

А.Г. Жумина

Карагандинский государственный университет им. Е.А. Букетова

Применение полимеразной цепной реакции в медицине

В статье приведены данные о возможностях применения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в медицине. Описаны принцип и преимущества ПЦР как метода диагностики по сравнению с другими методами (ИФА, бакпосев). Определено, что ПЦР применяют в медицине для диагностики инфекционных, наследственных и онкологических заболеваний, а также в персонализированной медицине. В статье рассмотрены возможности применения метода ПЦР для диагностики некоторых бактериальных и вирусных инфекций, передающихся половым путем, гепатитов, а также некоторых наследственных и онкологических заболеваний. Отмечено, что в персонализированной медицине ПЦР применяют для определения индивидуальных различий пациентов в восприимчивости и метаболизме лекарств и их производных.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, ДНК, РНК, праймер, амплификация, денатурация, ренатурация, синтез, диагностика, инфекционные заболевания, клиника, лаборатория, диагностика.

Полимеразная цепная реакция, известная более как ПЦР, не сходит со страниц научных журналов с тех пор, как была открыта Кэри Б.Мюллисом в 1983 г., за что он и был удостоен Нобелевской премии в 1993 г. [1]. Часто ПЦР описывают как метод, с помощью которого ученые могут находить иглу в стоге сена и затем строить стог из этих игл. «Иглою» является крошечный фрагмент генетического материала, а ПЦР не только точно обнаруживает этот фрагмент, но и затем, используя естественное свойство ДНК — репликацию (размножение), делает его копии.

В основе метода ПЦР лежит уникальное свойство НК (как ДНК, так и РНК) — способность к саморепродукции, которая воспроизводится искусственно *in vitro*. При этом синтезируются только строго специфические фрагменты НК. В связи с этим, прежде чем проводить ПЦР, необходимо узнать нуклеотидную последовательность искомой НК. После этого синтезируются два коротких ДНК-зонда или праймера, которые комплементарны соответствующим участкам НК-мишени. Праймер — самый главный элемент в ПЦР, обеспечивающий запуск и специфичность реакции. Таким образом, тест-система для ПЦР состоит из смеси НК испытуемого образца, праймера, дезоксирибонуклеотидов (набора нуклеотидтрифосфатов) и термостабильной ДНК полимеразы (энзима термофильных бактерий *Thermus aquaticus*). Указанную выше реакционную смесь подвергают повторным циклам нагревания/охлаждения для денатурации (при нагревании) НК и гибридизации или отжиге (при охлаждении) праймеров с целью синтеза (с помощью ДНК-полимеразы) новых нуклеиновых кислот.

Типичная ПЦР-амплификация состоит в многократном повторении следующих реакций:

1) *Денатурация*. Первый этап ПЦР состоит в тепловой денатурации образца ДНК выдерживанием его при температуре 95 °С в течение 1 мин. Помимо ДНК, в реакционной смеси содержатся в избытке 2 праймера, термостабильная ДНК-полимераза Taq и 4 дезоксирибонуклеотида.

2) *Ренатурация*. Температуру смеси медленно понижают до 55 °С, при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК.

3) *Синтез*. Температуру повышают до 75 °С величины, оптимальной для ДНК-полимеразы Taq. Начинается синтез комплементарной цепи ДНК, иницируемый 3'-гидроксильной группой праймера [2].

Сама полимеразная реакция проходит автоматически в программируемом термостате — термоциклере (амплификаторе), который может нагревать и охлаждать пробирки с реакционной смесью в очень короткое время. Трехступенчатый цикл, в результате которого получаются точные копии идентифицируемого участка матричной НК, повторяется 30–50 раз, в соответствии с заданной программой термоциклера. В первом цикле происходит первое удвоение фрагмента нити НК, ограниченного праймерами, в последующем реакция приобретает каскадный характер (цепная реакция). Это означает, что каждая из нитей служит матрицей для синтеза (полимеризации) нового участка НК, что позволяет увеличивать число копий амплифицируемого фрагмента НК в геометрической прогрессии. Течение ПЦР аналогично естественной репликации НК, но при этом строго фиксировано искусственно синтезированным праймером.

Преимущества метода ПЦР

Одним из важнейших критериев диагностической эффективности любого лабораторного анализа является показатель «чувствительности». При этом следует различать аналитическую и диагностическую чувствительность (рис.). Аналитическая чувствительность применительно к ПЦР представляет собой то минимальное количество копий (геномных эквивалентов — г/э) ДНК или РНК в одном миллилитре раствора образца, которое может быть определено данной тест-системой. Большинство коммерческих амплификационных тест-систем позволяет обнаружить в биологической пробе искомую НК, если ее концентрация составляет не менее нескольких сот г/э копий в 1 мл образца. Например, аналитическая чувствительность большинства тест-системы для ВИЧ-1 составляет 300–500 копий ДНК в 1 мл образца.

