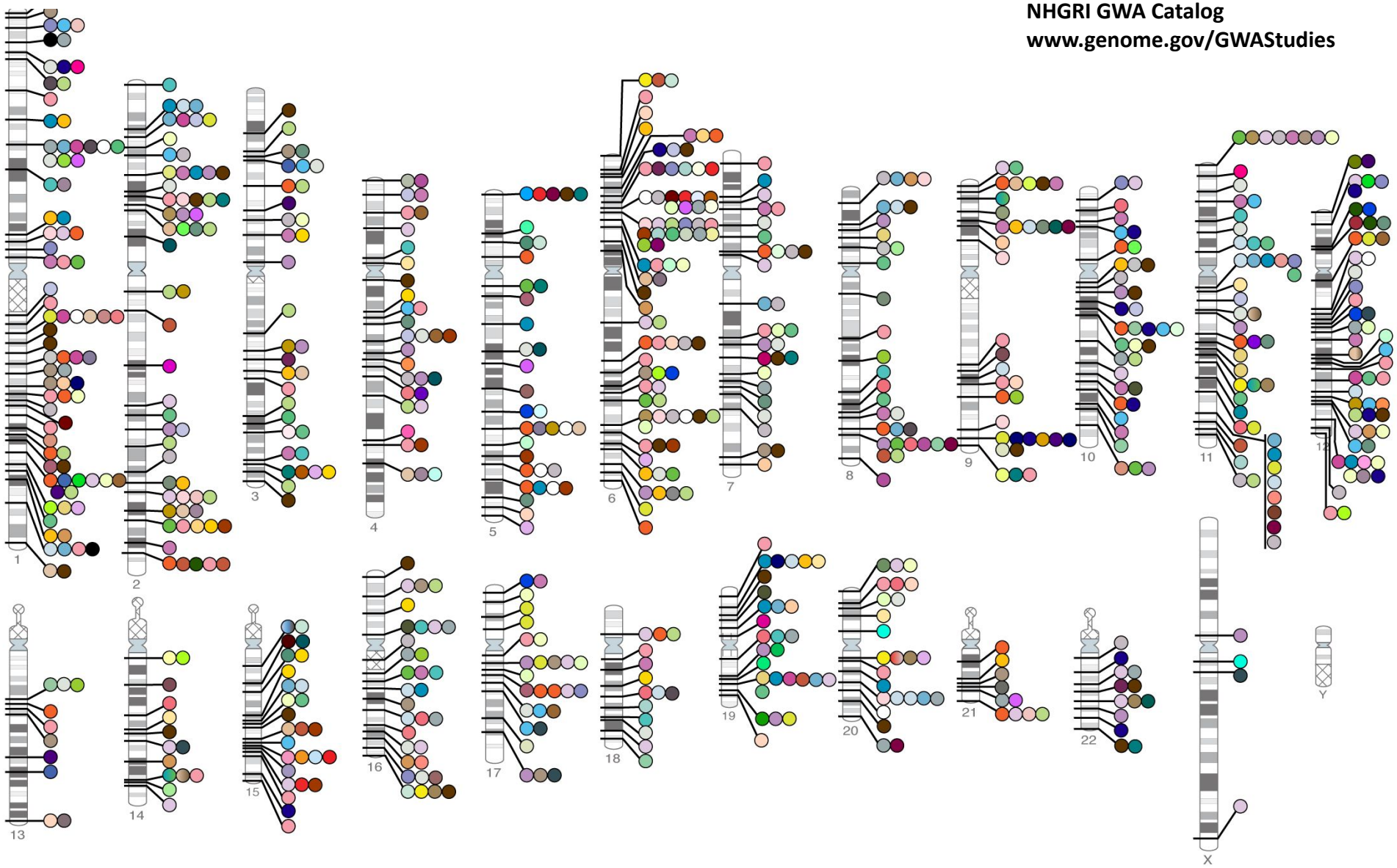
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫМ БОЛЕЗНЯМ



Published Genome-Wide Associations

through 3/2010, 779 published GWA at $p \leq 5 \times 10^{-8}$ for 148 traits

NHGRI GWA Catalog
www.genome.gov/GWAStudies



- Acute lymphoblastic leukemia
- Adhesion molecules
- Adiponectin levels
- Age-related macular degeneration
- AIDS progression
- Alcohol dependence
- Alzheimer disease
- Amyotrophic lateral sclerosis
- Angiotensin-converting enzyme activity
- Ankylosing spondylitis
- Arterial stiffness
- Asthma
- Atherosclerosis in HIV
- Atrial fibrillation
- Attention deficit hyperactivity disorder
- Autism
- Basal cell cancer
- Bipolar disorder
- Bilirubin
- Bladder cancer
- Blond or brown hair
- Blood pressure
- Blue or green eyes
- BMI, waist circumference
- Bone density
- Breast cancer
- C-reactive protein
- Cardiac structure/function
- Carnitine levels
- Carotenoid/tocopherol levels
- Celiac disease
- Chronic lymphocytic leukemia
- Cleft lip/palate
- Cognitive function
- Colorectal cancer
- Coronary disease
- Creutzfeldt-Jakob disease
- Crohn's disease
- Cutaneous nevi
- Dermatitis
- Drug-induced liver injury
- Eosinophil count
- Eosinophilic esophagitis
- Erythrocyte parameters
- Esophageal cancer
- Essential tremor
- Exfoliation glaucoma
- F cell distribution
- Fibrinogen levels
- Folate pathway vitamins
- Freckles and burning
- Gallstones
- Glioma
- Glycemic traits
- Hair color
- Hair morphology
- HDL cholesterol
- Heart rate
- Height
- Hemostasis parameters
- Hepatitis
- Hirschsprung's disease
- HIV-1 control
- Homocysteine levels
- Idiopathic pulmonary fibrosis
- IgE levels
- Inflammatory bowel disease
- Intracranial aneurysm
- Iris color
- Iron status markers
- Ischemic stroke
- Juvenile idiopathic arthritis
- Kidney stones
- LDL cholesterol
- Leprosy
- Leptin receptor levels
- Liver enzymes
- LP (a) levels
- Lung cancer
- Major mood disorders
- Malaria
- Male pattern baldness
- Matrix metalloproteinase levels
- MCP-1
- Melanoma
- Menarche & menopause
- Multiple sclerosis
- Myeloproliferative neoplasms
- Narcolepsy
- Nasopharyngeal cancer
- Neuroblastoma
- Nicotine dependence
- Obesity
- Open personality
- Osteoarthritis
- Osteoporosis
- Otosclerosis
- Other metabolic traits
- Ovarian cancer
- Pain
- Pancreatic cancer
- Panic disorder
- Parkinson's disease
- Periodontitis
- Peripheral arterial disease
- Phosphatidylcholine levels
- Platelet count
- Primary biliary cirrhosis
- PR interval
- Prostate cancer
- Protein levels
- Psoriasis
- Pulmonary funct. COPD
- QRS interval
- QT interval
- Quantitative traits
- Recombination rate
- Red vs.non-red hair
- Renal function
- Response to antipsychotic therapy
- Response to hepatitis C treatment
- Response to statin therapy
- Restless legs syndrome
- Rheumatoid arthritis
- Schizophrenia
- Serum metabolites
- Skin pigmentation
- Speech perception
- Sphingolipid levels
- Statin-induced myopathy
- Stroke
- Systemic lupus erythematosus
- Telomere length
- Testicular germ cell tumor
- Thyroid cancer
- Tooth development
- Total cholesterol
- Triglycerides
- Type 1 diabetes
- Type 2 diabetes
- Ulcerative colitis
- Urate
- Venous thromboembolism
- Vitamin B12 levels
- Warfarin dose
- Weight
- White cell count
- YKL-40 levels

ГЕНЫ «ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ» -

мутантные гены (аллели), совместимые с анте- и постнатальной жизнью человека, приводящие в неблагоприятных условиях к различным заболеваниям.