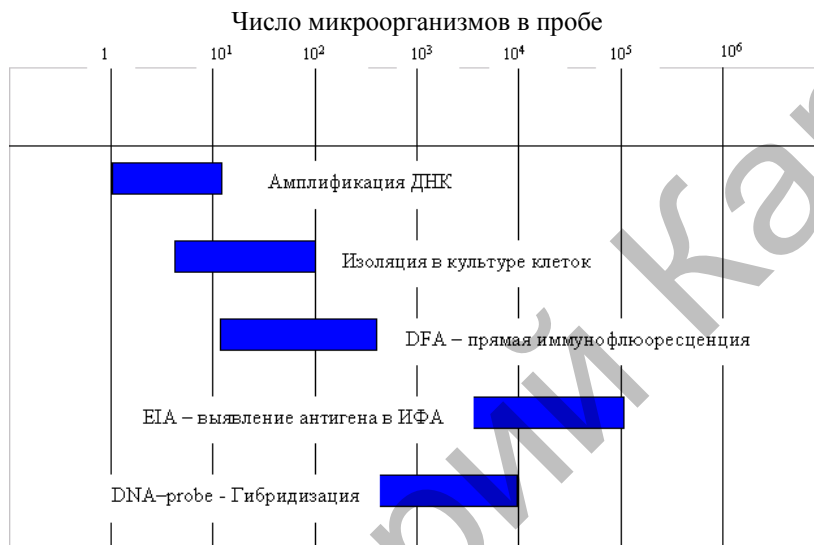


Рисунок. Относительный предел измерения (аналитическая чувствительность) прямых методов диагностики *Ch. trachomatis* (Carolyn M.Black, 1997)

Диагностическая чувствительность определяется количеством пациентов с данным заболеванием, дающих истинно положительные результаты при использовании конкретного набора, и оценивается в процентах. В этом аспекте имеется общее положение, определяющее клиническую пригодность любых лабораторных способов диагностики или тест-систем — диагностическая чувствительность метода не должна быть ниже 95–98 %.

Второй универсальный критерий лабораторной эффективности — «специфичность» определяется процентом здоровых людей, имеющих истинно отрицательные результаты анализа. Метод ПЦР обладает высочайшей специфичностью, которая достигает 99–100 %.

Диагностическая чувствительность и специфичность ПЦР сопоставимы, а зачастую и превосходят таковые, обеспечиваемые культуральным методом, которые являются «золотым стандартом» в диагностике инфекционных заболеваний. Если учесть продолжительность процедуры выращивания культуры клеток (от нескольких недель до нескольких месяцев), то преимущество метода ПЦР становится несомненным. Результаты ПЦР-анализа можно получить в течение одного рабочего дня, при этом отобранные для анализа пробы могут храниться (накапливаться) в течение даже нескольких недель при соблюдении соответствующих температурных норм. Проведенная недавно в нескольких зарубежных исследовательских центрах суммированная оценка чувствительности различных методов диагностики показала, что «быстрые» или экспресс-тесты имеют чувствительность 40–60 %, ИФА — 50–70 %, прямая иммунофлюоресценция (ПИФ) — 55–75 %, культуральное исследование — 60–80 %, а ПЦР — от 90 до 100 %.

Как видно, ПЦР по сравнению с другими способами обладает двумя важными преимуществами: высокой чувствительностью и непродолжительностью по времени анализа, т.е. «актуальностью» получения результата исследования врачом и пациентом.

Таким образом, приведенные выше факты позволили отметить преимущества ПЦР перед другими методами клинической лабораторной диагностики.

1. *Универсальность.* Метод принципиально позволяет обнаруживать любые ДНК и РНК даже в тех случаях, когда другими способами это сделать невозможно.

Вне зависимости от объекта и области применения ПЦР (клиническая медицина, криминалистика, ветеринария, генетика, молекулярная биология) используется стандартный комплект приборов. Это обуславливает универсальность процедуры постановки ПЦР при исследовании любых биологических объектов.

2. *Специфичность.* Высокая специфичность (100 %) метода обусловлена тем, что в исследуемом материале определяется уникальный фрагмент НК (нуклеотидная последовательность), характерный только для данного возбудителя или гена. Таким образом, ПЦР-диагностикумы дают возможность избежать проблем, связанных с перекрестно-реагирующими антигенами.

3. *Чувствительность.* Возможность проведения не только качественной (наличие), но и количественной (концентрация) оценки содержания НК. В настоящее время реальный порог чувствительности коммерческих амплификационных тест-систем позволяет определять несколько сот копий в исследуемом образце.

4. *Актуальность ответа (быстрота получения результата).* Высокая технологичность и автоматизация метода позволяют получить результаты исследования врачом и пациентом в день проведения анализа.

5. *Возможность доклинической и ретроспективной диагностики.* ПЦР позволяет осуществить определение патогена или дефектного гена в организме ещё до развития заболевания, например, при инфекциях в инкубационном периоде, т.е. серонегативной фазе или при латентном характере заболевания. Кроме того, возможно проведение ПЦР в архивном (фиксированном) материале или биологических остатках, что важно для идентификации личности или отцовства.

6. *Проведение анализа возможно в минимальном объеме пробы* (до нескольких микролитров), что крайне важно в неонатологии, судебной медицине, клинической генетике и т.п.

7. *Возможность одновременной диагностики нескольких возбудителей заболеваний* или аномальных генов в одной пробе без ущерба для чувствительности или специфичности результата.