- Гены системы детоксикации
- Гены рецепторы
- Гены метаболические шунты
- Гены «старения»
- Гены иммунной защиты

- Генные сети мультифакториальных заболеваний

Бронхиальная астма

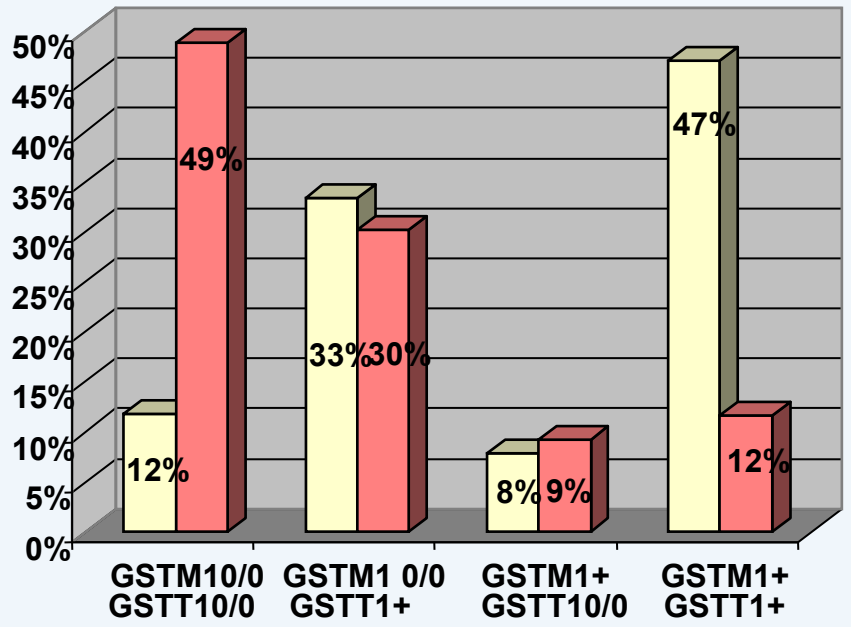
коллекция - 140 образцов (ДНК и фильтры)

Изучаемые гены и полиморфизмы

Гены	Полиморфизмы
Гены «внешней среды»	
GSTM1	0/0
GSTT1	0/0
GSTP1	A , B, C.
NAT2	S1, S2, S3
CYP1A1	Ile/Val полиморфизм
Гены цитокинов	
Il4	590 T-C
Il4-R	
TNF	-238 A-G
α	-308 A-G
Другие гены	
CC16	A38G
ACE	I/D полиморфизм
Nos1	AAT повторы

Научные находки

Распределение генотипов GSTT1 и GSTM1 в контрольной группе и у пациентов БА.



Остеопороз

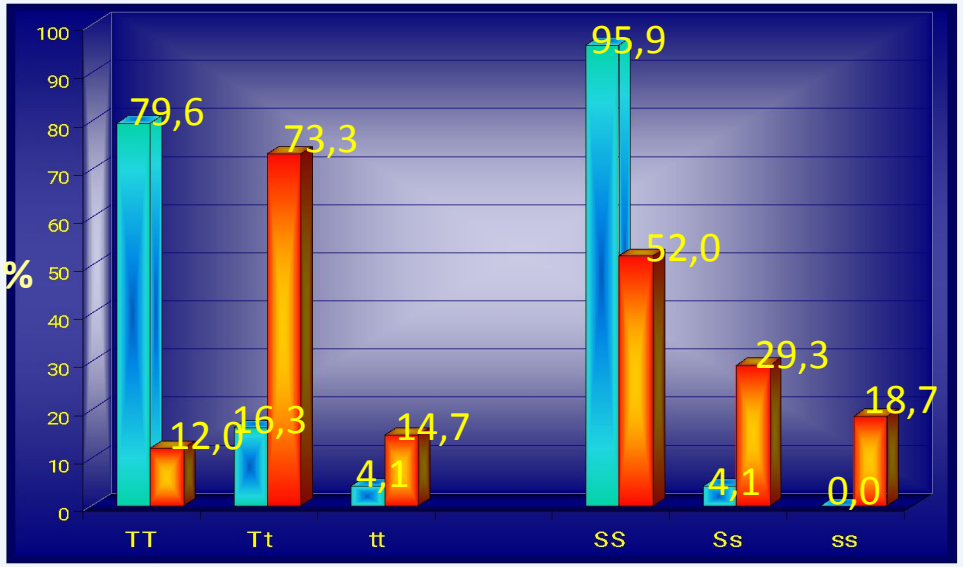
коллекция - 290 образцов (ДНК)

Изучаемые гены и полиморфизмы

Гены	
Гены остеогенеза	Полиморфизмы
Col1a1	G/T
VDR3	RFLP Taq I
CALCR	RFLP Alu I
ER	RFLP Xba I, Pvu II
BGLAP (остеокальцин)	RFLP Hind III

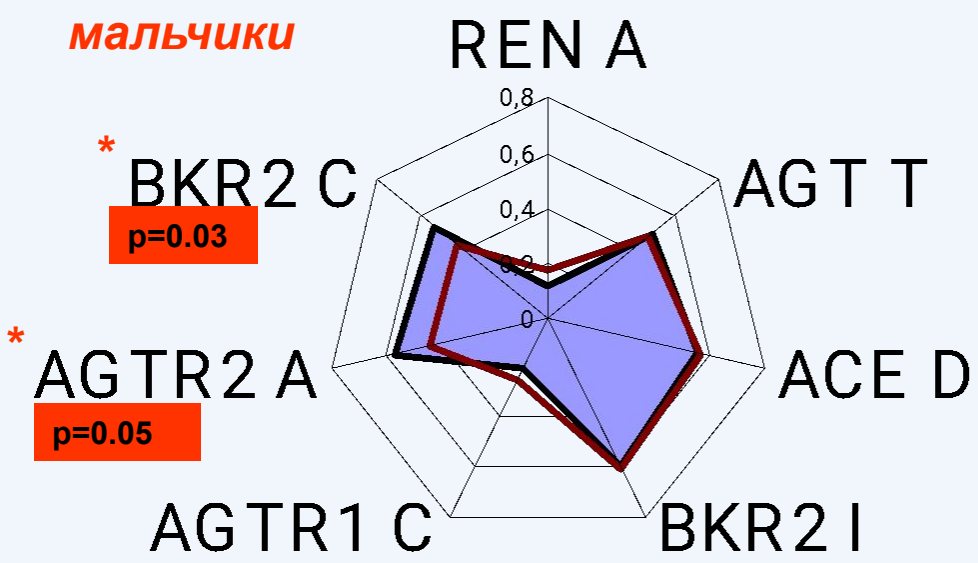
Научные находки

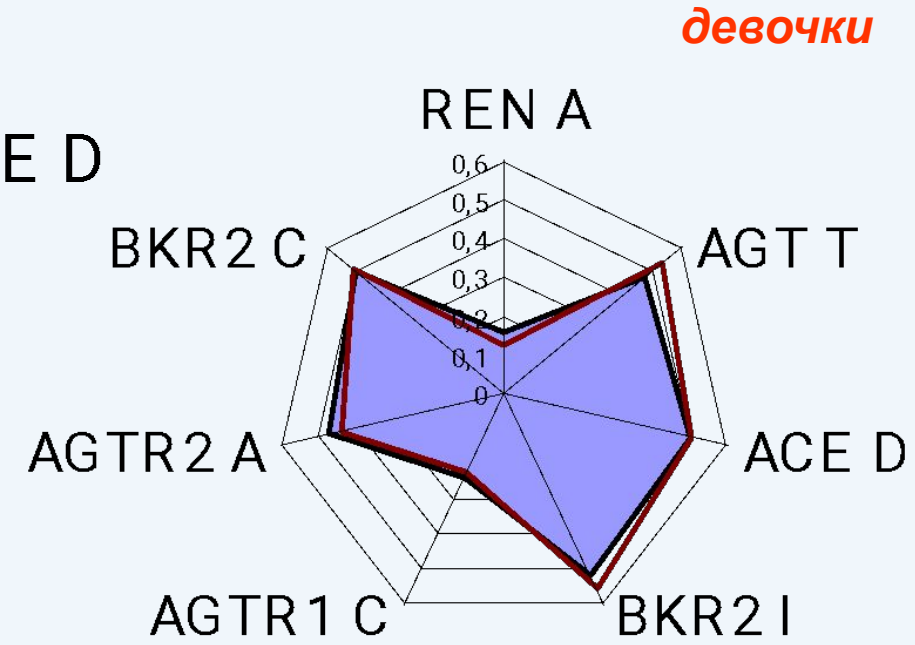
Частоты генотипов по генам Col1a1 и VDR в группе пациенток с медленной ( ) и быстрой потерей МПК ( )