8. *Возможность экспертизы.* Полученные результаты ПЦР возможно вносить в компьютерные информационные носители или фотографии для оценки независимыми экспертами.

9. *Исключение возможности инфицирования персонала в процессе проведения ПЦР*, так как материал дезинфицируется лизисом и высокой температурой.

Несмотря на указанные выше достоинства, метод ПЦР все же не лишен некоторых недостатков, которые следует учитывать при оценке результатов исследований.

Применение ПЦР для диагностики инфекционных заболеваний

В настоящее время наиболее быстро развиваются следующие основные направления генодиагностики:

- диагностика инфекционных заболеваний;
- диагностика онкологических заболеваний;
- диагностика генетических заболеваний.

Метод ПЦР решает три главные последовательные задачи:

- позволяет определять наличие или отсутствие патогена (или аномального гена);
- в значительной мере отвечает на вопрос «лечить или не лечить?»;
- позволяет оценить качество терапии путем контроля наличия или отсутствия возбудителя или аномального гена.

За последнее десятилетие методы амплификации нуклеиновых кислот уверенно вошли в лабораторную практику диагностики урогенитальных инфекций [3–6]. Высокая чувствительность и специфичность ПЦР, ставшей для ряда инфекций «золотым стандартом», проверены временем и тщательно апробированы клинически. Необычайная чувствительность метода позволяет специалистам гарантированно обнаруживать единичные возбудители в биологическом материале на основе их генетической информации. Аналитическая чувствительность АмплиСенс ПЦР-тест-систем для большинства вирусов и бактерий — воспроизводимое выявление 100 микроорганизмов в исследуемой биологической пробе (1000 микроорганизмов в 1 мл). Специфичность ПЦР при использовании технологии АмплиСенс даже для всех вирусных, хламидийных, микоплазменных, уреоплазменных и большинства других бактериальных инфекций достигает 100 % [7].

Наиболее эффективно и обоснованно использование метода в урогинекологической практике — для выявления хламидиоза, уреаплазмоза, гонореи, герпеса, гарднереллеза, микоплазменной инфекции, ВПЧ — вируса папилломы человека; в пульмонологии — для дифференциальной диагностики вирусных и бактериальных пневмоний, туберкулеза; в гастроэнтерологии — для выявления геликобактериоза; в клинике инфекционных заболеваний — в качестве экспресс-метода диагностики сальмонеллеза, дифтерии, вирусных гепатитов В, С и G; в гематологии — для выявления цитомегаловирусной инфекции, онковирусов. Высокоспецифичная, чувствительная и быстрая диагностика многих тяжелых заболеваний способствует не только их эффективному лечению, но и предотвращению распространения инфекции [8].

Наиболее частой причиной воспалительных заболеваний урогенитального тракта являются хламидий и микоплазмы. *Chlamidia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* вызывают более половины всех негонококковых урогенитальных заболеваний, передающихся половым путем [9]. Клинические варианты хламидиоза и микоплазмозов разнообразны, чаще всего проявляются в виде подострого и вялотекущего уретрита, нередко осложненного простатитом, везикулитом, эпидидимитом у мужчин и эндоцервицитом, вагинитом, аднекситом и бартолинитом — у женщин [10]. По данным специалистов ВОЗ, ежегодно у около 50 млн. человек впервые диагностируется генитальный хламидиоз. Экологической нишей хламидийной инфекции является цилиндрический эпителий шейки матки, уретра и прямая кишка. Полагают, что около 10 % всех женщин и мужчин инфицированы *Ch. trachomatis*. При этом у пациентов хламидиоз протекает бессимптомно. Вместе с тем хламидии могут вызывать тяжелые заболевания, характеризующиеся как хронические воспаления малого таза, приводящие к бесплодию (женскому и мужскому) и другим последствиям. Для диагностики хламидиозной инфекции используют прямые (культуральные и молекулярно-генетические) и косвенные (определение специфических антител) методы диагностики. Наиболее доступным и эффективным является метод ПЦР.

В последнее время для диагностики заболеваний урогенитального тракта применяется метод ПЦР, позволяющий определять в биологическом материале ДНК *Chlamidia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* [11, 12]. Он зарекомендовал себя как метод, который может быть использован в практическом здравоохранении [13].

Так, С.В.Скворцовым (и др.) были изучены возможности ПЦР по выявлению хламидий и микоплазм при урогенитальной патологии и определению чувствительности ПЦР и РИФ (реакции иммунофлюоресценции) в диагностике хламидиоза. В таблице 1 приведены результаты обследования больных с негонококковыми воспалительными заболеваниями мочеполовых органов и их половых партнеров.

У мужчин *Ch. trachomatis* обнаружен в 24,2 % случаев, *U. urealyticum* — в 21,2 % и *M. hominis* — в 14,1 %; у женщин — соответственно в 23,3, 36,7 и 20 %. В Карагандинской области с помощью метода ПЦР *Ch. trachomatis* обнаружен в 9,52 % случаях, *U. urealyticum* — в 57,89 %, *M. hominis* — в 27,47 % [14].