Гены	VDR	Col1a1
КСШ (OR)	7,6	24

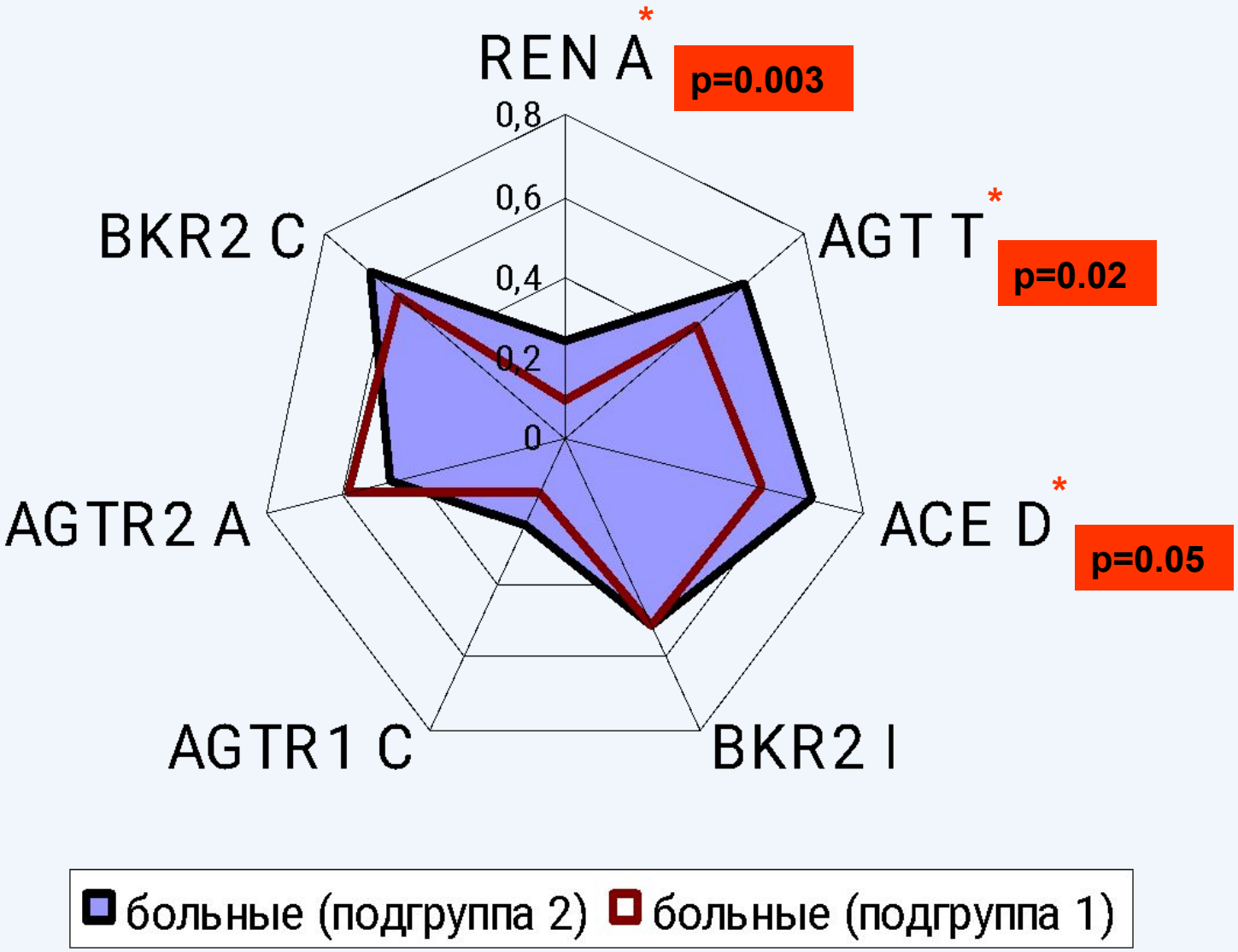
Частоты «мутантных» аллелей изученных генов у больных артериальной гипертензией и в контроле





больные контроль

Частоты «мутантных» аллелей изученных генов у детей, больных артериальной гипертензией (в различных подгруппах)

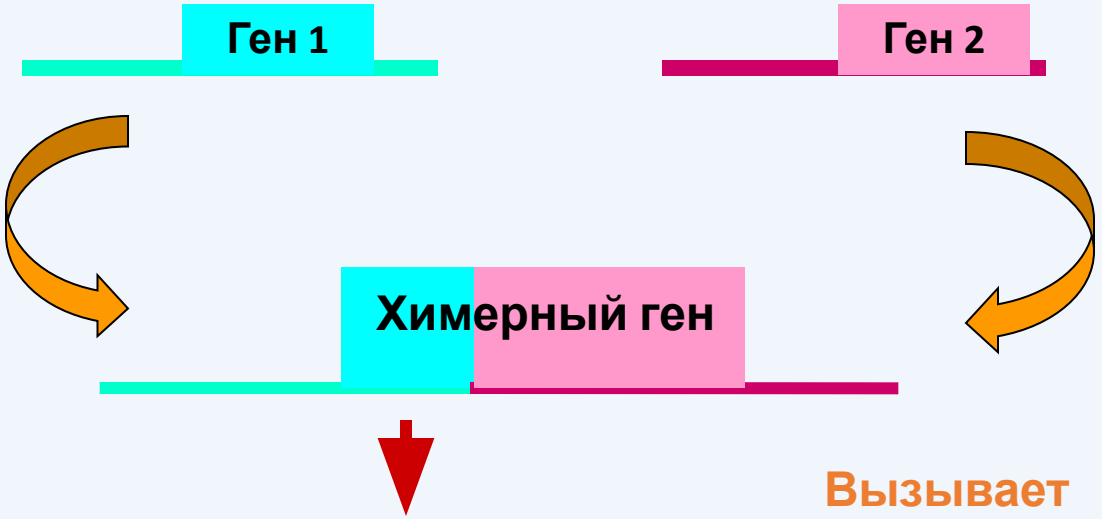


ГЕНЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

BRCA1	BRCA2	CHEK2
Риск в течении жизни **ВС - 60-85%,** **ОС - 15-60%**	**Риск в течении жизни** **ВС - 50-80%,** **ОС - 10-20%**	**Риск возрастает в 2 раза**
>340 мутаций	**>100 мутаций**	**>10 мутаций**
185delAG 300T>G 4153 delA 4158A>G 5382insC	6174delT 695insC	1100delC

ХРОМОСОМНЫЕ ТРАНСЛОКАЦИИ ПРИ ЛЕЙКОЗАХ

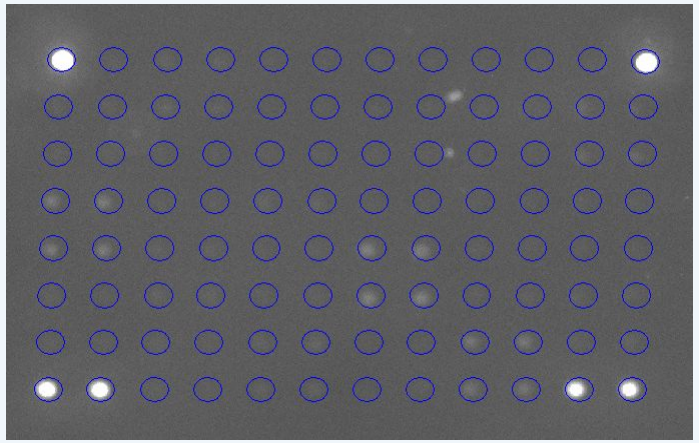
В 40- 50% случаев доказанной причиной развития заболевания являются неслучайные хромосомные перестройки



Химерный онкобелок → **Вызывает неограниченный рост клеток и блокирует созревание**

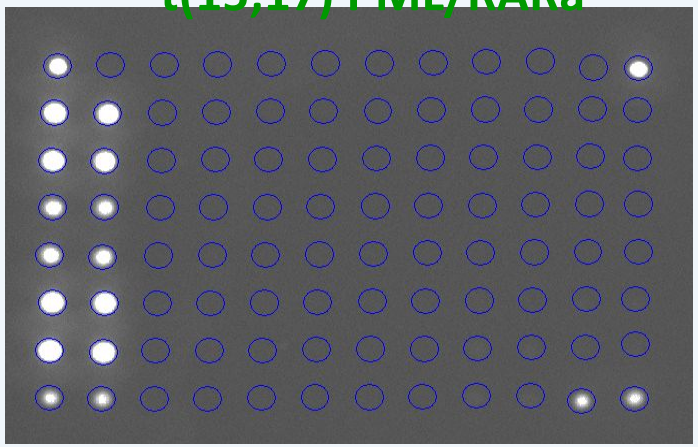
Известно более 50 различных хромосомных перестроек

БИОЧИП ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗОВ



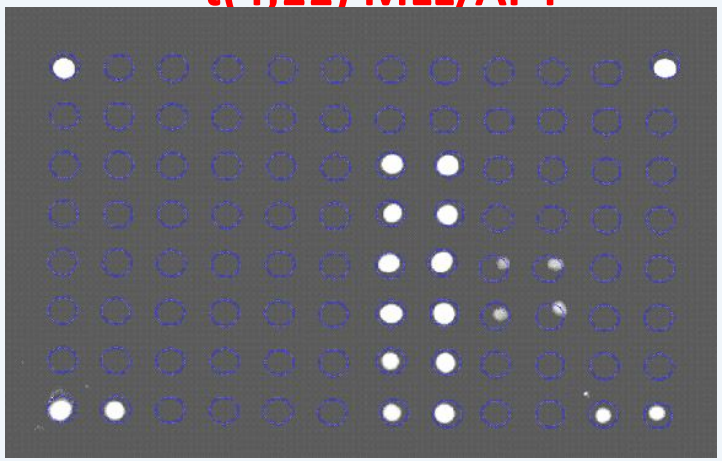
Нормальный образец. Светятся только контрольные ячейки.