Используя ПЦР, удалось установить этиологию заболевания более чем в 60 % случаев. У женщин выявлялись чаще, чем у мужчин. Обращает на себя внимание большой процент носительства *Ch. trachomatis* у контактных лиц, что дает основание для обязательного обследования половых партнеров. Также были выявлены смешанные инфекции. У женщин смешанные инфекции встречались в 2,5 раза чаще, чем у мужчин.

Таблица 1

Диагностика хламидийной, уреаплазменной и микоплазменной инфекций у лиц с заболеваниями урогенитального тракта, %

Контингент (диагноз)	Возбудитель			Всего
	<i>C. trachomatis</i>	<i>U. urealyticum</i>	<i>M. hominis</i>	
Мужчины (уретрит)	24,2	21,2	14,1	59,5
Женщины (цервицит, вагинит)	23,3	36,7	20,0	80,0
Контактные	35,3	5,9	—	41,2
В среднем	25,0	25,0	14,8	64,8

При параллельном обследовании 86 больных на *Ch. trachomatis* методами ПЦР и РИФ установлено, что ПЦР оказалась более чувствительной: *Ch. trachomatis* обнаружена у 28 (32,6 %) больных, а с помощью РИФ — у 25 (29,1 %). Результаты исследований свидетельствуют о широких возможностях метода ПЦР для объективного комплексного исследования на хламидиоз и микоплазмозы больных с негонококковыми воспалительными заболеваниями мочеполовых органов, высокой эффективности и перспективности его применения в клинической практике [15].

Кроме того, в результате исследований, проведенных В.И.Киселевым (и др.), было установлено, что метод ПЦР может применяться в качестве критерия излеченности при хламидийной инфекции наряду с методом культуры клеток, который должен применяться в качестве подтверждающего теста при положительных результатах ДНК-диагностики [16].

Вирусные гепатиты (ВГ)

Современная таксономия вирусов гепатита человека представлена семью типами возбудителей: А, В, С, D, E, G и TTV. Для каждого вида возбудителя разработаны амплификационные тест-системы, но наиболее ценным метод ПЦР оказался в диагностике вирусов гепатита В, С, D, G и TTV.

Т а б л и ц а 2

Общие характеристики вирусных гепатитов

Заболевание / возбудитель	Геном вируса	Способ передачи	Диагностические тесты
Гепатит А/HAV	Одноцепочечная РНК 7500 п.о.	Энтеральный	АлАТ, HAV РНК, HAVAg
Гепатит В/HBV	Двухцепочечная ДНК, 3200 п.о.	Парентеральный	АлАТ, HBV ДНК, HbsAg, HBeAg, антитела к вирусным антигенам
Гепатит С/HCV	Одноцепочечная РНК, 9500 п.о.	Парентеральный	АлАТ, HCV РНК, антитела к вирусу
Гепатит D/HDV	Одноцепочечная РНК, 1700 п.о.	Парентеральный	HDV Ag, HDV РНК, антитела к вирусу
Гепатит E/HEV	Одноцепочечная РНК, 7500 п.о.	Энтеральный	АлАТ, HEV РНК, антитела к вирусу
Гепатит G/HGV	Одноцепочечная РНК, 9500 п.о.	Парентеральный	HGV РНК
Гепатит TTV	Одноцепочечная ДНК	Парентеральный	TTV ДНК

Примечание. АлАТ — аланинаминотрансфераза.

Это обусловлено тем, что именно указанные возбудители больше всего ответственны за летальные, хронические и неопластические исходы вирусных гепатитов у людей. В патогенезе ВГ решающую роль играют свойства вируса и генетически детерминированный характер иммунного ответа на этот возбудитель, поэтому не менее важна оценка иммунитета (определение CD-4, CD-8, CD-56 и других фенотипов, уровня интерферонов). Как указывалось выше, наиболее точные оценки иммунного статуса получаются при использовании метода проточной цитофлюориметрии. Общая характеристика вирусных гепатитов приведена в таблице 2.

Вирус простого герпеса I и II типов (ВПГ 1+2)

Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых ВПГ 1+2 типов, включает в себя комплекс исследований, состоящий из выявления специфического иммунного ответа (антител), определения вирусной ДНК и вирусных белков (антигенов), а также подтверждение природы патогена культуральным методом (по цитопатогенному эффекту вируса в перевиваемой культуре клеток).

Серологические тесты на ВПГ, направленные на выявление антител против ВПГ 1+2, показали низкую диагностическую значимость из-за неоднозначности клинической трактовки. Это обусловлено тем, что у 97–100 % обследованных клинически здоровых лиц обнаруживались указанные антитела. Нарастание титров антител к ВПГ происходит медленно, в течение нескольких недель, при этом могут одновременно определяться специфические антитела класса М и G. Впоследствии антитела к ВПГ класса М могут циркулировать в крови в некоторых случаях от нескольких месяцев до нескольких лет. Этот феномен связывают с нарушением иммунитета у инфицированных ВПГ лиц. Кроме того, в случае реактивации ВПГ в крови могут вновь появиться специфические антитела класса М. С другой стороны, у иммуносупрессированных пациентов при рецидивах инфекции ВПГ антитела к вирусу (как IgM, так и IgG) могут не выявляться. Ложноотрицательный ответ на анти-ВПГ класса М может быть у новорожденных. Все перечисленное выше показывает затруднительность

дифференцировки острой инфекции ВПГ от её реактивации. Тем не менее серологическое обследование необходимо проводить, и делать это надо методом «парных» сывороток (с интервалом 14–21 день). Так, например, отсутствие в первой и появление во второй сыворотке противогерпетических IgM или нарастание титров специфических IgG в 4 раза и более может быть показателем острой инфекции ВПГ. Таким образом, серологические тесты на наличие антител к ВПГ не могут служить единственным и надёжным критерием в постановке клинического диагноза.