Острый промиелоцитарный лейкоз
t(15;17) PML/RARa



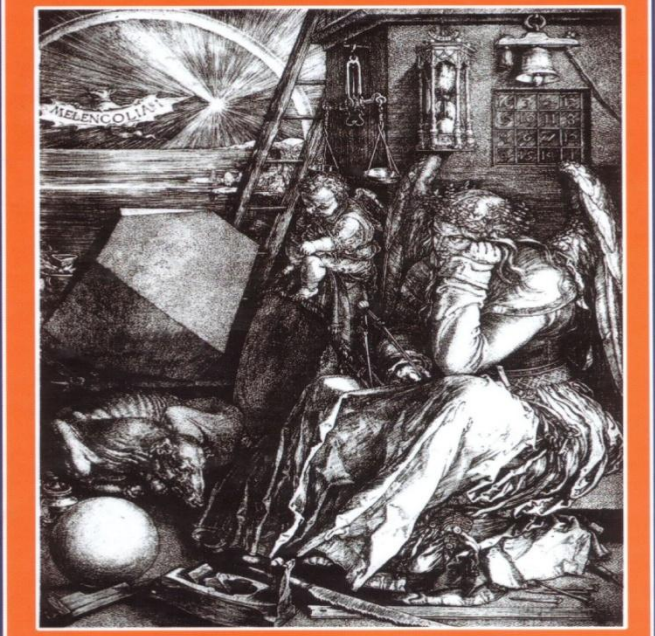
Терапия ретиноевой кислотой. Излечивается около 95%

Острый лимфобластный лейкоз
t(4;11) MLL/AF4



Лечение высокими дозами химиопрепаратов. Без трансплантации костного мозга выживаемость 5-10%

ФАРМАКОГЕНЕТИКА



В. Г. Кукес

МЕТАБОЛИЗМ

лекарственных средств: клинико–фармакологические аспекты

- ЛС неэффективны у 10-40% пациентов
- В США ежегодно умирает 100 000 и более 2 млн госпитализируются по поводу нежелательных лекарственных реакций.

Причины межиндивидуальных различий фармакологического ответа

- возраст
- пол
- функциональное состояние органов и систем (ЖКТ, печени, почек, крови и др.)
- этиология и характер течения заболевания
- сопутствующая терапия (в т.ч. медикаментозная)
- ***генетические различия*** (20-95% всех неблагоприятных ответов)

ФЕНОТИПИРОВАНИЕ И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

НЕДОСТАТКИ:

-нежелательные реакции

-инвазивность

-периодичность и плавающие показатели

-нескрининговые методы

ПРЕИМУЩЕСТВА:

-не нужно применять ЛС

-проводится 1 раз

-не изменяется во времени

-скрининг возможен

ФАРМАКОГЕНЕТИКА

Первые данные:

Примахин – гемолиз эритроцитов – глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа (1956)

Сукцинилхолин – остановка дыхания -псевдохолинэстераза (1957)

Изониазид – побочные реакции – N-ацетилтрансфераза (1957)

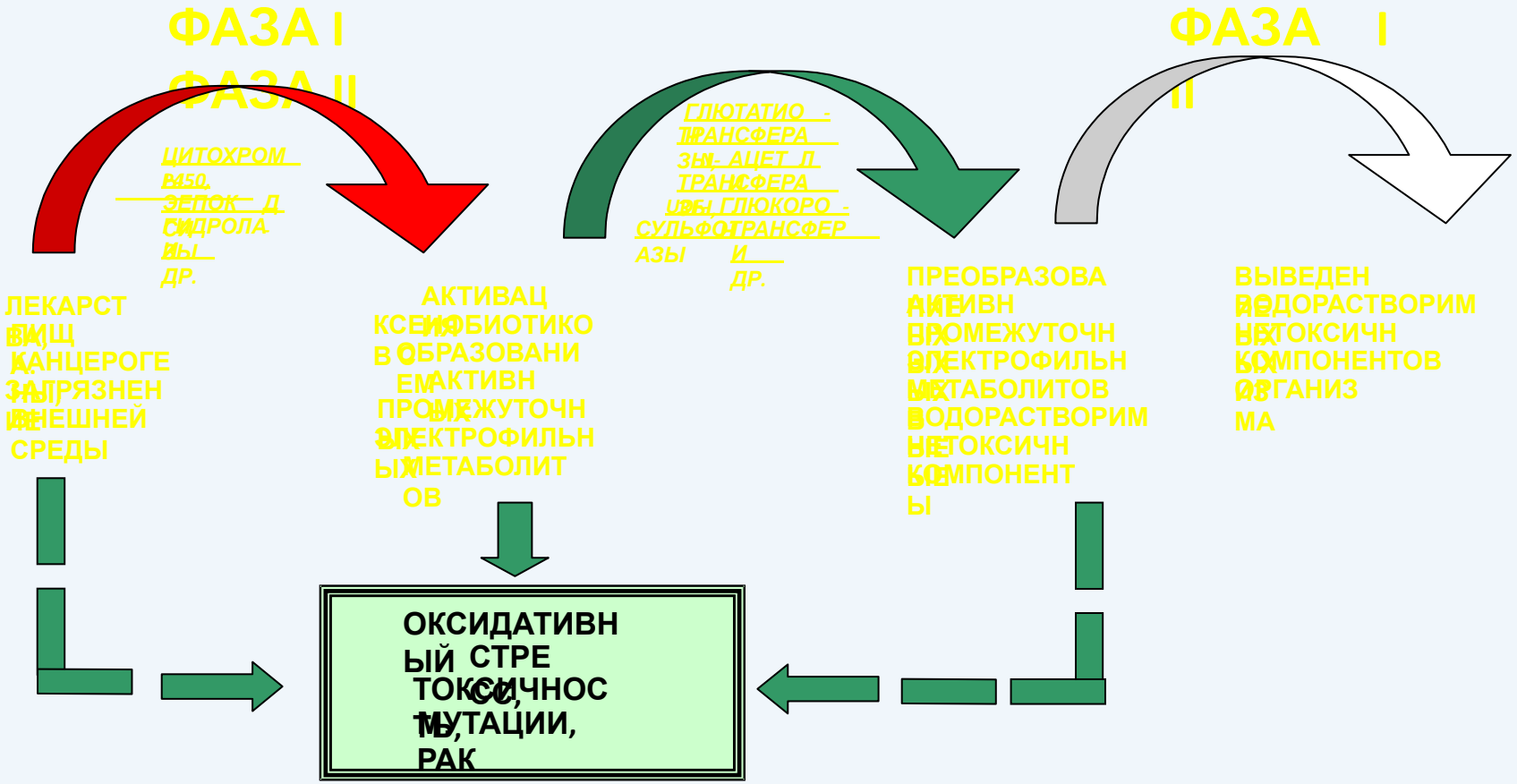
Термин предложен в 1959 г. F.Vogel

Главные причины фармакогенетических различий:

Полиморфизм генов, контролирующих:

- метаболизм лекарственных средств
- Транспортные системы лекарств
- Молекулярные точки приложения лекарств (мишени)

ОСНОВНЫЕ ФАЗЫ ДЕТОКСИКАЦИИ



Совместное функционирование всех фаз детоксикации обеспечивает обезвреживание десятков тысяч ксенобиотиков всех химических классов и разных групп, включая канцерогены, мутагены, тератогены, пестициды, промышленные и сельскохозяйственные яды, пищевые добавки, красители и т.д.

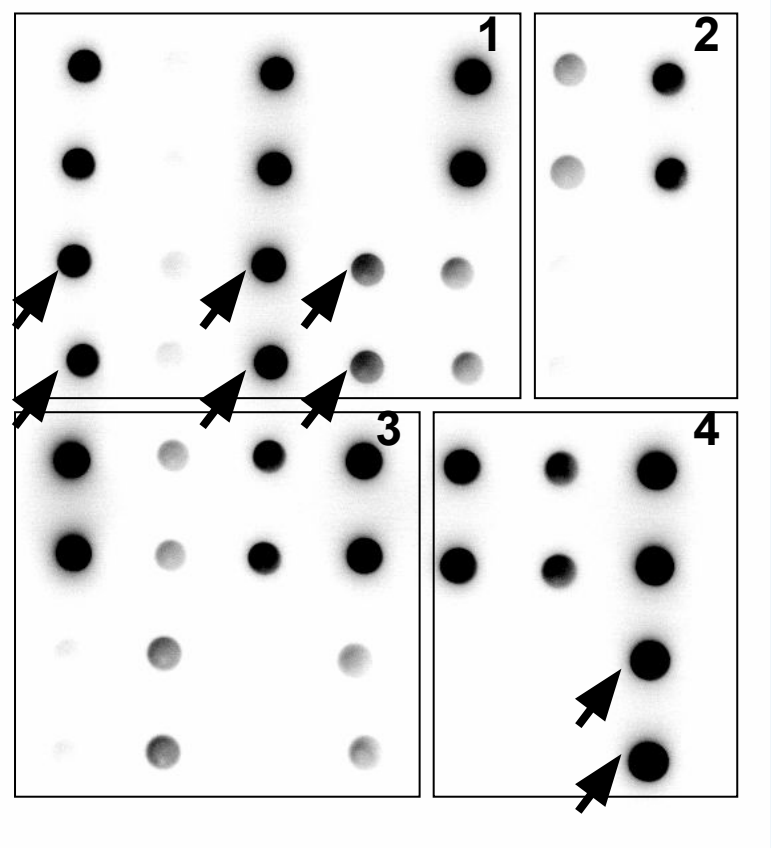
Метаболизм ЛС

- Все ксенобиотики, в том числе и ЛС, имеют ограниченное число путей метаболизма
- Всего около 100 ферментов, 30 генов имеют полиморфные аллели
- Существуют «быстрые», «нормальные» и «медленные» полиморфные варианты

Субстратная специфичность цитохромов P450

- CYP2D6 Амитриптилин, клозапин, кодеин, галоперидол, имипрамин, лидокаин, лоратодин, метопролол, пропафенон, пропранолол и др.
- CYP1A2 Ацетаминофен, кофеин, тамоксифен, эстрадиол, теофиллин, фенацетин и др.
- CYP2C9 Диклофенак, напроксен, фенитоин, пироксикам, тамоксифен и др.
- CYP2C19 Амитриптилин, диазепам, имипрамин, индометацин, омепразол, папаверин, пропранол, триметадон и др.

ПРИМЕР ГИБРИДИЗАЦИИ НА “ФАРМАГЕН - БИОЧИПЕ”

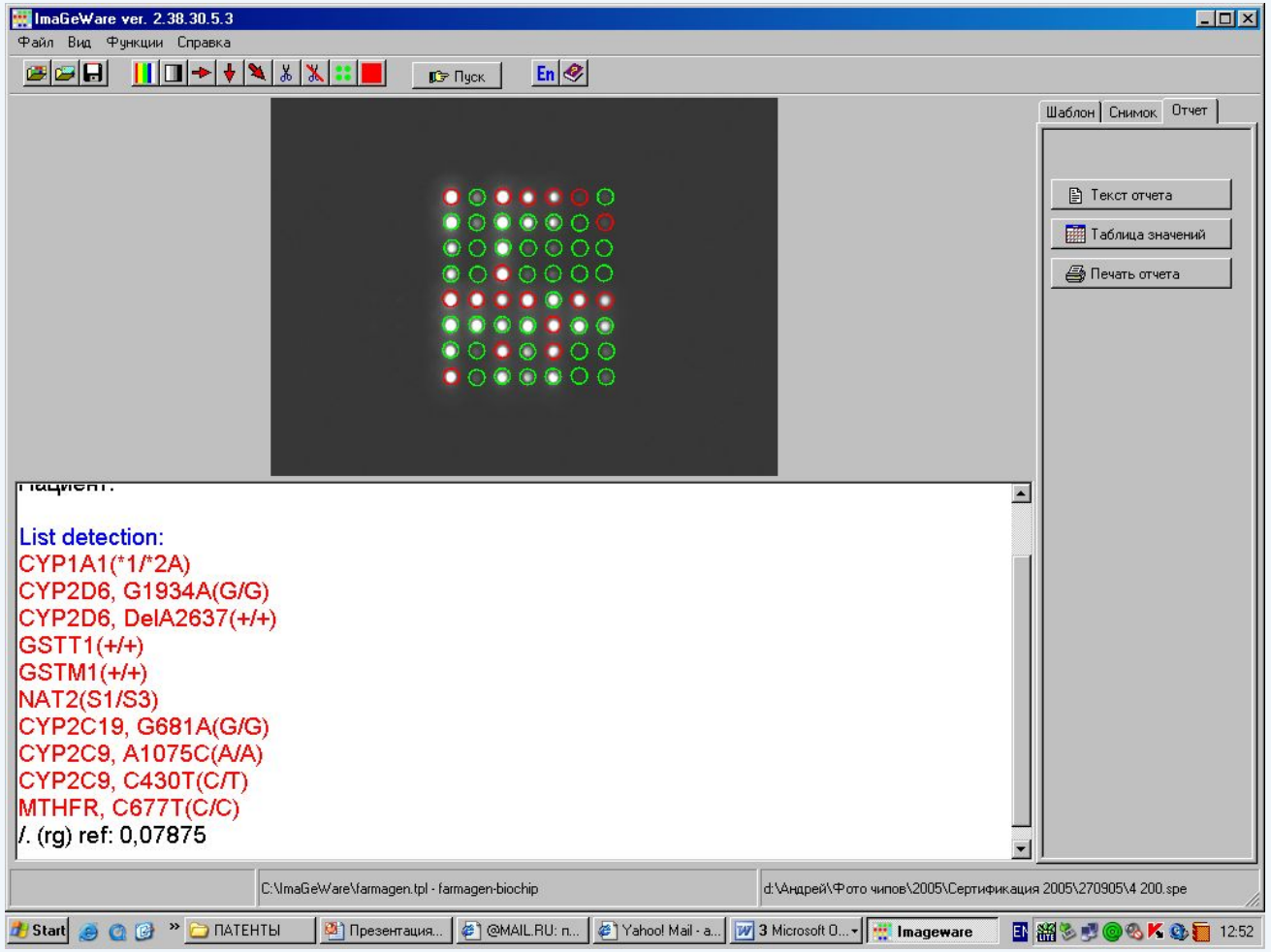


Генотип:

CYP1A1 (*2B/*1),
CYP2D6 (*4/*4),
GSTT1 (+/+),
GSTM1 (+/+),
NAT2 (S2/N),
MTHFR (C/C),
CYP2C9 (*1/*1),
CYP2C19 (*2/*1)

Стрелками указаны обнаруженные “мутантные” варианты

АНАЛИЗ ГИБРИДИЗАЦИИ НА БИОЧИПЕ С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММЫ ImageWare



Полиморфизм гена CYP2C9 и терапевтическая доза (мг/сутки).

C.R.Lee et all. 2002. Pharmacogenetics.