Метод ПЦР в настоящее время является основным диагностическим способом в практическом здравоохранении для выявления ДНК вируса. При этом для выделения ДНК ВПГ может быть использован любой биологический материал: клетки, биологические жидкости, ткани и т.п. В настоящее время разработаны методы количественного определения вирусной ДНК в тестируемом образце. На основании полученных данных можно оценить форму инфекционного процесса. Так, если количество ДНК превышает 1000 копий геном-эквивалента (г/э) на 10 лейкоцитов периферической крови, это может свидетельствовать о развитии диссеминированной инфекции.

Цитомегаловирус (ЦМВ)

ЦМВ может быть причиной многих серьёзных заболеваний с летальным исходом. Темпы роста заражения ЦМВ составляют 1 % в год, при этом к пятидесятилетнему возрасту инфицированность людей приближается к 100 % показателю. Эти факты не позволяют однозначно ответить на вопрос о степени патогенности вируса. С одной стороны, ЦМВ редко вызывает клинически манифестные заболевания у иммунокомпетентных людей. С другой стороны, у иммунодефицитных пациентов отмечено развитие таких ЦМВ-обусловленных заболеваний, как мононуклеоз (гетерофильнонегативный вариант), хориоретинит, ретардация ментальных функций, глухота и т.п. Как и любая другая герпетическая инфекция, при первичном инфицировании ЦМВ возникает пожизненная латенция. Реактивация ЦМВ-инфекции зависит от состояния иммунной системы организма, срыв которой приводит к возможности патологического влияния вируса на организм.

Лабораторная диагностика ЦМВ-инфекции включает в себя несколько подходов:

- 1) выявление инфекционных вирусных частиц или антигенов;
- 2) определение вирусной ДНК;
- 3) определение иммунного ответа организма;
- 4) выявление прямого цитопатического действия вируса, выделенного из биологических субстратов пациента, на перевиваемую культуру клеток.

Серологические тесты на ЦМВ являются основными для установления инфицирования данным вирусом. Однако это отнюдь не является основанием для заключения о том, что болезнь действительно вызвана ЦМВ. Показано, что высокие титры анти-ЦМВ-антител обнаружены как у здоровых носителей, так и у больных с острым течением инфекции. Селективное определение специфических антител против ЦМВ класса М и G также не позволяет с полной уверенностью дифференцировать острую инфекцию от реактивации хронической. Поэтому определение вирусных антигенов и ДНК ЦМВ становится важным тестом для диагностики заболевания этим вирусом.

Метод ПЦР широко используется для диагностики ЦМВ в любых биологических тканях и жидкостях, в том числе и биопсийном материале, фиксированном формалином. Этот метод превышает по своей чувствительности все имеющиеся аналоги. Для увеличения диагностической и прогностической значимости разрабатываются количественные методы исследования, создаются праймеры к сверхранним, ранним и поздним генам вируса. Кроме того, апробируются новые технологии ПЦР, основанные на определении РНК-зависимой ДНК-полимеразы. Это позволит выявлять мРНК реплицирующегося ЦМВ. Во многих работах показано, что прямая детекция ДНК ЦМВ в плазме методом ПЦР коррелирует с повышенным риском развития манифестной формы ЦМВ или связанными с ней осложнениями. Кроме того, определение вирусной нагрузки ЦМВ в крови позволяет оценить эффективность противовирусной терапии [17].

Папилломавирусная инфекция человека

Согласно пресс-релизу Всемирной организации здравоохранения от 03.06.96 г. во всем мире отмечается рост заболеваемости папилломавирусными инфекциями (HPV — от англ. Human Papillomavirus). Установлено, что ВПЧ-инфекция — высокораспространенное заболевание, передаваемое половым путем. Обширные эпидемиологические исследования проводятся в разных странах [18–20].

Согласно данным эпидемиологических исследований встречаемость ВПЧ значительно варьирует в различных этнико-географических регионах. Распространенность ВПЧ во многом определяется социально-экономическими, поведенческими, медико-гигиеническими условиями. Минимальная зарегистрированная частота инфицированности ВПЧ (5 %) наблюдается в Испании. Эта страна принадлежит к странам с «низким» риском заболевания раком шейки матки. Наибольший уровень инфицирования наблюдается в Аргентине и Гондурасе и приближается к 40 % от всего обследованного контингента.

HPV-инфекцию начали интенсивно изучать после установления доказательств роли данного вируса в возникновении опухолей аногенитальной области, в частности, рака шейки матки.