Выборка	Генотип					
	*1*1	*1*2	*1*3	*2*2	*2*3	*3*3
794	5.28	4,59	3,78	3.04	3.52	0,5

WARFARINDOSING

www.WarfarinDosing.org

- Warfarin Dosing
- Clinical Trial
- Outcomes
- Hemorrhage Risk
- Patient Education
- Contact Us
- References
- Glossary
- About Us

User:
Patient:
Version 2.42
Build : Feb 05, 2014

Required Patient Information

Age: Sex: -Select- Ethnicity: -Select-

Race: -Select-

Weight: lbs or kgs

Height: (feet and inches) or (cms)

Smokes: -Select- Liver Disease: -Select-

Indication: -Select-

Baseline INR: Target INR: Randomize & Blind

Amiodarone/Cordarone® Dose: mg/day

Statin/HMG CoA Reductase Inhibitor: -Select-

Any azole (eg. Fluconazole): -Select-

Sulfamethoxazole/Septra/Bactrim/Cotrim/Sulfatrim: -Select-

Genetic Information

VKORC1-1639/3673: Not available/pending

CYP4F2 V433M: Not available/pending

GGCX rs11676382: Not available/pending

CYP2C9*2: Not available/pending

CYP2C9*3: Not available/pending

CYP2C9*5: Not available/pending

CYP2C9*6: Not available/pending

Accept Terms of Use

> ESTIMATE WARFARIN DOSE

СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА

- Идентификация личности
- Установление кровного родства

Метод ДНК-фингерпринт

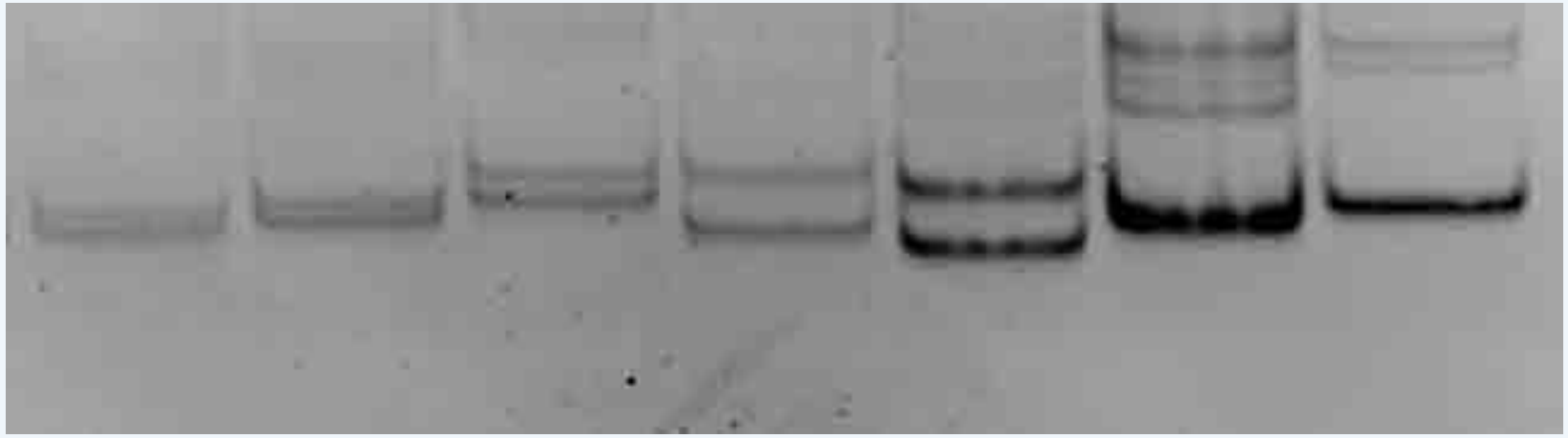
ДНК-дактилоскопия, метод «отпечатков пальцев ДНК»

Предложен в 1987 году

Недостатки

- Трудоемкий и капризный
- Требуется большое количество ДНК
- Сложная система контроля

Принцип идентификации личности: анализ локусов, содержащих STR (короткие тандемные повторы)



Количество локусов (STR), необходимое для идентификации личности

- Минимум – 4-5 локусов
- Стандарт CODIS (США) – 7 локусов
- Стандарт CODIS в случае особой важности – 14 локусов
- Всего известно около 30 000 локусов, содержащих STR

Два этапа ДНК-диагностики в судебно-медицинской экспертизе

- Выявление совпадений

Если совпадения выявлены, то необходим:

- Расчет вероятности того, что совпадение не случайно

Необходимый предварительный этап -

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ STR-ЛОКУСОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ЭКСПЕРТИЗЫ

ПОЗВОЛЯЕТ ОЦЕНИТЬ ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЕЙ, И, СЛЕДОВАТЕЛЬНО, ГЕНОТИПОВ, В ПОПУЛЯЦИИ

Необходимая точность

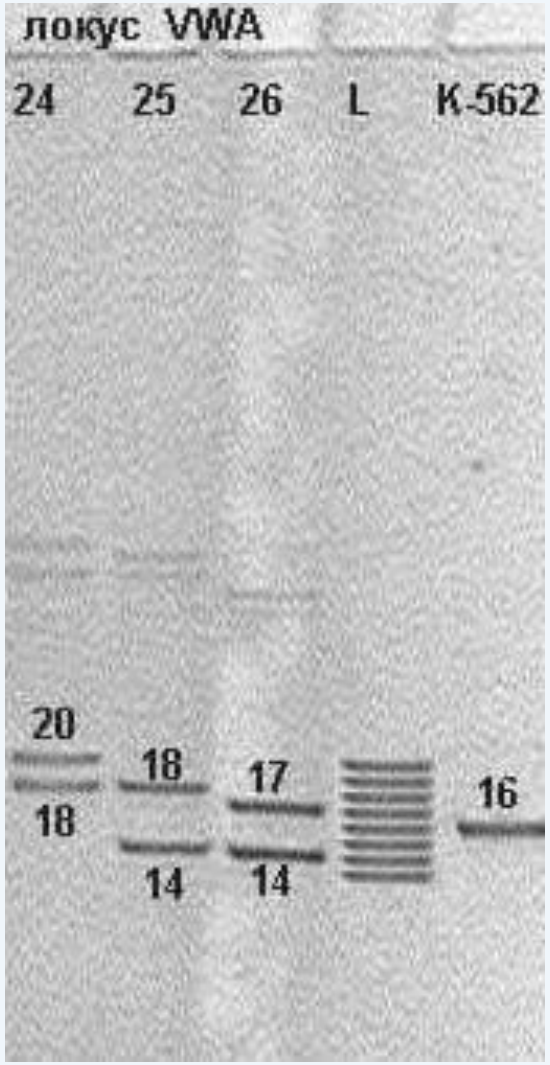
99,98%- точность идентификации

0,02% или

1 из 5 000 – вероятность случайного совпадения

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРОВНОГО РОДСТВА

- В 95% случаев – вопросы спорного отцовства


локус VWA
24
25
26
L
K-562
20
18
18
14
17
14
16

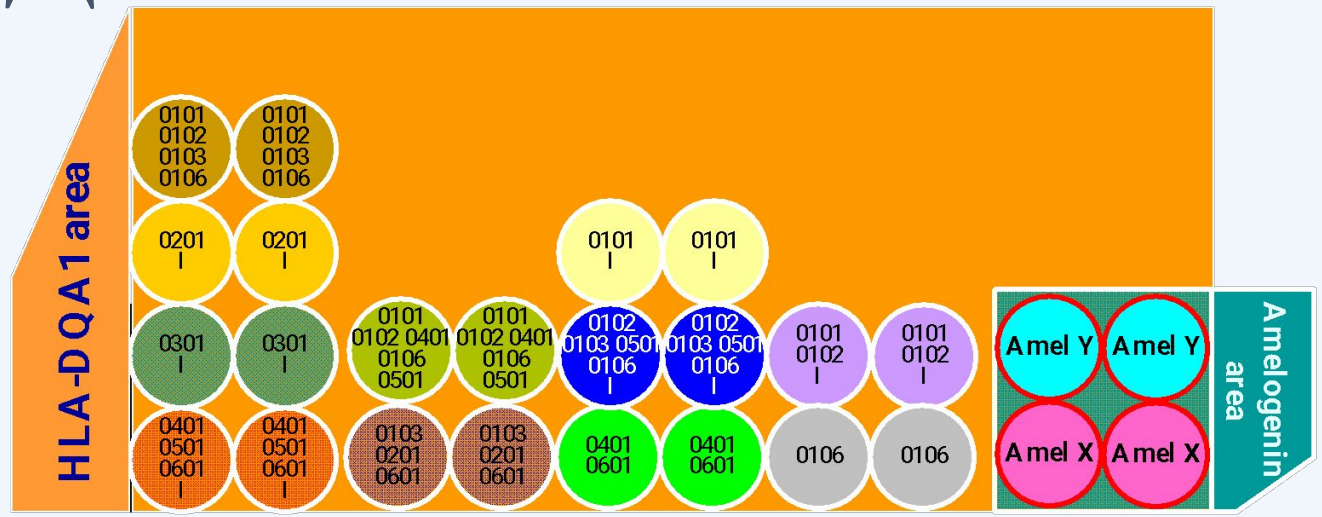
Правила опровержения

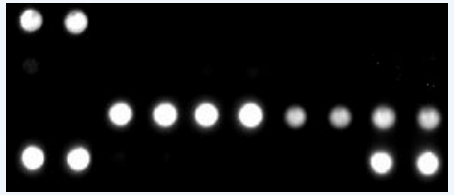
- Для опровержения отцовства в геноме ребенка и предполагаемого отца должно быть выявлено несовпадение по крайней мере по двум локусам

Необходимая точность

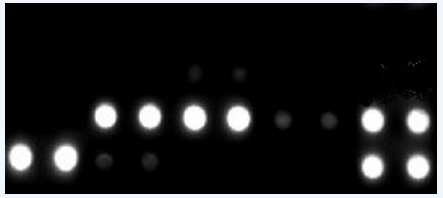
99,75% - «отцовство практически доказано»

ГЕНОМНАЯ ДАКТИЛОСКОПИЯ НА

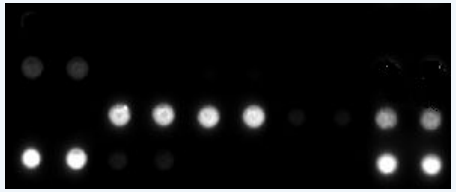




A). Субъект 1.
генотип *HLA- DQA1**102/ 501, *AMEL XY*



B). Субъект 2.
генотип *HLA- DQA*1*501/ 501**,** *AMEL XY*



C). Кровь с поверхности ножа
генотип *HLA- DQA1**501/ 501, *AMEL XY*
принадлежит субъекту 2

Генетика и фенотип

Генетика обуславливает многие количественные и качественные признаки человека

Наследуемость признаков составляет:

Рост – 80-85%
Масса тела – 70-80%
Цвет глаз, кожи, волос – 95-99%
Форма ушей – 98%
Сахарный диабет – 60%

Артериальное давление – 40-45%
Уровень липидов – 60-80%
Выносливость – 65%
Быстрота – 80%
Интеллект – 70%

Генетические маркеры цвета глаз

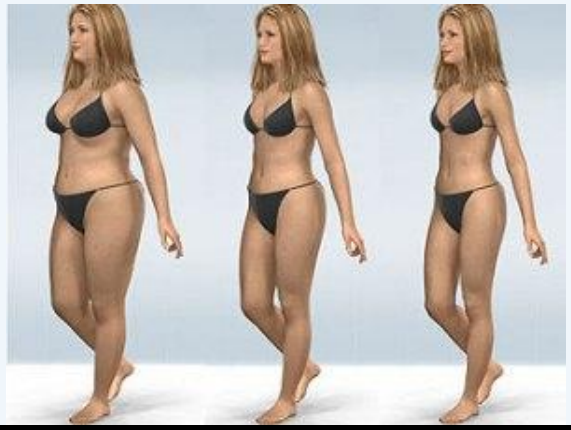
Ученые из медицинского центра Роттердамского университета (Erasmus University Medical Center Rotterdam) проанализировали 37 SNP из 8 генов у 6000 коренных жителей Роттердама (Liu et al., 2009). 67.6% из них имели голубые глаза, 22.8% - карие, 9.6% - промежуточный цвет глаз. В итоге были отобраны лишь 6 наиболее значимых замен в 6 генах. Все эти гены кодируют белки, отвечающие за производство составляющих радужной оболочки глаза, кожи и пигментов волос (эумеланин и феомеланин).

Ген	SNP
HERC2	rs12913832
OCA2	rs1800407
SLC24A4	rs12896399
SLC45A2	rs16891982
TYR	rs1393350
IRF4	rs12203592

Тестирование этих генов позволяет предсказать карий цвет глаз с вероятностью 93%, голубой — 91%, промежуточный цвет - 73%.

Генетические маркеры веса человека

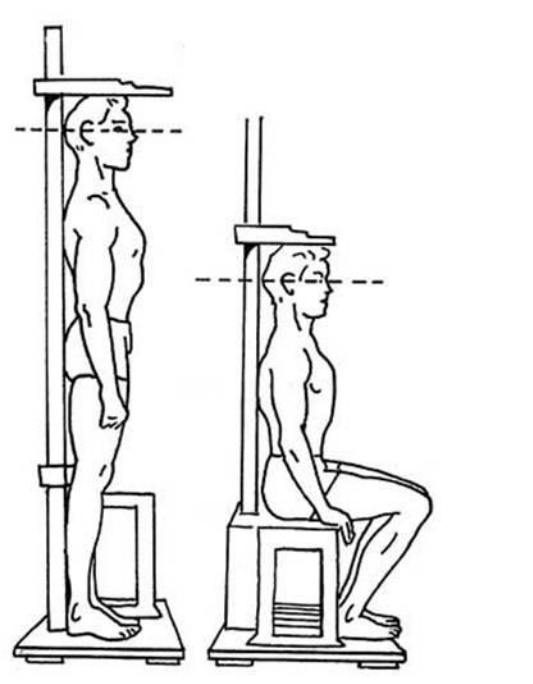
Вес (масса) тела - один из важнейших показателей физического состояния человека. Полногеномные исследования позволили выявить целый ряд локусов на различных хромосомах ответственных за ожирение. Например:



Ген	Функция продукта гена	SNP
MGAT1	Участвует в метаболизме углеводов, необходим для преобразования маннозы.	rs12517906
FTO	Участвует в регуляции глобального обмена веществ, расхода энергии и энергии гомеостаза. Также участвует в регуляции размеров тела и накопления жировых отложений.	rs8050136
		rs6499640
TMEM18	Участвует в клеточной миграции, усиливает миграционную способность нервных стволовых клеток и нейронных клеток-предшественников.	rs7561317
MC4R	Вовлечен в спектр физиологических функций, в т.ч. энергетический гомеостаз, обмен веществ, пигментация, воспаление.	rs12970134
…		

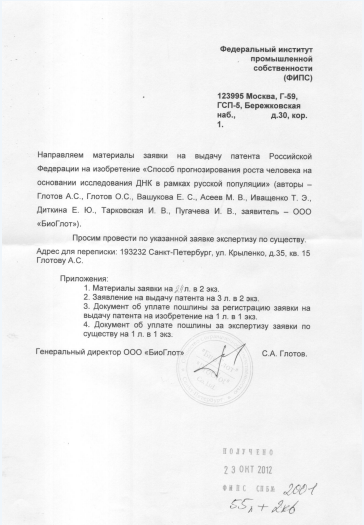
(по Thorleifsson et al., 2009)

Способ прогнозирования роста человека на основании исследования ДНК в рамках русской популяции



$Y_{рост\ мужчины}=176{,}17+3{,}01*X_1-1{,}95*X_2-1{,}73*X_3$, где $X_1=0$ (при генотипе 1 по гену *1*), $X_2=0$ (при генотипе 1 по гену *2*), $X_3=0$ (при генотипе 1 по гену *3*).
Т.е. $Y=176{,}17+3{,}01*0-1{,}95*0-1{,}73*0=176{,}17$.
Прогнозный рост для индивида X составляет 176,17 см$\pm$ 4,6 см.

Параметр/ Характеристики	Мужчины/рост		Женщины/рост	
	стоя	сидя	стоя	сидя
Скорректированный коэффициент детерминации (adjusted R-squared)	**0,109**	0,127	0,013	0,006
Средняя ошибка, см	4,6	2,9	4,6	2,8



Федеральный институт промышленной собственности (ФИПС)

123995 Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., д.30, кор. 1.

Направляем материалы заявки на выдачу патента Российской Федерации на изобретение «Способ прогнозирования роста человека на основании исследования ДНК в рамках русской популяции» (авторы – Глотов А.С., Глотов О.С., Вашукова Е. С., Асеев М. В., Иващенко Т. Э., Диткина Е. Ю., Тарковская И. В., Пугачева И. В., заявитель – ООО «БиоГлот»).

Просим провести по указанной заявке экспертизу по существу.

Адрес для переписки: 193232 Санкт-Петербург, ул. Крыленко, д.35, кв. 15 Глотову А.С.

Приложения:
1. Материалы заявки на 22 л. в 2 экз.
2. Заявление на выдачу патента на 3 л. в 2 экз.
3. Документ об уплате пошлины за регистрацию заявки на выдачу патента на изобретение на 1 л. в 1 экз.
4. Документ об уплате пошлины за экспертизу заявки по существу на 1 л. в 1 экз.

Генеральный директор ООО «БиоГлот» С.А. Глотов.