HPV — мелкие ДНК-вирусы, особенностью которых является пролиферативное влияние на эпителиоциты кожи и наружных слизистых. В настоящее время известно около 100 типов HPV, различаемых онкогенными свойствами. К группе высокого онкопотенциала относят следующие типы вирусов папилломы: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68. К типам с низкими предиктами онкогенности относят варианты: 6, 11, 42, 43 и 44. Что же касается частоты встречаемости типов ВПЧ, то среди здоровых женщин наиболее часто встречается ВПЧ типа 16, в 1,5–2 раза реже выявляется ВПЧ типа 18. Суммарно на долю этих двух типов приходится 45 % от общего числа выявляемых типов ВПЧ. В лабораторной диагностике HPV-инфекции применяются исключительно молекулярно-генетические методы анализа. Использование метода ПЦР для выявления папилломатоза резко повышает уровень доклинической диагностики предраковых состояний благодаря высочайшей чувствительности и предсказательной ценности типирования вируса. Проведенные эпидемиологические исследования в Европе и Северной Америке показали, что при всех формах инвазивного рака матки у 70 % женщин старше 35 лет с дисплазией клеток эпителия матки был выявлен вирус папилломы преимущественно 16 и 18 типов. У женщин с нормальной цитологией HPV обнаруживался только в 3,5 % обследованных [21].

Применение ПЦР для диагностики наследственных заболеваний

В патогенезе наследственных болезней лежат аномалии наследственного аппарата (генома) клетки. Данные повреждения могут затрагивать весь геном или только отдельные хромосомы клетки. В связи с этим могут возникать хромосомные или генные болезни. По данным генетического мониторинга в странах Восточной Европы нарушения генома разной степени встречаются у 1,5–2 % всех новорожденных, что влияет на показатели здоровья детского населения. Методы молекулярной диагностики в своей сути явились продуктом исследований в области устройства генома клетки человека [22].

В настоящее время ПЦР является основным диагностическим средством в клинической практике генетика. С помощью ПЦР можно определять локализацию предполагаемых мутаций или полиморфных сайтов в ДНК клетки. Разработаны и практически применяются варианты автоматического поиска последовательностей ДНК, использование которых оптимизирует амплификацию необходимого участка ДНК. В качестве источника матричной ДНК может использоваться любой биологический материал (даже деструктурированный), сохранивший в своем составе определённую часть нуклеотидной последовательности. Существует множество модификаций ПЦР для медико-генетического анализа, применение которых зависит от целей и характера исследований. Самым главным достоинством ПЦР для медико-генетической диагностики является универсальность, позволяющая проводить исследования на любой стадии онтогенеза индивидуума, в том числе и в пренатальном периоде. В диагностике генетических болезней имеют место два подхода:

- прямая диагностика, основанная на непосредственной идентификации мутации в определённом гене;
- косвенная (непрямая) диагностика, основанная на маркировании мутантного гена с помощью молекулярных маркеров.

Прямая диагностика основана на определении мутации в самом гене. Этим создается высокая точность исследования (98–100 %) и возможность пренатальной диагностики в семье и выявления гетерозиготных носителей при отсутствии больного ребёнка. Непрямой, или косвенный, подход является более универсальным и распространённым. Его суть лежит в анализе внутри- и внегенных полиморфных сайтов. Главное достоинство косвенного метода — возможность ДНК-диагностики без точной идентификации мутации в самом гене, даже при отсутствии данных о точной идентификации мутантного гена. Недостатком этого метода является необходимость наличия в семье больного ребёнка или возможность исследования «архивной» ДНК в случае его гибели. Кроме того, имеется бо-

лее высокий процент ошибки, обусловленный переносом полиморфного сайта на здоровый аллель вследствие кроссинговера.

В настоящее время можно осуществлять пренатальную клиническую диагностику методом ПЦР следующих моногенных заболеваний: гемофилия А и В, миодистрофия Дюшена/Беккера, болезни Хантера и Леш-Нихана, агаммаглобулинемия, муковисцидоз, фенилкетонурия, синдромы Альпорта и Шарко-Мари-Тус, болезнь Коновалова-Вильсона и дефицит альфа-1-антитрипсина и т.п. [23–24].

Применение ПЦР для диагностики онкологических заболеваний

Онкологическая заболеваемость является одной из основных причин смертности, особенно среди населения стран СНГ, подвергшихся воздействию последствий Чернобыльской катастрофы, — государств с высоким возрастным цензом населения. Концептуальное положение «опухоль — это патология генов» во многом определило стратегию диагностики и лечения новообразований. Определение понятий «канцероген», «протоонкоген» и «антионкоген», в сочетании с открытием и внедрением в клиническую практику метода ПЦР, послужило решительным толчком в области диагностики и лечения новообразований. Тестирование молекулярно-генетических онкомаркеров предполагает выявление дефектов структуры и функциональную активность НК протоонкогенов, антионкогенов и биологических канцерогенов (вирусов). Наиболее приемлемым способом точно и быстро определять аномальные ДНК является ПЦР. Высокая чувствительность метода позволяет определять аномальную ДНК в ничтожно малых количествах (десятки, сотни копий агента), что означает выявление неопластических клеток на доклинической стадии опухолевого процесса.