ПОЛУЧЕНО
23 ОКТ 2012
ФИПС СПбК 280-1
65л + 2кб

СПОРТИВНАЯ ГЕНЕТИКА

Гены энергетического обмена
-регуляция углеводного обмена
-регуляция липидного обмена
-регуляция термогенеза

Гены, ассоциированные с композитным составом мышечных волокон и силой сжатия кисти

Гены метаболизма костной ткани

Гены, обуславливающие антропометрические данные человека

Гены, ассоциированные с остротой зрения и заболеваниями органов зрения

Гены метаболизма ксенобиотиков

Гены сердечнососудистой системы
- гены регуляции артериального давления
- гены тромбофилии
-гены «патологической гипертрофии»
- гены регуляции роста сосудов

Гены мотивации и стрессоустойчивости

Что важно для экстремального спорта:

I. **ЗДОРОВЬЕ**
II. **ПРАВИЛЬНОЕ ЛЕЧЕНИЕ**
III. ИНДИВИДУАЛЬНАЯ МОТИВАЦИЯ
IV. *РАЦИОНАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ*
V. *ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЖИМА ТРЕНИРОВОК*

Генетические маркеры кардиопатологий

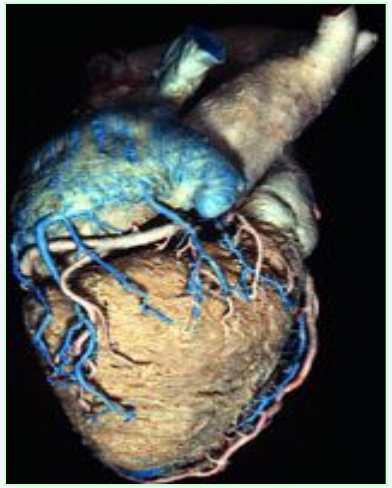
Гены, продукты которых отвечают за энергетический обмен:
PPARA, PPARD, PRARG, UCP2, UCP3, PPARGC1A (PGC-1α)

Ген, ответственный за рост миокарда:

PPP3R1 (CnB)

Гены, продукты которых отвечают за метаболизм липидов:

APOA, APOCIII, APO(a), APOB, APOE, PON1, rLDL, LPL **и др.**



Гены, продукты которых отвечают за синтез и активность факторов свертывания крови и фибринолиза:

F5, F7, F1, F2, **рецепторы тромбоцитов** ***(GP3a, GPIa), PLAT, PAI1*** **и др.**

Гены, продукты которых отвечают за сокращение сосудов и гены ренин-ангиотензиновой-системы:
NOS3, EDN1, EDNRA, MTHFR, MTRR, ADRB2, ADRB1, REN, AGT, ACE, AGT2R1, AGT2R2, BKR2.

Международные рекомендации генетического тестирования на наследственные формы тромбофилии

ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

ИСПОЛНИТЕЛЬНЫЙ КОМИТЕТ
Сто семнадцатая сессия
Пункт 9.1 предварительной повестки дня

EB117/28
8 декабря 2005 г.

Комитеты экспертов и исследовательские группы[1]

Доклад Секретариата

КОМИТЕТ ЭКСПЕРТОВ ВОЗ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Пятьдесят пятый доклад[2]
Женева, 15-18 ноября 2004 г.

Основные рекомендации

1. Комитет экспертов по стандартизации биологических пре
последние достижения в области биологических веществ, исполь
числу которых относятся вакцины, биологические лечебные сред
относящиеся к этой области диагностические средства in vitro.
мероприятия, способствующие принятию рекомендаций по обе
безопасности и эффективности, а также установлению межд
материалов.

2. Использование международных эталонных материалов для о
биологических веществ, используемых в профилактике или
обеспечения надежности контроля качества или методов д
обеспечить сопоставимость данных на международном уровне.
международных совместных лабораторных исследований, Комите
восемь новых или заменяющих международных эталонных мате

9. Утвердив первый в мире международный стандарт для генетического теста на factor V Leiden (генетическая мутация, являющаяся фактором риска в отношении тромбоза), Комитет установил точку отсчета в области методов генетического тестирования. Тест дает возможность получить информацию в отношении предрасположенности к венозному тромбозу и, в конечном итоге, будет полезен для лиц, которые подвержены повышенному риску этой потенциальной опасной для жизни болезни. Новый стандарт поможет получить правильные результаты при проведении этого часто проводимого теста. Для правильного применения и использования этого стандарта проводятся межорганизационные мероприятия.

[1] В соответствии с Положениями о списках экспертов-консультантов и комитетах экспертов, Генеральный директор представляет на рассмотрение Исполкома свой доклад о совещаниях комитетов экспертов, включающий соображения в отношении выводов докладов комитетов экспертов и рекомендаций, касающихся вытекающих из них действий.

[2] Серия технических докладов ВОЗ, No. 932, в печати.

•Что даст экстремальным видам спорта генетическое тестирование?

Медицинское обеспечение и тренировки

Медицинское обеспечение и тренировки + Генетика

Хронически е болезни

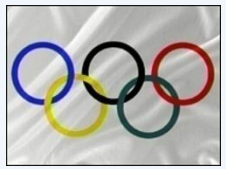
Отсутствие мотивации

Некорректное спортивное питание

Выбран не тот вид нагрузки Некорректны е тренировки

- Исключены (более 99%) риски заболеваний несовместимых с занятием спортом
- Установлены наследственные риски наиболее частых видов спортивного травматизма
- Обоснован выбор вида спорта
- Индивидуальный подход к тренировкам
- Подбор питания согласно особенностям индивидуального метаболизма
- Обоснованная мотивация

Высокие спортивные результаты



ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ

Генетический паспорт - индивидуальная база ДНК-данных, отражающая уникальные генетические особенности каждого человека, его предрасположенность к тем или иным наследственным, мультифакториальным и другим заболеваниям (В.С.Баранов, 2000).

Тестирование генов «предрасположенности» - ***путь к ранней профилактике частых заболеваний*** и ***коррекции образа жизни***

Паспортизация актуальна:

супругам, беременным женщинам, спортсменам, людям экстремальных профессий

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ
СКОРО ПОНАДОБИТСЯ ВСЕМ !

БИОБАНК ???

1. Проблема комплексных исследований в медицине и спорте
2. Проблема хранения биоматериала
3. Проблема наличия биоматериала определенных свойств
4. Проблема информации

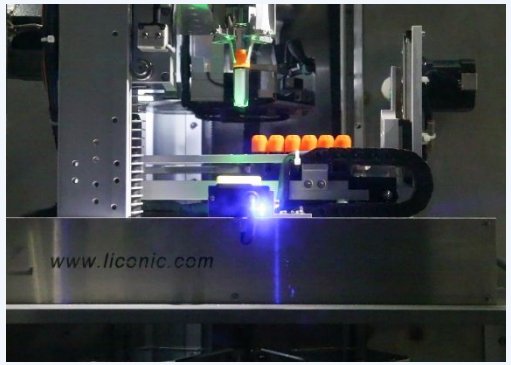
Проблема качества исследования

— Отсутствует систематизированное хранение биоматериала
— Нет гарантии необходимых свойств биоматериала (кровь, слюна)
— Низкое качество ДНК, РНК

До 60-70% всех проблем, возникающих в лабораторной диагностике, связаны с неправильными процедурами во время сбора, обработки, подготовки или хранения образцов. 85% научных медицинских публикаций не имеют доказательной основы.

Образцы:
-«Перезамороженные» несколько десятков раз;
-к которым есть доступ у нескольких сотрудников (каждый не оповещая других может ненадлежащим образом взять материал)

?



Что такое современный Биобанк?

— **криохранилище** любых биологических материалов,

— **центр** клинической, лабораторной и персональной **информации**

— многопрофильная молекулярно-биологическая **лаборатория**

для реализации научных и медицинских целей

Ключевые компоненты биобанкинга

Слайд предоставлен Karine Sargsyan, MD, PhD, COO
Biobank Graz, Medical University of Graz, Austria

Научный парк СПбГУ

Криохранилище

Резервные системы

ИБП

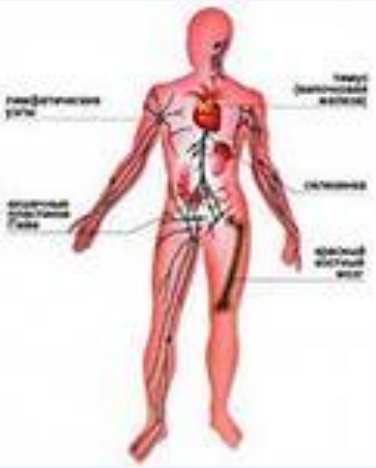
Дизель-генератор

Локальный криотанк (300 л)

Внешний криотанк (3000л)

Криозавод (в радиусе 1 км)

Проекты в концепции трансляционной медицины



Разработка протокола (SOP) и забор биоматериала (с учетом международных стандартов)

Исследование ДНК, РНК, протеомных маркеров

Изучение модельных объектов

Разработка методов лечения и профилактики

Биоинформационный анализ маркеров риска