Теоретической предпосылкой генодиагностики рака является то обстоятельство, что канцерогенез есть результат накопления в соматических клетках мутаций ряда функционально важных генов, участвующих в клеточной пролиферации, апоптозе, репарации ДНК и др. В силу этого обнаружение в биологических средах организма мутантных генов (т.е. специфическим образом измененных нуклеотидных последовательностей ДНК) свидетельствует о присутствии в организме трансформированных клеток. За последнее десятилетие было выявлено более сотни генов, ответственных за генезис различных онкозаболеваний; мутации в этих генах идентифицированы, а генетические пути, в рамках которых эти гены действуют, охарактеризованы [25]. Общеизвестно, что от 3 до 8 последовательных генетических повреждений в делящейся соматической клетке могут привести к ее озлокачествлению и к запуску процесса образования опухоли [26].

В соответствии с двумя типами дефектов, лежащих в основе канцерогенеза, известные сегодня ДНК-маркеры являются либо генетическими, сопряженными с изменением нуклеотидной последовательности ДНК, либо эпигенетическими, обусловленными aberrантным метилированием определенных последовательностей ДНК. Обнаружение в биологических средах таких специфическим образом измененных или модифицированных последовательностей указывает на присутствие в организме опухоли.

К генетическим дефектам относятся мутации, делеции и вставки, которые могут быть локализованы как в ядерной, так и в митохондриальной ДНК, в составе как структурных генов, так и некодирующих микросателлитных последовательностей. Наиболее частым объектом анализа являются также мутации онкогенов (например, K-RAS) или генов-супрессоров опухолевого роста (в частности, TP53, APC и др.).

К эпигенетическим изменениям относится метилирование остатков цитозина в регуляторных участках генов-супрессоров. Являясь важным физиологическим процессом, лежащим, в частности, в основе феномена генетического импринтинга, метилирование ДНК становится существенным фактором канцерогенеза в том случае, когда оно распространяется за пределы четко определенных генетических «территорий».

Опухолевые клетки и содержащиеся в них ДНК можно выявлять на удалении от основного очага. При обнаружении специфических мутаций в ДНК естественных выделений можно подозревать опухоль соответствующего органа. Этот подход весьма эффективен в случае опухолей мочевого пузыря, толстой кишки, легких и бронхов, поджелудочной железы [27].

Основные направления использования ПЦР в онкологической патологии включают:

- ДНК-диагностику наследственных форм рака;
- ДНК-диагностику спорадических форм рака;
- определение микрометастазов;

- ДНК-диагностику биологических канцерогенов (HPV 16 и 18 типов, ВЭБ-инфекции, HBV и HCV, ретровирусы и т.п.);
- доклиническую диагностику опухолей (определения протоонкогенов и антионкогенов);
- прогноз заболевания и успешности назначаемой терапии, а также эффективность проведенного лечения на основе диагностики функциональной активности онкогенов;
- исследование «архивных» биоптатов с установленным клинико-гистологическим диагнозом. Это важно в оценке диагностической значимости предполагаемого маркера и правильности терапии.

Использование метода ПЦР в практической онкологии даст ценную научную и клиническую информацию врачу, что значительно улучшит качество диагностики.

Персонализированная медицина

Иногда лекарства оказываются токсичными или аллергенными для некоторых пациентов. Причины этого отчасти в индивидуальных различиях в восприимчивости и метаболизме лекарств и их производных. Эти различия детерминируются на генетическом уровне. Например, у одного пациента определенная цитохром (белок печени, отвечающий за метаболизм чужеродных веществ) может быть более активен, у другого — менее. Для того чтобы определить, какой разновидностью цитохрома обладает данный пациент, предложено проводить ПЦР-анализ перед применением лекарства. Такой анализ называют предварительным генотипированием (англ. prospective genotyping) [28].

Список литературы

- 1 Федоров Н.А. Генодиагностика инфекции методом ПЦР // Педиатрия. — 1995. — № 4. — С. 69–70.
- 2 Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. — М.: Мир, 2002. — 589 с.
- 3 www.medlab.scn.ru
- 4 Жданов А.В., Малинина Э.В., Файзуллин Л.З. и др. Выявление хламидий методом полимеразной цепной реакции при патологиях репродуктивной системы мужчин и женщин // Бюллетень экспериментальной биологии. — 1996. — № 5. — С. 547–550.
- 5 Тихонова Л.И. Общий обзор ситуации с инфекциями, передаваемыми половым путем // Современные методы диагностики, терапии и профилактики инфекций, передаваемых половым путем, и других урогенитальных инфекций: Материалы рабочего совещания дерматовенерологов и акушеров-гинекологов. — М., 1999. — С. 2–3.
- 6 Black C.M. Current methods of laboratory diagnoses of Chlamydia trachomatis infections // Clin. Microbiol Rev. — 1997. — № 10. — P. 160–184.
- 7 www.med-expert.ru
- 8 www.medsan.ru
- 9 Овчинников Н.М., Беднова В.Б., Делекторский В.В. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем. — М.: Медицина, 1987. — 273 с.
- 10 Ракольская И.В., Вульфович Ю.В. Урогенитальные микоплазмозы: Обзорная информация. — М., 1990. — 437 с.
- 11 Bauwens J.E., Clark A.M., Stamm W.E. Diagnosis of Chlamydia Trachomatis endocervical infections by a commercial polymerase chain reaction assay // Clinical microbiology. — 1993. — Vol. 31. — № 11. — P. 3023–3027.
- 12 Blanchard A. et al. Detection of Ureaplasma urealyticum by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adult, amniotic fluid and in the respiratory tract // Clinical infectious diseases. — 1993. — Vol. 17. — № 8. — P. 148–153.
- 13 Jaschek G., Gaydos C.A., Welsh L.E., Quinn T.S. Direct detection of Chlamydia trachomatis in urine specimens from symptomatic and asymptomatic men by using a rapid polymerase chain reaction assay // Clinical microbiology. — 1993. — Vol. 31. — № 5. — P. 1209–1212.
- 14 Погосян Г.П., Ли К.Г., Жумина А.Г. Изучение амплификации ДНК некоторых бактериальных агентов, вызывающих урогенитальные заболевания // Повышение качества образования и научных исследований: Материалы междунар. науч.-практ. конф. в рамках VI Сатпаевских чтений (12–14 апреля 2007 г.). — Экибастуз: Изд-во ЕИТИ, 2007. — С. 744–749.
- 15 Скворцов С.В., Найденов Ю.Н. и др. Диагностика хламидиоза и урогенитальных микоплазмозов при помощи цепной полимеразной реакции // Военно-медицинский журнал. — 1995. — № 7. — С. 49–50.
- 16 Киселев В.И., Латыпова М.Ф. и др. Полимеразная цепная реакция в качестве критерия излеченности урогенитального хламидиоза // Вестник дерматологии и венерологии. — 2001. — № 4. — С. 4–5.
- 17 www.dialab.dp.ua
- 18 Boone C.W., Kelloff G.J. Endpoint markers for clinical trails of chemopreventive agents derived from the properties of epithelial precancer measured by computer-assisted image analysis // Cancer Survey. — 1998. — Vol. 32. — P. 133–147.
- 19 McCree D.H. et al. National survey by specialty of US physicians' HPV screening practices // Prevmed. — 2003. — № 36. — P. 159–163.
- 20 Sherman M.E., Lorinoz A.T., Scot D.R. et al. Baseline cytology, human papillomavirus testing and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis // Natl. Cancer Inst. — 2003. — № 95. — P. 46–52.

- 21 Кубанов А.А. Современные методы диагностики вируса папилломы человека // Вестник дерматологии и венерологии. — 2005. — № 1. — С. 26–35.
- 22 Баев А.А. Программа «Геном человека», ее возникновение, содержание и развитие // Итоги науки и техники: геном человека. — 1990. — Т. 1. — С. 4–33.
- 23 Баранов В.С. Ранняя диагностика наследственных болезней в России (современное состояние и перспективы) // Международные медобзоры. — 1994. — Т. 2. — № 4. — С. 236–243.
- 24 Баранов В.С., Гинтер Е.К. Генетические аспекты муковисцидоза. — М.: Медицина, 1995. — 90 с.
- 25 Ланцов В.А., Вострюхина О.А. Диагностика злокачественных опухолей толстой кишки с помощью молекулярно-генетического анализа фекальной ДНК // Вопросы онкологии. — 2005. — Т. 51. — № 2. — С. 167–172.
- 26 de Kok T.M., van Maanen J.M. Evaluation of fecal mutagenicity and colorectal cancer risk// Mutat Res. — 2000. — Vol. 463. — P. 53–101.
- 27 Golijow C.D., Mouron S.A. et al. Differences in K-ras codon 12 mutation frequency between «high risk» and «low-risk» HPV-infected samples// Gynecol. Oncology. — 1999. — Vol. 75. — P. 108–112.
- 28 wikipedia.org.ru.

А.Г.Жумина

Полимеразды тізбекті реакцияны медицинада қолдану

Мақалада медицинада полимеразды тізбекті реакцияны (ПТР) пайдалану мүмкіндіктері туралы мәліметтер келтірілген. ПТР-дың принципі және диагностика әдісі ретінде басқа әдістермен (ИФТ және бактерияларды өсіру) салыстырғанда артықшылықтары туралы жазылған. ПТР-ды медицинада жұқпалы, тұқымқуалаушылық, ісік аурулардың диагностикасы үшін және дербес медицинада қолданады. Персоналданған медицинада ПТР-ді пациенттердің дәрілерге және олардың туындауларының қабылдағышы мен метаболизмі бойынша жеке айырмашылықтарын анықтау үшін пайдаланады.

A.G.Zhumina

Application of polymerase chain reaction in medicine

The data about application possibilities polymerase chain reaction (PCR) in medicine is cited in article. PCR principle and advantages as diagnostics method in comparison with other methods are described (IEA, bacterial crops). PCR apply in medicine to diagnostics of infectious, hereditary and oncological diseases, and also in the personalized medicine. Possibilities of application of PCR method for diagnostics of some bacterial and virus sexually transmitted infections, hepatitises, and as some hereditary and oncological diseases are considered in article. In personalized medicine PCR apply to definition individual distinction of patients in a susceptibility and a metabolism of medicines and their derivatives.